





**XVI CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS**

**LIBRO DE RESÚMENES**

**CÓRDOBA  
14-17 DE SEPTIEMBRE DE 2008**

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de Córdoba

Editores:

José Fernández-Salguero Carretero  
Rosa García Gimeno  
Luis Medina Canalejo  
Lourdes Cabezas Redondo

Impresión:

Diputación de Córdoba. Imprenta Provincial

*ISBN: 978-84-691-5094-8*

*Depósito legal:*

**ÍNDICE**

CARTA DE BIENVENIDA.....	7
COMITÉS .....	8
PROGRAMA.....	11
CONFERENCIA INAUGURAL, MESAS REDONDAS, CONFERENCIA DE CLAUSURA.....	15
Conferencia inaugural	
Mesa redonda I	
Mesa redonda II	
Mesa redonda III	
Mesa redonda IV	
Conferencia de clausura	
COMUNICACIONES ORALES.....	58
Sesión I. Seguridad Alimentaria. ....	59
Sesión II. Seguridad Alimentaria. Metodología. Otras.....	76
Sesión III. Probióticos. Productos Fermentados. Microorganismos alterantes. Otras .....	99
Sesión IV. Enología .....	116
COMUNICACIONES POSTER .....	131
Sesión I. Seguridad Alimentaria. Metodología .....	132
Sesión II. Productos Fermentados. Micoorganismos alterantes. Bacteriocinas. Probióticos. Genómica de Microorganismos. Enología. Otras.....	242



CARTA DE BIENVENIDA

Estimados colegas y amigos:

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

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

El Congreso, siguiendo el formato de los últimos celebrados, ha sido estructurado con una conferencia inaugural, cuatro mesas redondas, cuatro sesiones orales, dos sesiones de póster y una conferencia de clausura. Los temas abordados en la conferencia inaugural y de clausura, así como en las mesas redondas programadas, se centran en aspectos de seguridad alimentaria, microorganismos alterantes y deseables, microbiología enológica e investigación en el área de los alimentos. Para la selección de los conferenciantes y ponentes invitados se ha contado con la sugerencia de los moderadores de las mesas redondas, siendo todos ellos profesionales y autoridades científicas de reconocido prestigio en el campo de la Microbiología Alimentaria y de la Investigación.

Hemos intercalado, además, un programa lúdico de visitas, en las que tendréis ocasión de contemplar otros lugares emblemáticos de la ciudad.

Finalizo agradeciendo sinceramente a la Diputación Provincial de Córdoba, al Ayuntamiento de la ciudad de Córdoba, a la Universidad de Córdoba y a la Junta de Andalucía, y a todas aquellas personas, empresas e instituciones que nos han ayudado en nuestra labor y han colaborado en el desarrollo del Congreso.

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

José Fernández-Salguero Carretero  
Catedrático de Tecnología de Alimentos  
Presidente del Comité Organizador

## **COMITÉS**

**COMITÉ DE HONOR**

**Presidente de Honor:**

**Excmo. Sr. D. Manuel Chaves González**  
Presidente de la Junta de Andalucía

**Excma. Sra. Dña. Rosa Aguilar Rivero**  
Alcaldesa de Córdoba

**Excma. Sra. Dña. María Jesús Montero Cuadrado**  
Consejera de Salud de la Junta de Andalucía

**Excmo. Sr. D. Francisco Vallejo Serrano**  
Consejero de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía

**Excmo. Sr. D. Francisco Pulido**  
Presidente de la Diputación Provincial de Córdoba

**Excmo. Sr. D. José Manuel Roldán Nogueras**  
Rector Magnífico de la Universidad de Córdoba

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

**COMITÉ CIENTÍFICO**

**Miguel Ángel Asensio Pérez.** Universidad de Extremadura  
**José María Cabanás Espejo.** Delegación Provincial de Salud. Córdoba  
**Francisco Javier Carballo García.** Universidad de Vigo  
**Lorenzo de la Hoz Perales.** Universidad de Madrid  
**Rufino Jiménez Díaz.** Instituto de la Grasa y Derivados, CSIC. Sevilla  
**Rafael Jordano Salinas.** Universidad de Córdoba  
**Margarita Medina Fernández-Regatillo.** INIA. Madrid  
**María del Carmen Millán Pérez.** Universidad de Córdoba  
**Juan Carlos García Mauricio.** Universidad de Córdoba  
**Juan A. Ordóñez Pereda.** Universidad de Madrid  
**Santiago Condón Usón.** Universidad de Zaragoza.  
**Ana Rodríguez González.** IPLA, CSIC. Oviedo  
**Enrique David Sancho Puebla.** Universidad de Córdoba  
**Juan Evaristo Suárez Fernández.** Universidad de Oviedo  
**Francisco Tomás Barberán.** CEBAS, CSIC. Murcia  
**Jesús Ventanas Barroso.** Universidad de Extremadura  
**Gonzalo Zurera Cosano.** Universidad de Córdoba

*Coordinador:* **José Fernández-Salguero Carretero.** Universidad de Córdoba.

**COMITÉ ORGANIZADOR**

*Presidente:* **José Fernández-Salguero Carretero**  
Catedrático de Tecnología de Alimentos. Universidad de Córdoba

*Vicepresidenta:* **Rosa María García Gimeno**  
Profesora Titular de Nutrición y Bromatología. Universidad de Córdoba

*Secretaria:* **Luis Medina Canalejo**  
Profesor Titular de Nutrición y Bromatología. Universidad de Córdoba

*Tesorera:* **Lourdes Cabezas Redondo**  
Profesora Titular de Tecnología de Alimentos. Universidad de Córdoba

**Vocales:**

**Manuel Amaro López.** Universidad de Córdoba  
**Fernando García Viejo.** Laboratorio de Salud Pública. Córdoba  
**Rafael Gómez Díaz.** Universidad de Córdoba  
**María del Carmen Millán Pérez.** Universidad de Córdoba  
**Rafael Moreno Rojas.** Universidad de Córdoba  
**Francisco Rincón León.** Universidad de Córdoba.

**Colaboradores:**

Elena Carrasco Jiménez  
Elena Galán Larrubia.  
Juan A. Hernández Campuzano  
Dolores Muñoz Cano  
Fernando Pérez Rodríguez  
Antonio Pino Campos  
Francisco Prados Siles  
Salud Serrano Jiménez  
Antonio Valero Díaz  
Montserrat Vioque Amor

**PROGRAMA**

**DOMINGO, 14 de septiembre de 2008**

18:00-21:00 h. Inscripciones y entrega de documentación en la sede del Congreso – Palacio de la Merced, Diputación de Córdoba.

21:00 h. Copa de bienvenida .

**LUNES, 15 de septiembre de 2008**

9:00-11:00 h. **Ceremonia de apertura.**

Conferencia inaugural: “**Challenges for food safety**”.  
Prof. Ewen Todd, Michigan University, USA.

11:00-12:00 h. Pausa-café – Sesión de Posters I: Seguridad Alimentaria. Metodología.

12:00-14:00 h. **MESA REDONDA I. “Retos actuales de la seguridad alimentaria”.**

Moderador Dr. Gonzalo Zurera Cosano, Universidad de Córdoba.

“**Risk assessment in the context of industrial food safety management**”.  
PhD. John Bassett – Unilever Research, Reino Unido.

“**Recientes avances sobre los mecanismos patogénicos de *Listeria monocytogenes*: del laboratorio a la clínica**”.

Dr. José Antonio Vázquez Boland, Edimburg University, Escocia.

“**Microsistemas para la detección rápida de patógenos**”.  
Dr. Félix Amarita, AZTI-Tecnalia, Sukarrieta (Vizcaya).

14:00-16:00 h. Almuerzo libre.

16:00-17:30 h. Sesión de Comunicaciones Orales I: Seguridad Alimentaria.

17:30-18:00 h. Pausa-café.

**18:00-19:30 h. MESA REDONDA II. “Investigación y Desarrollo Tecnológico”.**

Moderador: Dr. Juan A. Ordóñez Pereda, Universidad Complutense. Madrid.

“**Alimentación y salud en Europa: de la seguridad a la eficacia**”.  
Dr. Andre Palou, Universidad de las Islas Baleares.

“**Análisis microbiológico por técnicas de PCR a tiempo real**”.  
Dr. Francisco Chavarri, Eppendorf Ibérica, Madrid.

“**I+D+i en la industria alimentaria: Atractivo o estrategia**”.  
Dr. Julio Tapiador. Divisa Ibérica Plus, S.L, Toledo.

21:00 h. Recepción Oficial ofrecida por el Ayuntamiento de Córdoba en el Alcázar de los Reyes Cristianos.

**MARTES, 16 de septiembre**

**9:00-11:00 h. MESA REDONDA III. “Microbiología alimentaria. Microorganismos alterantes y deseables”.**

Moderador Dr. Rafael Jordano Salinas, Universidad de Córdoba.

**“Papel de los microorganismos en la producción de alimentos vegetales fermentados”.**

Dr. Rufino Jiménez Díaz, Instituto de la Grasa y Derivados, CSIC. Sevilla.

**“Control de microorganismos alterantes en alimentos madurados”.**

Dr. Juan José Córdoba Ramos, Universidad de Extremadura, Cáceres.

**“Normalización en microbiología de alimentos. Presente y futuro”.**

Dr. David Tomás, AINIA, Valencia.

**“Integración de métodos de biología molecular en laboratorios de microbiología acreditados”.**

Dra. Pilar Lara López, Applied Biosystems, Madrid.

11:00-12:00 h. Pausa-café – Sesión de Posters II: Productos Fermentados. Microorganismos Alterantes. Bacteriocinas. Probióticos. Genómica de Microorganismos. Enología. Otras.

12:00-14:00 h. Sesión Comunicaciones Orales II: Seguridad Alimentaria. Metodología. Otras.

14:00-16:00 h. Almuerzo libre.

16:00-17:30 h. Sesión de Comunicaciones Orales III: Probióticos. Productos Fermentados. Microorganismos Alerantes.

17:30-18:00 h. Pausa-café.

18:00-19:30 h. Sesión de Comunicaciones Orales IV: Enología.

19:30-20:00 h. Asamblea socios SEM.

21:00 h. Visita guiada a la Mezquita-Catedral.

22:00 h. Cena de Clausura en Bodegas Campos.

**MIÉRCOLES, 17 de septiembre**

10:00-11:30 h. **Mesa Redonda IV. “Avances en Microbiología enológica”.**

Moderadores: Dr. Enrique David Sancho Puebla y Dra. Maria del Carmen Millán Pérez. Universidad de Córdoba.

**“Vino y seguridad alimentaria”.**

Dr. José Antonio Suárez Lepe, Universidad Politécnica de Madrid.

**“Nuevos sistemas de control microbiológico en enología”.**

Dr. Sergi Ferrer, Universidad de Valencia.

**“La inmovilización celular en enología”.**

Dr. Juan Carlos García Mauricio, Universidad de Córdoba.

11:30-12:00 h. Pausa-café.

**12:00-13:00 h. Conferencia clausura “VI Plan Nacional de I+D+i: cambios en el Programa de Investigación Fundamental”.**

Dr. Félix García-Ochoa Soria, Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid.

13:30 h. Entrega del Premio al mejor póster y a la mejor Comunicación oral.

14.00 h. Clausura de Congreso.

***CONFERENCIA INAUGURAL***  
***MESAS REDONDAS***  
***CONFERENCIA DE CLAUSURA***

## CONFERENCIA INAUGURAL

### CHALLENGES FOR FOOD SAFETY

*Ewen C.D. Todd*

*Advertising, Public Relations and Retailing,*

*Michigan State University*

The ultimate goal of all food safety programs is to prevent contaminated products from reaching the consumer, but we also learn much along the way about the implicated agents, including emerging problems, how contamination and growth occurs in different food commodities, and the overall burden of disease. Foodborne hazards include pathogenic bacteria, parasites, viruses and prions, as well as pesticide and veterinary drug residues, hormone use, unlawful food additives, mycotoxins, natural biotoxins, and radionuclides. Typically, if hazards are sufficient to cause illness, the microbiological hazards produce symptoms rapidly within hours or days, and chemicals typically with gradual, chronic long-term effects often taking years or decades. Millions of consumers are ill every year from foodborne pathogens, and sometimes infection with these leads to severe chronic sequelae, such as haemolytic uraemic syndrome from *E. coli* O157:H7, Guillain-Barré Syndrome from *Campylobacter jejuni*, and reactive arthritis or other immune response diseases from severe cases of salmonellosis. Since chemical contaminants rarely cause acute illness, their detection depends on regular monitoring of foods and their ingredients.

Foodborne disease surveillance is mainly a national endeavor and has to be relatively high in government priorities. In recent years many countries have established a food safety authority coupled with a health department responsible to an elected body for oversight of the safety of the food through monitoring and disease surveillance. Surveillance programs have improved to detect outbreaks with geographically distant cases through international programs like Infosan and PulseNet, conducting case-control studies, and targeting strategies to help reduce specific diseases. Some trends for foodborne diseases identified through surveillance programs include:

- Campylobacteriosis: some countries and regions have much higher rates than others; some decline in incidence might reflect efforts to reduce contamination of poultry and educate consumers about safe food-handling practices
- E. coli* O157: H7 infections: multiple interventions, especially for production of ground beef and enhanced strategies for reduction of pathogens in live cattle and during slaughter might have contributed to a decline, but supershedders in herds and the presence of the organism in the environment presents an ongoing risk. There is increased attention being paid to non-O157 STEC/VTEC diseases.
- Listeriosis: the incidence has risen in Europe, and not declined in the US in recent years. Transfer and cross-contamination plus growth under refrigerated conditions have been identified as important risk factors; targeted industry and consumer efforts must continue.
- Vibrio* infections from shellfish are on the increase because of warmer seawater temperatures.

However, there are issues with national and international surveillance programs such as lack of resources, consistency in data over time, and coordination between most countries so that information can be rapidly and efficiently shared. Nevertheless, collaboration between academia, government and industry with multiple disciplines helps understand and resolve many issues, some of which are global in nature and some are regional and local. Successful research leads to policy strategies, more pertinent risk-based regulations and guidelines, and education programs for food workers and the public.

Compounding issues for disease are increase in food trade, recreational travel and immigration. Goods from all over a country and abroad go through regional distribution centers, many of which are owned by large national or international chains. A typical center handles over half a million cases of food items weekly, loading upward of a thousand trucks. A modern superstore has from thirty thousand to fifty thousand product lines. Since many of these products are imported, the volume of international trade today is staggering. Consumers in industrialized countries and the rapidly rising middle class in developing countries are increasingly relying on imported raw ingredients and fully processed items to satisfy their demands for foods with convenience and variety. Enteric pathogens are an increasing high risk factor for contaminating food through worldwide travel and shipments, movement of whole populations seeking new jobs or refugee status, and increased use of antibiotics. With imported food products, countries face choices among risk management strategies that attempt to assure safety at points of production and processing in exporting countries, screen imported products at the point of entry, or use some combination of those approaches, e.g., the EU regulatory approach for foods primarily follows the first approach, whereas the U.S. approach for products other than meats primarily follows the latter. Results of FDA food import inspections reveal that China is consistently among the leading countries with the most food shipment rejections, mostly Sudan Red, antibiotics and pesticides in food, with FDA inspectors refusing 298 food shipments from China (\$2 billion in FDA-regulated food and agricultural products) compared with 56 shipments from Canada (\$10 billion in exports) in Jan-April, 2007. The rejection rate for foods imported from China, on a dollar-for-dollar basis, was more than 25 times that for Canada.

National monitoring needs to address a variety of risks (accidental contamination, industry sabotage, action by disgruntled employee, fraud/counterfeiting, political terrorism, as well as smuggling). Recalls are made to protect the public from contaminated food but are often not completely successful. There were 54 meat recalls in the US in 2007 compared with 34 in 2006. For 73 meat recalls in 2006/2007, recovery rates per recall averaged 44%, but for 5 recalls that followed reports of consumer illness, recovery rates per recall averaged just 20%. Low recovery rates occurred because weeks or months can pass between when a product is produced, someone gets sick and illness is linked with the food. Topps Meat recalled 21.7 million pounds of frozen hamburger because of potential contamination with *E. coli* O157:H7 in 2006. The recall, the second-biggest ever for ground beef, was well publicized; still, New Jersey officials found 141 boxes of recalled burgers in 12 state stores about a month after the recall, and many store owners did not know about the recall. For imports, the FDA is shifting from the current model that relies on "snapshots" at the border to a cost-effective, prevention-focused model that identifies and targets those steps in the import life cycle where the risks of unsafe products is greatest and verifies the safety of products at those important phases. In 1994, the SPS Agreement of the WTO gave each WTO member the right to determine its own level of SPS protection, so that countries can impose different standards to handle the risks of contamination. The Agreement sets principles for risk management by governments in the area of food safety, but the risk management options chosen should be as least restrictive to trade as possible. A current issue is trade in poultry. In the U.S. and Canada, poultry producers add chlorine and other chemicals to the carcass rinse bath to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* levels in retail birds. Any additive but water is illegal in the EU. Thus, there is virtually no trade between the U.S. and Europe for poultry. Other countries impose zero tolerance for *Salmonella* in imported poultry but cannot achieve it themselves, thus creating a double standard. It is possible but not certain that world poultry trade would be higher if countries were to harmonize around the same standards whether high or low. The same argument can apply to *L. monocytogenes* with standards from < 0.04 cfu/g to 100 cfu/g. There is no international agreement on what standards should be despite many years of Codex Alimentarius Commission discussions. Since such foods, e.g., soft cheeses, pâtés, deli meats and smoked fish, are frequently shipped globally, it is important not to have trade blocked by differing criteria. This leads into the area of risk assessment, which is a systematic, science-based examination of an issue to help make better risk management decisions. Both managers and assessors interact at stages including ranking of hazards in the hazard identification step, and considering intervention steps as a part of

possible management options. Food safety authorities in countries have different approaches as to how much their food safety policy should be governed by a risk assessment or by protectionist approach (precautionary principle). There is often limited information to make a complete assessment of the causes and burden of a disease but policies still have to be attempted. For instance, in the US, there has been a minimal decline in *Salmonella* cases. Only one of the five most common *Salmonella* serotypes, *S. Typhimurium*, declined significantly. There have been increased numbers of illnesses related to produce such as *Salmonella* in tomatoes and cantaloupes, and *E. coli* in spinach, lettuce, and sprouts, as well as ongoing infections from *S. Enteritidis* in eggs. There are multiple potential sources for produce contamination such as irrigation water, birds and wild animals, proximity of animal-raising farms, manure, dust, harvesting equipment, and human error. It is yet unclear of the importance of pathogen attachment to crop surfaces or their internalization through roots and cuts in the transfer of crop contaminants and their survival during processing. In addition, there is multidrug resistance among *Salmonella* serotypes, particularly *S. Newport*. More research is required to understand the complex epidemiology of *Salmonella* and to identify effective pathogen-reduction strategies. However, lack of control of *Salmonella* is not limited to the US. An EU-baseline survey carried out in 2005 and 2006 to determine the prevalence of *Salmonella* in commercial flocks showed an average prevalence of *Salmonella*-positive flocks of 23.7%, but with considerable variability in Member States, from 0% (Sweden) to 68.2% (Hungary), Poland (58.2%), Portugal (43.5%) and Spain (41.2%). Recent *Salmonella* outbreaks have also occurred with commercially products like chocolate, peanut butter, tahini, and pot pies because of a variety of processing errors. Many salmonellosis cases can be prevented by industry adopting the principles of HACCP, GHPs and GMPs, but *Salmonella* is a very versatile bacterium that can find new environmental niches to initiate food contamination.

Food workers are one major source on contamination, mainly at retail; 8% (24 million persons) of the US population over 15 years are employed as food workers, 23% (4.4 million) did not wash their hands, 33% (6.3 million) did not always change gloves between touching raw meats and RTE, 60% (11.4 million) did not wear gloves when touching RTE food, 53% (10.1 million) did not consistently use a thermometer, and 4.7% (900,000 nationally) worked while ill with vomiting or diarrhoea. Inappropriate food worker actions have been attributed to lack of time, staff and resources. Many of these workers are recent immigrants with limited understanding of the language and food safety standards of their new country, and are continually on the move, all of which presents difficulties in training. In a worldwide survey of 816 food worker associated outbreaks, norovirus and *Salmonella* infections were the most frequent. Infections occur typically through the fecal-oral route and through contact of food with skin or nose/throat secretions. The most important contributory factors were bare hand contact of food, improper washing of the hands, workers who care for an ill family member or change diapers. Diarrhea, vomitus, sneezes, open cuts and sores can deliver large quantities of pathogens into the food or preparation environment. Other issues are the low infective doses of some pathogens, workers often denying illness, and restaurant patrons sometimes being responsible for their own illnesses. Management supervision should include observing workers to insure proper cooking, hot holding, chilling and storage procedures and correct errors; noting and reporting any worker absences; encouraging workers to report personal and family illnesses; screening food workers (nasal and stool) if they are coming from a country with endemic enteric disease and when a local contamination event has occurred or is suspected; excluding them from preparation and serving food when they have gastrointestinal symptoms or are with infected skin lesions or sore throats; immunizing workers when recommended, e.g., against HAV; and having effective sick leave policies (e.g., offer job security and paid medical leave).

In food production systems, traceability is an important tool to facilitate control through traceforward (allowing the withdrawal of a product) or traceback (to determine its source) at each stage of the food supply chain. If there are no problems, some kind of certification or approval step is given to proceed to the next stage. Adoption of traceability allows a company to retrieve a contaminated lot quickly and not implicate similar lots or even brands with loss of consumer confidence, and to more easily assign blame in which part of the chain the problem occurred. Universal tagging systems may become mandatory once international agreements can be finalized, with RFID tags becoming universal from farm to fork. Reasons for adopting traceability are to respond quickly to a food safety problem, facilitate food sampling at appropriate points in the food chain; allow compliance with existing legislation; provide quality assurance; facilitate access to information to help in determining risk assessments; resolve allegations of false labeling; prevent fraud and theft of food items; improve food distribution systems and reduces food wastage; and help enforce and support

hygiene in food processing and handling. The risk of bioterrorism exposes the food supply to new areas of concern, where detection, traceability and containment are even more important than for naturally-occurring outbreaks. The FDA has developed CARVER + Shock method (Criticality, Accessibility, Recuperability, Vulnerability, Effect, Recognizability, and the Shock component to assess the public health, economic, and psychological impact of an attack) that allows the user to assess and determine the most vulnerable points in a system or infrastructure. The user can then focus resources on protecting these points. The effectiveness and completeness of a company or society emergency response system can be tested by simulated exercises or case studies, including role playing and table-top exercises where all potential players in detecting and containing a real attack would sit at tables and work out strategies as the scenarios unfold through a facilitator.

Components of an effective food safety program include: a science-based approach with emphasis on risk analysis and prioritization of resources for the greatest impact to reduce foodborne risks; national laws that are clear, rational, and scientific based on risk analysis, and no more than necessary to accomplish the program's goals; comprehensive surveillance (epidemiology and laboratory components) to understand the current situation and used as a basis for any improvements in disease control or prevention through the risk analysis process; one central organization at the national level with clear links to the regional levels (state, provincial, county) to avoid overlaps and gaps in deliverable programs and less conflict of interest; stakeholders as a part of the program with industry and consumer input through representation and open forums for both public and private discussion; partnering with academia and industry consortia to fund applied and basic research, education and outreach programs to understand and reduce foodborne disease; adequate, consistent and long-term funding; links with trading partners and contribution to international bodies like the Codex Alimentarius Commission. Activities of a food control agency include setting scientifically based safety standards through risk assessment, in-plant safety assurance (GMPs and HACCP), plant monitoring and certification, working towards national and international harmonisation or equivalency in standards, adopting some kind of precautionary principle without compromising the science, conducting appropriate risk assessments, and implementing educational and training programs. New trends in food choices will put a burden on any food control system since food safety information is often lacking. There is an increasing demand from consumers and certain advocates for wild food and natural products with no hormone or GM ingredients, organic products and fair trade food. The carbon footprint of a food is not always easily calculated and sometimes local food has a higher environmental impact than food produced at a distance. Sustainability, climate change and food shortages are other compounding factors which may force producers to consider drought-resistant GM crops and other strategies which may be in conflict with environmental friendly policies. The food safety impact of anticipated agricultural and food production shifts represents new challenges to producers and the oversight system. For most countries, food safety has only been a concern at the national level for a few decades, and with sharing of new information and the contribution of international expertise and financial resources globally, the disease burden should gradually be reduced. However, as our society changes its food habits, foodborne disease agents will appear in new guises to make us ill; we have not yet learned to be proactive in anticipating new problems.

**MESA REDONDA I**

**“RETOS ACTUALES DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA”**

Moderador: Dr. Gonzalo Zurera Cosano.  
Universidad de Córdoba

**“RISK ASSESSMENT IN THE CONTEXT OF INDUSTRIAL FOOD SAFETY MANAGEMENT”.**

PhD. John Bassett  
Unilever Research. Reino Unido

**“RECIENTES AVANCES SOBRE LOS MECANISMOS PATOGENICOS DE LISTERIA MONOCYTOGENES: DEL LABORATORIO A LA CLÍNICA”.**

Dr. José Antonio Vázquez Boland.  
Edimburg University. Escocia.

**“MICROSISTEMAS PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE PATÓGENOS”.**

Dr. Félix Amarita.  
AZTI-Tecnalia. Sukarrieta (Vizcaya).

## **MICROSISTEMAS PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE PATÓGENOS**

**Amárta F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Sistemas de Detección, Unidad de Investigación Alimentaria, AZTI-Tecnalia. Astondo Bidea – Edificio 609, 48160 Derio, Bizkaia, famarita@azti.es.*

Las crisis alimentarias acontecidas durante el último cuarto del siglo XX obligaron a replantear racionalmente el concepto de seguridad alimentaria. Desde entonces se han desarrollado políticas al respecto y se han creado Entes Reguladores responsables de su implantación. En Europa es la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) el ente encargado de evaluar los riesgos relativos a la seguridad de los alimentos destinados tanto a consumo humano como animal. La EFSA trabaja en estrecha relación con las autoridades nacionales competentes proporcionando consejo científico y avisos sobre riesgos presentes y emergentes. De esta manera la EFSA está íntimamente involucrada en el planteamiento de estrategias y decisiones base para elaborar sistemas y políticas de gestión de riesgos. La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es el homólogo nacional de la EFSA. Se trata de un Organismo Autónomo adscrito al Ministerio de Sanidad y Consumo, y cuya misión es, entre otras, garantizar la salud de los ciudadanos mediante la reducción de los riesgos sanitarios de origen alimentario, verificando la eficacia de los sistemas de control de alimentos. La AESAN ofrece información objetiva tanto a los consumidores como a los agentes económicos del sector agroalimentario español. Así, es su papel el favorecer la colaboración entre las distintas administraciones públicas y los sectores interesados, y actuar como centro de referencia nacional en la evaluación, gestión y comunicación de riesgos alimentarios.

Sin embargo un sistema de gestión de información adecuado necesita de la participación de todos los agentes implicados. Para que el sistema sea eficaz tanto los agentes económicos como los consumidores finales deben participar. Los productores de alimentos utilizan una serie de herramientas y procedimientos sistemáticos para el control de la producción (procedimientos de buenas prácticas de elaboración, análisis de peligros y puntos de control críticos...). La Unión Europea ha apostado por las nuevas tecnologías, y sobre ellas se están construyendo futuros desarrollos. Si algo tienen en común las nuevas tecnologías es que se basan, en gran medida, en procesos de comunicación e información utilizados para interrelacionar diversas áreas de actuación. La tendencia con respecto a estos procesos es que permitan realizar medidas más rápidas, con mayor densidad (en el tiempo y el espacio) y a costes económicos.

El Proyecto GoodFood “Food Safety and Quality Monitoring with Microsystems” es un Proyecto Integrado desarrollado en el VI Programa Marco de la Unión Europea, en el área temática de “Tecnologías de la Sociedad de la Información”. El fin último del proyecto ha sido mejorar la seguridad alimentaria mediante el empleo de micro y nanotecnologías, aplicadas en el diseño y desarrollo de equipos portátiles capaces de detectar toxinas, microorganismos patógenos y ciertos productos químicos en alimentos. La visión propuesta supone romper con la idea preconcebida de enviar los alimentos al laboratorio, el futuro pasa por acercar el laboratorio a los alimentos, con el fin último de analizar tanto la seguridad como la calidad de los alimentos directamente en la granja, durante el transporte o almacenamiento, en centros de procesado e incluso en el supermercado. El objetivo final es proporcionar tanto seguridad total como aseguramiento de la calidad a lo largo de toda la cadena en la industria agroalimentaria.

Los indicadores sobre seguridad agroalimentaria muestran un panorama en el que cada vez más, se requiere una aproximación multidisciplinar y universal basada en el empleo masivo de sistemas de detección simples con capacidad para ser empleados como herramientas de campo. Las tecnologías actuales proporcionan soluciones de laboratorio, pero son costosas tanto económica como temporalmente. El desarrollo de soluciones innovadoras basadas en micro y nanotecnologías, proporciona portabilidad, bajos costes y rapidez de respuesta, facilidad de uso y total interconexión con los dispositivos de almacenamiento de datos y toma de decisiones. Su adecuación al campo agroindustrial requiere una integración multidisciplinar del saber-hacer y la tecnología, integración que se ha buscado durante el desarrollo de GoodFood.

Durante la ejecución de GoodFood se desarrollaron sistemas para el control tanto de parámetros químicos como biológicos. En lo referente a los biológicos se trabajó en dos subproyectos enfocados a la detección de microorganismos patógenos: “Soluciones mediante tecnología de

microsistemas para la detección rápida de hongos toxigénicos y micotoxinas” y “Soluciones mediante tecnología de microsistemas para la detección rápida de patógenos alimentarios viables”. El primero tuvo por objetivo la determinación de aspergilos negros y ciertos penicilios productores de ocratoxinas y patulina, respectivamente, el último se centró en el diseño de sistemas para la determinación tanto de *Salmonella* spp. como de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y en pescado y derivados.

#### **Soluciones mediante tecnología de microsistemas para la detección rápida de hongos toxigénicos y micotoxinas**

Para alcanzar con éxito el objetivo fijado se trabajó desde un principio en la validación de nuevos sensores para la detección de hongos toxigénicos y de ciertas micotoxinas en uvas/vino y manzanas y sus zumos. De todos es sabido el efecto que sobre aspectos socio-económicos a nivel mundial tienen ciertos hongos productores de metabolitos secundarios tóxicos. Actualmente no existen sistemas comerciales basados en microtecnologías para la detección de hongos toxigénicos ni micotoxinas en alimentos. Los sistemas disponibles emplean procedimientos basados en amplificación de genes específicos para la detección de ciertos patógenos, así como sistemas de detección de micotoxinas basados en sistemas ELISA. Basándose en dichos sistemas se consideró idear sistemas basados en la generación de chips de DNA para la determinación de hongos y en la tecnología de nanoelectrodos para la determinación de sus micotoxinas en alimentos

Con objeto de abordar la detección de hongos en alimentos se procedió a desarrollar un sistema de extracción de ADN fúngico en alimentos. Se verificó que el mejor de los métodos posible combinaba un procedimiento de extracción y un procedimiento de limpieza empleando resinas de intercambio iónico. Paralelamente se diseñaron una serie de sondas específicas (a partir de genes implicados en la síntesis de micotoxinas) para diversos aspergilos negros y se inmovilizaron, utilizando un brazo espaciador, sobre un soporte adecuado mediante silanización. También se estandarizaron protocolos de PCR para la obtención de amplicones a partir de dichos genes implicados en la síntesis de micotoxinas. Cuando los amplicones se hibridan con sus sondas y el biochip en el que dichas sondas se encuentran inmovilizadas se somete a una diferencia de potencial, se produce una variación de la impedancia del sistema que es proporcional a la cantidad de ADN diana presente.

Por otra parte se abordó una solución óptico-gravimétrica mediante el empleo de una técnica de resonancia de plasmón de superficie, en la que una sonda oligonucleotídica adecuada se inmovilizó sobre una fina lámina de oro en la que se dispusieron moléculas de streptavidina. A continuación las sondas biotiniladas se unieron a la streptavidina, asegurándose así una ligazón fuerte y garantizando los requerimientos estéricos que permiten la posterior hibridación. Cuando dicha hibridación ocurre sobre el biochip creado, la lámina de oro sobre la que descansa el sistema se curva porque simplemente aumenta la masa del sistema (cuestión de no violar las leyes de la gravedad), observándose una desviación del ángulo con el que se refleja un haz de luz láser que sobre ella incide. Dicha variación resulta proporcional a la cantidad de ADN hibridado.

Ambos sistemas mostraron su utilidad. Se consiguió diseñar sistemas funcionales, con un tiempo de respuesta de 2h y 30 minutos respectivamente, reutilizables mediante la aplicación de simples procesos de lavado (1h y 30 min). Los biochips creados en cada caso tuvieron un coste económico (entre 1 y 10€), y aunque el primero requiere ser operado en condiciones especiales (aislamiento electromagnético), no se requiere especial entrenamiento para el manejo de los equipos de lectura.

No desarrollaremos aquí los sistemas diseñados para la detección de micotoxinas por ser biomoléculas y no microorganismos, si bien amplia información al respecto se puede encontrar en la página web del Proyecto: <http://www.goodfood-project.org>.

#### **Soluciones mediante tecnología de microsistemas para la detección rápida de patógenos alimentarios viables**

Desde un principio la Legislación Europea marcó las pautas de trabajo del proyecto. La Directiva 92/46/EC establece que cualquier método para la detección tanto de *Salmonella* spp. como de *Listeria monocytogenes* debe ser sensible a una unidad formadora de colonia en 25 g de producto. El límite fijado creó un cuello de botella en lo referente a los procedimientos abordables para diseñar protocolos de aplicación en cuanto a preparación de muestra y aislamiento de ADN. Los métodos más robustos actualmente para la detección de dichos microorganismos se basan en procedimientos PCR-ELISA y Real Time-PCR. En sus procedimientos se establece siempre un procedimiento de precultivo cuyo objetivo es aumentar la cantidad de biomasa y así de ADN para asegurar la detección

del microorganismo, los tiempos requeridos varían entre 10 y 12 h, en cualquier caso la analítica completa requiere entre 18 y 36 h.

Asumiendo la necesidad de realizar pre-enriquecimientos previos, se trabajó en la determinación de qué medios eran los más adecuados. No se descubrió nada nuevo al respecto: el mejor caldo para *Salmonella* fue el agua de peptona tamponada (APT), y para *Listeria monocytogenes* el caldo de enriquecimiento para *Listeria* (CEL). No obstante se hizo un estudio encaminado a averiguar en cuanto tiempo era posible obtener, a partir de 1-10 ufc/25 g de producto, la biomasa crítica necesaria para detectar mediante una reacción PCR la presencia de los patógenos objeto de estudio. Se comprobó que en 6h de pre-enriquecimiento en APT se obtenía suficiente cantidad de células como para detectar la presencia de *Salmonella* spp. en leche y queso (tipo camembert, de leche cruda y graso), requiriéndose 8h para su detección a partir de salmón ahumado. La detección de *Listeria monocytogenes* fue posible en salmón ahumado tras 15h de precultivo en CEL, y en leche entera tras 24h. La detección en queso tipo camembert no fue posible sino tras 24h de precultivo en CEL cuando la carga microbiana inicial fue de 50 ufc/25g. Los métodos clásicos de detección de *Listeria monocytogenes* no permitieron la detección de muy bajas concentraciones del patógeno en queso, posiblemente por la aparición de fenómenos de competencia ecológica de la flora habitual del producto. Previamente se prepararon los procedimientos adecuados de extracción de ADN, se diseñaron oligonucleótidos cebadores característicos de cada patógeno a partir de genes de letalidad y se optimizaron los protocolos de PCR.

Una vez establecidos los procedimientos necesarios para obtener ADN diana se trabajó en el diseño de los sistemas de detección electrónica. Se desarrollaron dos sistemas de microfluídica con detección impedimétrica integrada, con objeto de preparar sistemas para la estimación de los microorganismos mediante análisis por inyección de flujo. Por otra parte también se desarrolló un sistema para estimaciones discretas con detección mediante voltametría.

El primer punto crítico en el diseño de los diversos sensores fue el procedimiento para la inmovilización de las sondas de ADN en matrices sensóricas adecuadas. Se propusieron tres soluciones para la unión covalente de las sondas a las matrices, todas ellas resultaron presentar una gran estabilidad y reproducibilidad. Tanto el primer como el segundo procedimiento optaron por la silanización de una superficie de silicio y vidrio previamente activada para, mediante la inclusión de diversos brazos espaciadores, unir finalmente las sondas oligonucleotídicas. El tercer sistema utilizó un nuevo modelo de arquitectura molecular monocapa, en la que sobre una fina placa de oro se forma la monocapa activa mediante electro-deposición de tres monómeros cuya característica común es ser pirrol-derivados; el primero aporta un carácter hidrófilo a la capa de oro y la hace reactiva, el segundo actúa de brazo espaciador y agente de óxido/reducción, y el último es el portador de la sonda oligonucleotídica.

Por último se diseñaron las plataformas sensóricas y los sistemas para el desarrollo de los sensores operativos. El análisis de impedancia es una técnica que permite la caracterización de procesos mediante la medida de la respuesta de ciertos materiales cuando se exponen a una excitación eléctrica. La técnica se puede utilizar para caracterizar en tiempo real cambios en el estado físico-químico de un analito, en el caso que nos atañe, gracias a las propiedades dieléctricas del ADN, se puede observar una variación de impedancia entre la sonda oligonucleotídica (ADN monocatenario) y la misma sonda cuando se ha unido con su ADN complementario. La unión de los ADN diana a sus sondas induce cambios de las propiedades eléctricas en la vecindad de un electrodo. En un sensor de ADN impedimétrico se observan cambios de la impedancia del sistema, lo que provoca una señal eléctrica directamente relacionada con la afinidad de la unión. La concepción de sistemas sensóricos con microelectrodos permite el diseño y fabricación de múltiples electrodos en un mínimo espacio (el de un chip electrónico), con lo que la sensibilidad del sistema se ve mejorada. Una vez preparados los chips deben ser colocados en los sistemas de inyección de flujo. Estos sistemas no son más que circuitos que permiten, mediante el empleo de minibombas peristálticas, llevar la muestra con el ADN a analizar hasta el chip sensor. Si hay presencia de ADN diana hay hibridación con su sonda correspondiente, produciéndose una respuesta impedimétrica (aumenta la resistencia eléctrica del sistema). Se diseñó también un sistema para análisis discretos, mediante voltametría cíclica, en el que aplicando una diferencia de potencial en un sistema se observa cuál es la corriente eléctrica que se produce. El principio es similar al de los casos anteriores: ante una diferencia de potencial determinada, un agente de óxido-reducción (ferroceno) transluce una corriente eléctrica proporcional según el ADN sea monocatenario (sonda) o bicatenario (hibridación entre sonda y ADN complementario).

Los tres sistemas diseñados mostraron su capacidad para detectar ADN. El diseño de los electrodos se realizó únicamente para la detección de *Salmonella* spp., una vez vistos los problemas que la detección de *Listeria monocytogenes* podía presentar. De los tres sistemas el más sensible fue el basado en voltametría cíclica. Los tiempos de hibridación requeridos para tener una unión efectiva entre sondas y ADN también fueron analizados, en el caso de la detección por voltametría cíclica y en uno de los sistemas impedimétricos fue suficiente con 30 minutos. Se consideró que el menor tiempo de hibridación estuvo relacionado con la elección de brazos espaciadores adecuados y elaboración más adecuada de los soportes de los chips electrónicos. Los sistemas pudieron ser reutilizados múltiples veces para repetición de análisis, previo procesos de lavado, sin pérdida de capacidad de respuesta. La sensibilidad de los sistemas y la reproducibilidad de las respuestas utilizando los mismos chips fueron excelentes. Sin embargo se observó que la reproducibilidad de las respuestas empleando chips de diferentes lotes de fabricación no era adecuada. Aun se requiere trabajar en el desarrollo de procesos para la fabricación de chips que presenten características técnicas uniformes.

El proyecto integrado "GoodFood" comenzó en enero de 2004, con una duración de 42 meses, su objetivo fue desarrollar una nueva generación de herramientas analíticas para el control de la seguridad y la calidad de ciertas cadenas alimentarias (leche y derivados, frutas y zumos, incluido el vino, y pescado y derivados). En lo que respecta a la detección de patógenos, el principal problema encontrado fue no poder diseñar sistemas realmente portátiles, de aplicación directa "in situ", debido a la necesidad de realizar precultivos necesarios para obtener una cantidad de biomasa crítica detectable mediante diversas técnicas. El obstáculo se salvó ofreciendo sistemas de análisis novedosos, miniaturizados, y que permitieron obtener resultados en tiempos significativamente más cortos que los que nos proponen las técnicas comerciales actuales. GoodFood fue un verdadero trabajo interdisciplinar en el que la estrecha colaboración de los participantes hizo posible que profesionales tan dispares como ingenieros de telecomunicaciones y electrónicos, químicos y biólogos pudieran compartir una idea y llevarla, en la medida de lo posible, a cabo.

**MESA REDONDA II**

**“INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO”.**

Moderador: Dr. Juan A. Ordóñez Pereda.  
Universidad Complutense. Madrid

**“ALIMENTACIÓN Y SALUD EN EUROPA: DE LA SEGURIDAD A LA EFICACIA”.**

Dr. Andre Palou.  
Universidad de las Islas Baleares.

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO POR TÉCNICAS DE PCR A TIEMPO REAL”.**

Dr. Francisco Chavarri.  
Eppendorf Ibérica. Madrid.

**“I+D+i EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: ATRACTIVO O ESTRATEGIA”.**

Dr. Julio Tapiador.  
Divisa Ibérica Plus, S.L, Toledo.

**TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO POR LA TÉCNICA DE PCR A TIEMPO REAL Y  
PERSPECTIVAS DE USO  
Dr. Francisco J. Chavarri.**

*Consejero Delegado de Eppendorf Ibérica. Avda. Tenerife 2; 28703 San Sebastián de los Reyes, Madrid*

La creciente globalización que afecta también a la producción y comercio de los alimentos, la existencia de un marco regulatorio muy estricto y una elevada presión en la reducción de costes y tiempo, son los parámetros que hoy en día están determinando el desarrollo, la investigación y los procesos de producción en la Industria Agroalimentaria.

Tampoco podemos olvidar que en un pasado reciente la Industria Alimentaria se ha convertido en repetidas ocasiones en un foco de atención pública, por los negativos titulares sobre escándalos acerca de infecciones por *Salmonella* u otros microorganismos contaminantes, patógenos o saprofitos, introducción de especies genéticamente modificadas, presencia de sustancias nocivas para la salud o comercio de especies no identificadas correctamente, por poner algunos ejemplos. La distribución de agua de consumo humano, también ha presentado conocidos problemas higiénico-sanitarios derivados de la presencia de *Legionella* con sus problemas derivados. Sin embargo, a pesar de estos casos aislados, se debe reconocer que la seguridad del consumidor es de máxima prioridad para los fabricantes y distribuidores de la industria, así como entre los organismos públicos encargados de llevar a cabo el control sanitario y de calidad.

Todas estas circunstancias determinan que aquellos servicios públicos o laboratorios de servicio, responsables de analizar y controlar los alimentos y aguas de consumo humano en diferentes países se enfrenten cada día a nuevos desafíos. Aunque los métodos clásicos basados fundamentalmente en técnicas microbiológicas están bien establecidos, estos procedimientos requieren por lo general de largos períodos de tiempo, que pueden retrasar la liberación de productos al mercado para su consumo dando lugar a tiempos de almacenamiento prolongados y tiempos de entrega elevados, conllevando pérdidas económicas importantes. Por esta razón, los métodos de análisis rápidos y reproducibles son de gran interés para los fabricantes y laboratorios de control microbiológico. Es por ello por lo que las nuevas tecnologías moleculares basadas en ADN están cada vez más presentes en el control y análisis en la industria agroalimentaria y en los laboratorios y mecanismos de control de dicha industria, por las evidentes ventajas que presentan.

Por la creciente importancia que las técnicas moleculares están teniendo en esta industria y en los laboratorios que la dan servicio, cada vez hay más empresas privadas, fundaciones o "spin off" dedicadas a la investigación en este sector, para así ofrecer equipos y reactivos rápidos y reproducibles que garanticen resultados fiables y sensibles en el análisis de la calidad higiénico-sanitaria de alimentos y bebidas, tanto para detectar patógenos u otros contaminantes que perjudiquen a la calidad organoléptica del producto acabado como para identificar especies o cuantificar la presencia de organismos genéticamente modificados.

Los métodos basados en análisis de ADN proporcionan por ejemplo, una detección rápida y sensible de pequeñas cantidades de organismos genéticamente modificados (GMOs), análisis de diferentes patógenos en un tiempo reducido o identificación de sustancias alergénicas presentes en algunos componentes alimenticios.

Una de las herramientas o técnicas más utilizadas recientemente y que han tenido una gran aceptación en el mundo de la investigación, la industria, y el análisis clínico, debido a que es una técnica muy rápida, sensible y reproducible, es la PCR Cuantitativa o PCR a tiempo real.

El desarrollo de nuevos instrumentos que permiten la monitorización de la fluorescencia en cada uno de los pocillos de las placas de PCR, ha significado un gran avance. Los análisis por PCR a tiempo real pueden ser completados de forma rápida y no requieren tratamiento posterior.

La PCR a tiempo real es una tecnología que ha permitido además un gran avance con respecto a las técnicas de Microbiología tradicional en el análisis de alimentos y bebidas, tal es así que en tan solo un par de horas es posible detectar por PCR a tiempo real lo que por Microbiología

tradicional nos llevaría varios días. El rango de aplicaciones de esta tecnología en el análisis de alimentos va desde la detección y cuantificación de patógenos u organismos saprofitos, componentes alergénicos, diferenciación de especies o presencia y cuantificación de GMOs.

Desde la aparición de los primeros equipos en los años 90 hasta el día de hoy, han ido surgiendo numerosos avances tales como velocidades más altas, mayor número de muestras, flexibilidad, sistemas de detección mejorados y software de tratamiento de datos de fácil manejo.

La ventaja de la técnica de PCR a tiempo real aplicada al análisis de alimentos es fundamentalmente para ofrecer una mayor seguridad en esta industria, por ejemplo detectando la contaminación en el proceso de producción más temprano, por lo que las fechas de caducidad de los alimentos pueden ser alargadas y el lanzamiento de lotes de productos se acelera reduciendo los costes y tiempos de almacenamiento.

En la ponencia se discutirán las diferentes posibilidades de uso de las nuevas técnicas aplicadas al control de la calidad microbiológica de los alimentos así como posibilidades en el futuro.

**MESA REDONDA III**

**“MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA. MICROORGANISMOS ALTERANTES Y DESEABLES”.**

Moderador: Dr. Rafael Jordano Salinas.  
Universidad de Córdoba.

**“PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS VEGETALES FERMENTADOS”.**

Dr. Rufino Jiménez Díaz.  
Instituto de la Grasa y Derivados. CSIC. Sevilla

**“CONTROL DE MICROORGANISMOS ALTERANTES EN ALIMENTOS MADURADOS”.**

Dr. Juan José Córdoba Ramos.  
Universidad de Extremadura. Cáceres.

**“NORMALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. PRESENTE Y FUTURO”.**

Dr. David Tomás.  
AINIA. Valencia.

**“INTEGRACIÓN DE MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA ACREDITADOS”.**

Dra. Pilar Lara López.  
Applied Biosystems. Madrid.

PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA PRODUCCIÓN DE VEGETALES FERMENTADOS

**J.L. RUIZ BARBA y R. JIMÉNEZ DÍAZ**

Dpto. de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda. Padre García Tejero, 4, Aptdo. 1078, 41012 Sevilla. [jlruiz@cica.es](mailto:jlruiz@cica.es), [rjimenez@cica.es](mailto:rjimenez@cica.es)

Las fermentaciones de vegetales son procesos tradicionales y meramente empíricos en los que la materia prima se manipula de forma que se favorezca el desarrollo de bacterias lácticas y levaduras, principalmente. En el caso de la fermentación de aceitunas, ambos grupos de microorganismos coexisten desde los primeros días de la puesta en salmuera de los frutos hasta el final del proceso. La población de bacterias lácticas que se desarrolla en estas salmueras es muy heterogénea, siendo la especie *Lactobacillus pentosus* particularmente predominante en tiempo y número sobre otros géneros tales como *Pediococcus*, *Enterococcus*, etc. *Lactobacillus pentosus* metaboliza los azúcares que contiene el fruto produciendo ácido láctico, lo que hace bajar el pH del medio, contribuyendo de esta forma a la conservación del producto final. Las levaduras, por su parte, serían responsables de la mayor parte de las características organolépticas del fruto procesado. El éxito o el fracaso de este procedimiento, aparentemente sencillo, dependen de que ambas poblaciones se desarrollen en proporciones determinadas en las salmueras de fermentación. De otra forma, lo más probable es que se produzca una alteración del producto final más o menos importante, con las consabidas pérdidas económicas a que ello da lugar.

En los productos vegetales fermentados, las alteraciones más frecuentes se pueden producir a todo lo largo del proceso fermentativo y suelen consistir en la formación de huecos internos (denominado genéricamente alambrado), debido aparentemente al CO<sub>2</sub> y/o H<sub>2</sub> que desprenden las enterobacterias, las bacterias Gram + esporuladas (*Bacillus* y *Clostridium*) y las levaduras, el ablandamiento debido a las pectinasas presumiblemente procedentes de mohos levaduras y otros, y malos olores y sabores producidos por ácidos tales como butírico, caprílico, caproico y propiónico, propios del metabolismo de los géneros *Clostridium* y *Propionibacterium*. De todas las alteraciones descritas, el alambrado es quizá la que más pérdidas económicas provoca actualmente ya que la introducción de los fermentadores de fibra de vidrio a mediados de los años 70 y las medidas de asepsia que se adoptan están contribuyendo a erradicar casi por completo los otros tipos de alteración.

La formación de alambrado en la aceituna se supone que tiene su génesis en el desarrollo en las salmueras de fermentación de bacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Clostridium* y, en menor medida, a ciertos tipos de levaduras. Sin embargo, estos resultados se generaron utilizando cultivos puros de estos microorganismos inoculados a dosis muy altas por lo que no tuvieron oportunidad de desarrollarse las bacterias lácticas y las levaduras, características de este tipo de fermentaciones. No obstante, el uso de cultivos iniciadores de *Lactobacillus pentosus* en fermentaciones a nivel industrial ha contribuido en gran medida a impedir este tipo de alteración. La selección de cepas de *Lactobacillus pentosus* altamente competitivas –productoras de bacteriocinas, prototofas a vitaminas del grupo B y muy eficientes en la producción de ácido láctico, por ejemplo- ha resultado ser un arma muy eficaz en la prevención de las seculares alteraciones que se producían en la elaboración de la aceituna de mesa.

Como se ha mencionado anteriormente, el microorganismo responsable de la fermentación de aceitunas pertenece a la especie *L. pentosus*. No obstante, sin el concurso de otras poblaciones microbianas que se desarrollan a lo largo del proceso fermentativo la implantación y desarrollo de esta especie en los fermentadores no sería un proceso fácil. De hecho, las fábricas de procesado de aceituna de mesa de nueva creación necesitan utilizar inóculos comerciales que garanticen una buena fermentación al menos el primer año en que se procesan aceitunas en la planta. Una de estas poblaciones que facilita el desarrollo de *L. pentosus* en las salmueras es la formada por levaduras. Se sabía desde hace más de 50 años (cuando se estableció la secuencia microbiana de la fermentación) que para obtener un producto final adecuado era necesario que en las salmueras se desarrollaran a la vez una población de bacterias lácticas, principalmente lactobacilos, y otra de levaduras. No fue hasta mediados de los 90 del siglo pasado cuando se pudo establecer claramente una relación entre ambas poblaciones, que iba más allá de compartir un mismo nicho ecológico. *Lactobacillus pentosus* es una especie auxotrofa para los 20 aminoácidos esenciales y, salvo raras excepciones, para todas

las vitaminas del grupo B. Las aceitunas no son precisamente un reservorio de este tipo de vitaminas y sin embargo los lactobacilos se desarrollan sin mayor problema en las salmueras de fermentación. Cuando se estimaron por métodos microbiológicos las concentraciones de vitaminas del grupo B en fermentadores elaborados a nivel semiindustrial se pudo comprobar que la concentración de éstas en salmuera era varios órdenes de magnitud mayor que el mínimo necesario para que los lactobacilos se desarrollaran a su máxima tasa de crecimiento. Dichos niveles mínimos se superaban a los pocos días de colocar las aceitunas en salmuera. Cuando se estudió la producción de dichas vitaminas por diferentes especies de levaduras aisladas a lo largo de ese proceso fermentativo se pudo comprobar que la mayoría de ellas las producían y, además, en concentraciones muy elevadas.

Además de las levaduras, parece que otras bacterias lácticas cuya importancia en el proceso fermentativo se había descrito como menor e incluso nula, pueden desempeñar un papel crucial para la implantación de *L. pentosus* en los fermentadores. Al inicio de la fermentación y durante un breve periodo de tiempo se pueden aislar bacterias lácticas pertenecientes al género *Pediococcus* de las salmueras de fermentación. El papel que se le ha atribuido a esta bacteria es únicamente el de producir pequeñas cantidades de ácido láctico que bajarían el pH de las salmueras, lo que facilitaría que las cepas naturales de *L. pentosus* se implantaran. Sin embargo, estudios recientes podrían conceder a los pediococos un papel mucho más relevante: formarían biofilms en las paredes de los fermentadores que favorecerían la implantación de los lactobacilos. Cuando se estudió la capacidad de adherencia a placas de poliestireno de cepas de *L. pentosus* aisladas de salmueras de fermentación de aceitunas se pudo comprobar que, a menos que previamente se hubiera cultivado en ellas una cepa de pediococo, la adherencia a las mismas por parte de los lactobacilos era prácticamente nula. No obstante, cuando las cepas de lactobacilos se cultivaron consecutivamente en las placas de poliestireno, a medida que aumentaba el número de inoculaciones aumentaba su capacidad de adherencia. Sin embargo, dicha adherencia era siempre significativamente menor que si se hubiera incubado previamente *Pediococcus* en ellas. Además, dependiendo de la cepa de pediococo utilizada había también diferencias en la adherencia de las cepas de *L. pentosus*, lo que demostraba que ciertas cepas de *Pediococcus* serían más efectivas que otras para facilitar la posterior formación de biofilms por parte de los lactobacilos.

Por otro lado, la capacidad de anclaje de las cepas de *L. pentosus* no parece estar ligada a la capacidad de producir bacteriocinas ya que diferentes cepas que producen el mismo tipo de bacteriocina presentan diferentes rangos de adherencia. Sin embargo, cuando se comparan las capacidades de formación de biofilms de una cepa productora de bacteriocina y de su cepa isogénica, no productora de bacteriocina, existe una gran diferencia entre ellas, siendo la cepa isogénica la que presenta menor capacidad de anclaje. Tampoco parece haber correlación entre capacidad de adherencia y producción de polisacárido extracelular ya que cepas productoras de dicho polisacárido presentan escasa o nula capacidad de formación de biofilms. Finalmente, al contrario de lo que ocurre con las placas de poliestireno, cuando se utilizaron materiales de los que están hechos los fermentadores industriales para estudiar la capacidad de formación de biofilms por las cepas de *L. pentosus* se pudo comprobar que dicha capacidad era muy superior a la que mostraban cuando se utilizaban placas de aquél material. Estos resultados podrían explicar el hecho de que ciertas cepas tengan mayor capacidad de colonización de las salmueras de fermentación y que sea posible aislar las mismas cepas en fermentadores de una misma industria en años consecutivos. Probablemente, el concurso de otras bacterias como los pediococos que facilitarían la formación de biofilms a las cepas de lactobacilos, el propio potencial de adherencia de éstas y su capacidad para producir bacteriocinas serían factores cruciales en la colonización de las salmueras de fermentación, dotando así a esas cepas de una gran ventaja competitiva frente a otras poblaciones de su misma especie que colonizan el mismo nicho ecológico. De hecho, la aplicación de ciertas herramientas moleculares (RAPD, PCR y perfiles plasmídicos) han demostrado que la población de *L. pentosus* en un fermentador no es homogénea, tratándose de subpoblaciones (cepas) que se van sucediendo en el tiempo.

Facilitar a las cepas autóctonas de *L. pentosus* la posibilidad de anclarse al sustrato podría no ser el único efecto beneficioso que reportarían a los lactobacilos otras bacterias de su entorno. Pueden existir otros efectos derivados de la señalización célula-célula y que hasta el momento no se han estudiado en profundidad en los microorganismos que colonizan las salmueras de fermentación de vegetales. En concreto, los derivados del fenómeno denominado *quorum sensing*. El término *quorum sensing* define el conjunto de mecanismos moleculares que emplea una bacteria para detectar su propia densidad celular y tiene como resultado un cambio en la expresión génica en respuesta a fluctuaciones en la densidad de la población. Ello implica la producción y secreción de moléculas de señalización conocidas con el nombre de autoinductores o feromonas. Existe un caso

muy particular de este fenómeno, detectado en la cepa *Lactobacillus plantarum* NC8. Dicha cepa, que fue aislada de una fermentación de ensilados, responde a un estímulo producido por determinadas bacterias que se encuentran en su entorno produciendo tres bacteriocinas de doble péptido. Además, produce un factor de autoinducción que sirve como señal para que el resto de la población produzca esas bacteriocinas y, a la vez, el denominado factor de autoinducción. Aunque no se puede considerar como un fenómeno de *quorum sensing* en sentido estricto este tipo de respuesta a una interacción entre poblaciones es muy posible que se de en las salmueras de fermentación, conduciendo así a la hegemonía de aquella población dotada de éste carácter. De hecho, cuando se inocula sólo *L. plantarum* NC8, su viabilidad disminuye drásticamente y a los pocos días desaparece de la fermentación mientras que si se inocula junto con otras cepas que inducen la producción de bacteriocinas, no sólo sobrevive más tiempo si no que su número aumenta considerablemente a los pocos días de la inoculación. Un caso parecido a éste es el descrito para la cepa *L. pentosus* LPCO10. Si bien ésta produce plantaricina S de manera constitutiva, al menos en cultivos mixtos de laboratorio se ha podido observar que la producción de dicha bacteriocina, así como la densidad celular, aumenta de forma considerable respecto a la que se produce en un cultivo puro de la cepa LPCO10. Además, su producción aumenta en respuesta a un repunte en el crecimiento de la cepa cocultivada, que es sensible a la acción de plantaricina S, lo que parece indicar que existe algún mecanismo parecido al descrito en *L. plantarum* NC8 que modula la producción de bacteriocina en función de la presencia o ausencia de otros microorganismos. De hecho, cuando se utiliza *L. pentosus* LPCO10 como cultivo iniciador, aunque hay un descenso drástico de la viabilidad probablemente debido a la presencia de polifenoles en las salmueras de fermentación, acaba por desarrollarse e imponerse a las diferentes subpoblaciones de bacterias lácticas, pudiéndose detectar bacteriocina en dichas salmueras. Aunque es evidente que se necesitan más estudios de tipo proteómica y genómica, estos resultados apuntan hacia la posibilidad de que la interacción entre poblaciones favorezca la implantación de ciertas bacterias, probablemente mediante la expresión de una batería de genes entre los cuáles se encontrarían los que codifican para la producción de bacteriocinas.

Otro fenómeno que ilustra la interacción entre poblaciones que se desarrollan en una fermentación y que probablemente tenga repercusión en el proceso es el denominado *quorum quenching*. Se define así la interferencia en la señalización célula-célula que impide el *quorum sensing*. Dicha interferencia puede ser debida a múltiples causas. Entre las descritas hasta el momento, la producción por parte de una población microbiana de un enzima que degrada una molécula de señalización específica de otra población diferente, o simplemente la producción de una molécula análoga a la molécula señalizadora, que actuaría de forma parecida a como lo hace un inhibidor de tipo competitivo, impidiendo así que la verdadera molécula de señalización interaccionara con su receptor y, por tanto, desencadenara la secuencia de eventos adecuada. Este fenómeno se ha puesto de manifiesto en cepas de bacterias lácticas aisladas de fermentaciones naturales y la consecuencia del mismo es una reducción considerable en la producción de bacteriocinas en determinadas cepas debido a su interacción con otras. Dicha interferencia se produce cuando las cepas se cultivan juntas en el mismo tubo de ensayo, se separan por un filtro de 0,22 µm de poro e bien se separan por medio de una membrana de diálisis. Hay que señalar que este efecto de disminución de la producción de bacteriocinas no se debe a una menor tasa de crecimiento de la bacteria afectada ni a un menor número de células. Hasta el momento se desconoce de qué tipo de molécula se trata pero aparentemente es de naturaleza protéica. Dicha sustancia está presente en los sobrenadantes libres de células de los correspondientes cocultivos ya que el efecto que se observa después de su adición a un cultivo de una bacteria productora de bacteriocina es el de disminución de dicha producción aunque dicho efecto no es tan ostensible como el que se produce en cocultivo. Este fenómeno de *quorum quenching* se ha detectado en 6 de las 84 de las cepas de bacterias lácticas ensayadas (7,1%). De estas 6 cepas, cinco pertenecían a la especie *L. pentosus* y una, a *Enterococcus faecium* y todas ellas fueron aisladas de fermentaciones de aceitunas, siendo productoras de bacteriocinas 4 de ellas (3 *L. pentosus* y *E. faecium*). Aunque el efecto que observamos en este tipo de interacción entre poblaciones es el de la disminución de la producción de bacteriocinas es muy posible que se produzcan otros cambios en la fisiología de las bacterias que sería conveniente determinar.

Puesto que se producen interacciones y comunicaciones entre las diferentes poblaciones de microorganismos que pueblan las salmueras de fermentación de vegetales, es evidente que la composición de la comunidad microbiana condiciona algunos rasgos fenotípicos de los individuos como los que describen más arriba. Por ello sería deseable realizar estudios de genética y

proteómica en bacterias procedentes de fermentaciones de alimentos encaminados a comprender mejor las señales célula-célula y el funcionamiento coordinado de esas poblaciones ya que el comportamiento bacteriano es la consecuencia de interacciones muy complejas.

**CONTROL DE MICROORGANISMOS ALTERANTES EN ALIMENTOS MADURADOS**

Elena Rodas, Mar Rodríguez, María del Mar García, Eva Casado, María Jesús Andrade y Juan J. Córdoba

Higiene y Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad s/n. 10071-Cáceres.

E-mail: [jcordoba@unex.es](mailto:jcordoba@unex.es)

### **1.- Introducción**

En la elaboración de alimentos madurados del tipo de jamón curado, embutidos crudos madurados o queso madurado la tendencia de los últimos años es reducir el contenido de sal por motivos de salud del consumidor. Esto provoca que en determinadas fases del proceso de elaboración los productos tengan valores de actividad del agua superiores a los que deberían tener de acuerdo con la temperatura de procesado, produciéndose en ocasiones el desarrollo de microorganismos que provocan alteración. Así se ha descrito el desarrollo de microorganismos alterantes en productos madurados como jamón curado (García y col., 2000; Martín y col., 2008), embutidos crudos madurados (Talon y col., 2007; Lebert y col. 2007) y quesos madurados (Le Bourhis y col., 2007). Una de las alteraciones más frecuente relacionadas con el desarrollo de microorganismos alterantes durante el proceso de elaboración es la putrefacción profunda descrita en jamón curado y en algunos tipos de embutidos crudos-madurados (Marín y col., 1996; Blanco y col., 1997; García y col., 2000) Entre los microorganismos más frecuentemente relacionados con este tipo de alteración se encuentran enterobacterias de las especies *Serratia* sp. y *Proteus* sp., (Losantos y col., 2007; García y col., 2000) si bien también se han encontrados otros microorganismos tales como *Enterococcus* sp, *Brochothrix thermosphacta* y bacterias Gram negativas no entéricas (Martín y col., 2008). El control de los microorganismos alterantes en alimentos madurados requiere conocer como afectan las condiciones del producto durante el proceso de elaboración al desarrollo de este tipo de microorganismos. En este sentido, el objetivo de este trabajo es evaluar el desarrollo de los microorganismos alterantes en las condiciones de contenido de sal, pH, actividad del agua y temperatura usuales durante el proceso de elaboración de alimentos madurados, especialmente en la fase de estabilización de estos productos. Aunque el presente trabajo se ha desarrollado en jamón curado, se pretende que los parámetros de control de microorganismos alterantes puedan ser de utilidad para otros productos madurados.

### **2.- Material y Métodos**

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado cepas de microorganismos alterantes *Serratia liquefaciens*, *Enterococcus gallinarum*, *E. hiriae* y *Brochothrix thermosphacta*, aislados de productos cárnicos con putrefacción profunda.

Se ha evaluado en primer lugar el desarrollo de estos microorganismos en un sistema modelo consistente en un medio de cultivo con características similares a las que pueden encontrar en jamón curado durante la fase de estabilización (salado y post-salado). Se han inoculado los anteriores microorganismos a niveles de  $10^5$  ufc/ml en extracto de carne con pH similar al pernil (pH 6) y diferentes valores de actividad del agua (0,97, 0,95, 0,93) usuales en las fases de salado y post-salado. Los medios inoculado se han cultivado a diferentes temperaturas (4 y 7 °C) usadas en el proceso de elaboración de jamón curado. Se ha evaluado el desarrollo microbiano cada 4 días durante 45 días en agar PCA, agar VRBG y en agar Brewer en anaerobiosis.

Por otro lado, las cepas anteriormente mencionadas se han inoculado  $2,5 \cdot 10^4$  ufc/g en pernils al inicio de post-salado, evaluándose su desarrollo al final de esta etapa. El post-salado se desarrolló en condiciones habituales, inicialmente a temperatura inferior a 5°C con posterior incremento a final del mismo hasta 8°C. La toma de muestra de los pernils se realizó tras la esterilización de la superficie de los mismos mediante flameado. Seguidamente se tomó muestra de profundidad en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Se han realizado recuentos en agar PCA de mesófilos y psicrotrofos, agar VRBG y agar Brewer en anaerobiosis. Se tomó muestras para análisis de actividad del agua y del contenido en cloruros.

### **3.- Resultados y discusión**

*S. liquefaciens*, se desarrolló en extracto de carne hasta niveles superiores a  $10^6$  ufc/ml a temperatura de incubación de 4 y 7°C y actividad del agua superior a 0,94 (Figura 1A y B). Sin

embargo a  $a_w$  de 0,93 sólo hubo desarrollo a temperatura de 7°C, manteniéndose en los niveles de inoculación cuando la temperatura de incubación fue de 4°C. *B. termophasta*, *E. gallinarum* y *E. hiriae* mostraron en extracto de carne comportamientos similares a *S. liquefaciens*, aunque siempre alcanzando niveles ligeramente inferiores a esta última bacteria. De estos resultados se deduce que la combinación de actividad del agua 0,93 y temperatura 4°C permite controlar el desarrollo de estos microorganismos alterantes. En el proceso de elaboración de jamón curado la temperatura se mantiene entre 3-5°C durante las fases de salado y post-salado (establización de la pieza) (Ventanas y col., 2001). En las fases posteriores del procesado de este tipo de producto se incrementa la temperatura hasta valores que pueden alcanzar 20-25°C. El peligro de alteración de la pieza debido al desarrollo de los microorganismos alterantes ensayados se produce cuando se eleva la temperatura de procesado antes de que la actividad del agua del producto haya descendido hasta valores próximos a 0,93. Si bien este descenso ocurre en la parte más superficial de la pieza, en la parte interna no se consigue bajar la actividad del agua a estos valores hasta que los pernils están en la fase de secadero a temperaturas que favorecen el desarrollo de los microorganismos alterantes.

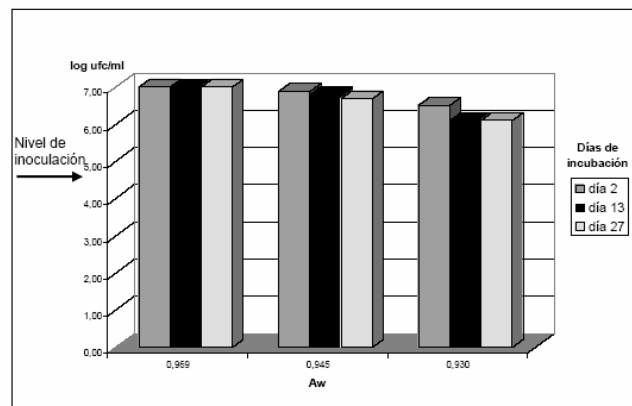
Cuando se inoculó en los pernils la mezcla de microorganismos alterantes, se observó al final del post-salado y en profundidad niveles de estos microorganismos superiores a  $10^7$  ufc/g, que pueden considerarse como niveles de producto cárnico alterado (Lebert y col., 2007). Probablemente el desarrollo más importante tuvo lugar al final del post-salado a temperatura de 8°C, cuando aún la actividad del agua en el interior era superior a 0,95, dado que son microorganismos psicrotrofos (Losantos y col., 2000) Estos resultados prueban que los microorganismos alterantes son capaces de desarrollarse en el interior del pernil si no existe la combinación temperatura y actividad del agua que impida su proliferación. Es necesario mantener la temperatura de post-salado a valores inferiores a 4°C hasta que se consiga disminuir la actividad del agua en el interior del producto hasta valores iguales o inferiores a 0,93.

#### **4.- Conclusión**

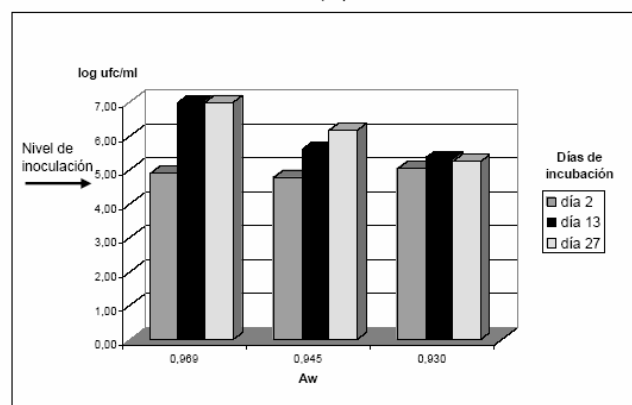
En este trabajo se demuestra como microorganismos aislados de productos cárnicos alterados se desarrollan en las condiciones de elaboración de estos productos hasta alcanzar niveles de alteración. Así mismo se obtienen combinaciones de temperatura y actividad del agua que limitan su proliferación y que pueden utilizarse para controlar el desarrollo de este tipo de microorganismos en estos y otros productos madurados.

5.- Bibliografía

- Blanco, D., Ariño, A., Conchillo, P., Perez, C., Yangüela, J., Herrera, A. 1997. Physico-chemical characterization of "bone taint" in Spanish dry-cured hams. *Journal of Food Protection*, 60, 667-672.
- García, C., Martín, A., Timón, M.L. y Córdoba J.J. 2000. Microbial populations and volatile compounds in the bone taint spoilage of dry cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 61-66.
- Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J.F., Bover-Cid, S., Vidal-carou, M.C. y Talon, R. 2007. Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, 76, 112-122.
- Le Bourhis, A., Doré, J., Carlier, J., Chamba, J., Popoff, M. Y Tholozan, J. 2007. Contribution of *C. Beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology* 113, 154-163.
- Losantos, A., Sanabria, C., Cornejo, I. y Carrascosa, A.V. 2000. Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated from spoiled dry-cured hams. *Food Microbiology*, 2000, 17, 505-512.
- Marín, M.E., Carrascosa, A.V. y Cornejo, I. 1996. Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated during industrial processing of dry-cured hams. *Food Microbiology*, 13, 375-381.
- Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Perez, F., Córdoba, J.J. y Córdoba, M.G. 2008. Characterization of microbial deep spoilage in Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 78, 475-484.
- Talon, R., Leroy, S. y Lebert, I. 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77, 55-62.
- Ventanas, J., Ruiz, J. y Córdoba, J.J. 2001. El jamón curado de cerdo ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. En: *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*. Volumen II. Ed. Martín & Macías. Pp.1221-1245.



(A)



(B)

Figura 1. Desarrollo de *Serratia liquefaciens* en extracto de carne a diferentes valores de actividad del agua y temperatura 7°C (A) y 4°C (B).

## **NORMALIZACIÓN EN MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS. PRESENTE Y FUTURO**

**Tomás Fornés D.**

*Dpto. de bioensayos. ainia centro tecnológico. Parque Tecnológico de Valencia. C/Benjamin Franklin 5-11 46980 Paterna. Valencia, [dtomas@ainia.es](mailto:dtomas@ainia.es)*

### **Introducción**

El empleo de métodos normalizados en los laboratorios de microbiología de alimentos es una herramienta mediante la cual los laboratorios de análisis pueden disponer de métodos de ensayo reconocidos internacionalmente y que contribuye a la comparación de resultados, así como obtener un resultado fiable que garantice la calidad y seguridad de los alimentos sometidos a control.

Es por ello que es cada vez más frecuente que dichas normas sean tomadas como referencia tanto por organismos de acreditación (ENAC) como para establecer determinados criterios microbiológicos (Reglamentos UE 2073/2005 y 1441/2007) donde se contemplan como **métodos de referencia** las normas internacionales "ISO".

Fruto de esta necesidad de armonización existen diferentes Organismos y Comités que tienen un ámbito de actuación global como en el caso de ISO o bien son de aplicación en un ámbito geográfico determinado como en el caso de CEN (en Europa), AOAC (de mayor implantación en EEUU) o NMKL (para los países nórdicos). También en la mayoría de países existe un organismo nacional de normalización como AENOR en el caso de España o AFNOR en Francia, cuyas normas de rutina han sido muy utilizadas hasta el momento, por los laboratorios de análisis microbiológicos.

El desarrollo de métodos de ensayo por parte de estos organismos de normalización requiere de la colaboración de todos los agentes implicados (científicos, laboratorios de control, empresas comerciales...) que pueden y, en cierta medida, deben aportar su experiencia al objeto de optimizar dichas normas. En este cometido la Comisión de Normalización y Validación de la SEM puede jugar un papel clave en el desarrollo de estos métodos.

### **Desarrollo y revisión de Normas.**

El desarrollo de la mayoría de Normas internacionales en microbiología de alimentos corre a cargo de ISO (Organización Internacional de Normalización). Dentro de ISO existen diversos comités técnicos que contemplan sectores tan diversos como la automoción, telecomunicaciones, química... y dentro de cada uno de estos sectores existen a su vez subcomités. Así pues, el Comité Técnico de alimentos (ISO/TC 34) integra el Subcomité de microbiología (SC 9) del que forman parte más de 30 países de los cinco continentes.

Ya en el ámbito Europeo, el organismo normalizador es el CEN (Comité Europeo de Normalización), de estructura similar a la de ISO, estando el desarrollo de normas microbiológicas integradas en el CEN/TC 275 WG 6 constituido por los 27 pertenecientes a la Unión Europea además de Islandia, Noruega y Suiza, los cuales están obligados a adoptar las normas europeas como normas nacionales sin modificaciones, al contrario que en ISO cuyo ámbito de aplicación es voluntario.

En España, el organismo responsable del desarrollo de normas es AENOR (Asociación Española de Normalización). Dentro de su división de Normalización, las actividades relacionadas con la microbiología de alimentos se encuentran en el Subcomité AEN/CTN 34/SC 4/GT6.

En el **desarrollo de una nueva norma** supone un largo **proceso de aprobación** que puede resumirse en los siguientes pasos:

En primer lugar, debe justificarse la **necesidad de la misma** (bien por una demanda de un determinado sector industrial, las administraciones públicas, organizaciones internacionales...) así como la **ausencia de Normas con el mismo alcance** ya publicadas que puedan cubrir dicha demanda.

En caso de que se considere necesario el desarrollo de la misma se crean **grupos de trabajo** específicos para la preparación de la misma, requiriéndose al menos la participación activa en dicho grupo de 5 países miembros. En estos grupos se participa de forma voluntaria y generalmente a través de la acreditación por parte los respectivos Organismos Nacionales de Normalización, estando formados generalmente por **laboratorios de referencia** de la UE (según el caso) así como **universidades, centros de investigación, laboratorios microbiológicos así como empresas privadas y compañías de desarrollo de métodos** con experiencia en el campo a evaluar.

Las normas se elaboran tomando en consideración la **literatura científica** disponible, así como la **experiencia de los miembros** del grupo y los comentarios de todos los miembros de los Comités Nacionales. En caso de que no se disponga de suficiente información o existan datos contradictorios se realizan encuestas para recopilar **información experimental** adecuada o bien se organizan **ejercicios colaborativos** específicos en los que pueden participar los laboratorios que reúnan la experiencia adecuada.

De este modo y con toda la información disponible se publica un **primer borrador (CD o Comitee Draft)** que es presentado a todos los miembros del Comité para su revisión y corrección. En función de los comentarios recibidos y correcciones necesarias, el borrador se va sucesivamente modificando hasta que se alcanza un acuerdo a partir del cual se publica el borrador final (**DIS** o Draft International Standard) que está **disponible para el público** en general, hasta que finalmente se publica el **último borrador (FDIS** o Final Draft International Standard) que vuelve a ser remitido a todos los miembros del Comité y en el cual solo se puede realizar comentarios editoriales y no de contenido técnico. **El proceso de aprobación** de una Norma Internacional desde que se decide iniciar el proyecto suele durar **entre 24 y 36 meses** y el de una Norma Técnica entre 12 a 24 meses.

Periódicamente (en principio cada 4 años) se procede a revisar las Normas en vigor y se decide si estas deben ser revisadas, en cuyo caso se sigue un proceso similar al indicado anteriormente o bien puede prorrogarse su validez por otro período.

Además de los **grupos de trabajo** que se dedican exclusivamente al desarrollo de una norma existen grupos horizontales con un ámbito mucho más general, como se indica a continuación:

Comité	Grupo de trabajo	Título
ISO/TC34/SC9	1	Carne y productos cárnicos
	2	Estadística
	3	Validación de métodos
	4	Ejercicios interlaboratorios
	FDIS 21527	Recuento de mohos y levaduras
	NWIP 10272-3	Detección y recuento de <i>Campylobacter</i> spp. Método semicuantitativo
	6887-5	Preparación de muestras de leche y productos lácteos
	--	Medios de cultivo
CEN/TC275/WG6	3	Requisitos generales de métodos basados en PCR
	4	Virus en alimentos
	5	Producción primaria
	6	Técnicas de muestreo
	7	Parásitos
	--	<i>E. coli</i> enterotoxigénicos
	--	<i>Enterobacter sakazakii</i>
	--	Listeria

En la actualidad, algunas de las normas en vigor se encuentran en proceso de revisión y se están estudiando modificaciones que afectan al desarrollo de la técnica. Estos cambios deben contar con el consenso adecuado y es por ello que es importante la mayor difusión de las mismas para poder evaluar adecuadamente si los cambios son adecuados así como para que los laboratorios que están utilizando las mismas puedan adaptarse adecuadamente.

Los principales cambios propuestos se resumen en la siguiente tabla:

<b>Norma</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Modificación propuesta</b>
ISO 17604	Muestreo de canales	Separar la norma en dos partes. Una para la toma de muestra en el matadero y otra para el procesado de muestras en el laboratorio.
ISO 4833	Aerobios mesófilos	Separar la norma en dos partes, siembra en superficie y siembra en profundidad.
ISO 21528	Enterobacterias	Eliminar la fase de enriquecimiento selectivo (caldo EC) y sustituir la parte de confirmación en medio glucosa por medio OF.
ISO 13681	Mohos y levaduras	Revisar por completo el método y estudiar las ventajas de siembra en superficie o profundidad.
ISO 6579	Salmonella	Revisar por completo el método (uso de caldo Müeller-Kauffman, pruebas de confirmación, medios de aislamiento...)
ISO 21872	Vibrio patógenos	Modificar la cantidad de líquido a transferir del primer al segundo enriquecimiento.
ISO 11290	<i>Listeria monocytogenes</i>	Incluir como opcionales algunos test de confirmación (CAMP, catalasa, movilidad...) Mejorar la prueba de la hemólisis.

NOTA: Los cambios propuestos se están estudiando actualmente por parte de los grupos de trabajo, por lo que no deben considerarse como documentos con validez técnica sino meras propuestas que deben ser estudiadas en cada caso

### **Proyectos de Normas ¿hacia donde vamos?**

En la actualidad existe un importante proceso de cambio de filosofía en el desarrollo y revisión de Normas ISO y CEN.

En el año 2005 surgió el debate sobre cual de los siguientes enfoques debía ser el objetivo de las Normas ISO:

- **Normas para su uso como referencia** (Golden standard) que permitan recuperar todas las cepas conocidas del microorganismo a analizar de todo tipo de matrices potencialmente contaminadas y que además reúnan la adecuada sensibilidad.
- Normas que muestren un **equilibrio entre la adecuación** de las mismas **y su practicabilidad** o uso por parte de los laboratorios de control, de forma que se potenciara su uso en rutina, y en dicho caso, cuales debían ser los requisitos mínimos de las mismas.

En la votación se decidió que este segundo enfoque que busca la **simplificación y la practicabilidad** de los métodos era el más apropiado para permitir su utilización e implantación en los laboratorios de control de alimentos.

Además del camino de la simplificación, los comités ISO y CEN están desarrollando normas que incorporan las **nuevas tecnologías**. En la actualidad existen ya varias normas ISO o CEN disponibles ([www.aenor.es](http://www.aenor.es) y [www.iso.ch](http://www.iso.ch)) que reúnen requisitos generales en diversos ámbitos de los análisis mediante **PCR** (UNE-EN ISO 22174:2005, UNE-EN ISO 20837:2007; UNE-EN ISO 20838:2007; UNE-CEN ISO/TS 20836:2007 EX; ISO 21569:2005; ISO 21570:2005; ISO/DIS 22118; ISO/DIS 22119). No se han publicado todavía métodos de ensayo ISO o CEN específicos para la

detección de determinados microorganismos, pero existen proyectos para la detección de los siguientes microorganismos:

- *Clostridium botulinum*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Bacillus cereus*
- STEC (Shiga toxina E. coli)
- Virus entéricos

En el empleo de estas nuevas tecnologías, las Normas trabajan más basándose en **criterios de rendimiento** del método que en el desarrollo de un método detallado. Para ello, en la **parte normativa** del método contempla los **criterios generales de rendimiento** y de los ensayos en general y en los Anexos (**parte informativa**) se incluyen los **detalles del método** (cebadores, tipos de extracción, condiciones de PCR) de forma que el laboratorio puede utilizar estos u otras condiciones siempre que demuestre que son equivalentes y en todos los casos estaría amparado por la Norma en cuestión.

Otro de los aspectos introducidos es la necesidad de que las **Normas hayan sido validadas** e incorporen datos de validación (repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección...) al objeto de que el laboratorio que los utilice pueda disponer de **datos de referencia** para verificar que el método es válido para las muestras y condiciones particulares empleadas en el mismo así como establecer un adecuado control de calidad.

Este aspecto ha sido especialmente considerado por la Comisión Europea, dado que como se ha indicado anteriormente, se han incluido los métodos ISO y CEN como métodos de referencia para el establecimiento de criterios microbiológicos. Con este objetivo la UE ha emitido un mandato al CEN para que se desarrollen y/o validen métodos microbiológicos de importancia en salud pública y que por tanto forman o formarán parte de las regulaciones en materia de microbiología de alimentos.

Dicho mandato que cuenta con una financiación global de algo más de 3,5 M€, incluye el desarrollo y validación de 15 métodos que serán publicados entre en 2011 y 2012 y que incluyen en parte métodos ya en vigor (*Listeria*, *Salmonella*, *E. coli* O157, Enterobacterias, *E. sakazakii*, *Campylobacter*, *Yersinia* ...) o bien nuevos métodos (Norovirus genogrupo I II y hepatitis A, Histamina, toxina estafilocócica, toxina de *B. cereus*, Vibrios patógenos)

### **¿Normalización frente a innovación?**

Uno de los aspectos que presentan un importante obstáculo a la hora de utilizar las Normas en los laboratorios de control microbiológico y de autocontrol es la **limitación** a la hora de incorporar **nuevos medios y reactivos o pruebas de confirmación**.

Estas limitaciones vienen condicionadas por una parte por el **proceso de aprobación** de las mismas que requieren de un amplio consenso, lo cual requiere de unos plazos dilatados para su modificación y adaptación. Pero además, debemos considerar que dichas normas deben contemplar su posibilidad de **uso a nivel mundial** y no solo en países con un alto grado de tecnificación, por lo que en muchos casos el empleo de las modernas tecnologías solo puede ser contemplado en aquellos métodos donde no exista una alternativa convencional (como por ejemplo en el caso de virus) que puedan ser utilizados por **laboratorios con recursos limitados**.

Además, las Normas **no pueden contemplar en general el empleo de “kits” o fórmulas** que estén **patentadas** por firmas comerciales, lo cual también limita el empleo de determinadas opciones (medios cromógenos, nuevos métodos de confirmación, nuevas tecnologías basadas en NMP, ELISA, impedancia...) considerándolos en general como métodos alternativos, excepto en aquellos casos donde no existe otra alternativa (como por ejemplo en el caso de detección de toxina estafilocócica)

En este sentido, la reciente publicación de la Norma sobre requisitos generales de análisis microbiológicos en alimentos (**UNE EN ISO 7218:2007**), ha incorporado algunos de estos aspectos que afectan de manera general a todas las normas ISO, EN y UNE como por ejemplo la siembra de

**una única placa por dilución** o la posibilidad de utilizar **métodos alternativos para la confirmación** de las colonias, como pueden ser los kits o las pruebas moleculares (a raíz de lo cual, casi todos los métodos de rutina AFNOR están siendo derogados y reemplazados por las Normas ISO correspondientes).

Teniendo en cuenta estas limitaciones que explican la dificultad de empleo de nuevas tecnologías en los métodos normalizados, se ha trabajado también en la posibilidad de empleo de **métodos alternativos** o nuevos métodos en el control de alimentos, tal y como por ejemplo se contempla en los Reglamentos de criterios microbiológicos de la UE.

Así pues, en la actualidad la Norma UNE-EN ISO 16140:2003 incluye los requisitos necesarios para la **validación** de métodos alternativos, siendo su principal aplicación la validación de kits o métodos comerciales que necesitan ser certificados para ser utilizados como métodos de control oficial (por ejemplo mediante una certificación AFNOR, MicroVal, NordVal o AOAC)

Dicha norma está siendo revisada de modo que pueda utilizarse de un modo mucho más amplio por los laboratorios, existiendo los siguientes grupos de trabajo:

- Terminología.
- Validación de métodos comerciales o “kits”
- Validación intermedia (en aquellos casos en que la dificultad del método no permite disponer de suficientes laboratorios para validar el método)
- Verificación de métodos.
- Validación interna.
- Validación de métodos de referencia.

De este modo, se podrá disponer de procedimientos que permitan tanto a los investigadores que desarrollan métodos analíticos como a las marcas comerciales y distribuidoras y a los propios laboratorios de control que trabajan con métodos basados en normas o que desarrollan sus propios métodos, garantizar frente a terceros la validez de los métodos que utilizan y pueden de este modo incorporar nuevas metodologías.

### **La Comisión de Normalización y Validación de la SEM**

La Comisión de Normalización y Validación de la SEM juega un papel fundamental en lo relativo a la normalización y validación de métodos microbiológicos, siempre que en ella se integren y tomen un papel activo todos los actores implicados en esta tarea.

Esta Comisión puede aportar el **conocimiento científico y práctico** necesario para el desarrollo de documentos técnicos de consulta, métodos de referencia así como para la **validación de nuevos métodos o de métodos alternativos**, actividades para las que se cuenta además con el reconocimiento de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) como por la Asociación Española de Normalización (AENOR) y la administración pública.

El trabajo de la Comisión, tanto en la redacción de **documentos técnicos de consulta** como en la realización de **ejercicios colaborativos**, permitirá la incorporación en los laboratorios de análisis de los métodos o mejoras desarrolladas por grupos de investigación (públicos o privados) garantizando la equivalencia y validez técnica de los mismos y por lo tanto facilitando las tareas de acreditación, reconocimiento oficial o incluso su utilización en el desarrollo y mejora de las Normas UNE, EN e ISO.

Así pues solo mediante la implicación de todos los agentes y trabajando de forma coordinada se puede lograr que la **normalización** no sea un escollo sino una **herramienta útil** para los laboratorios y en definitiva para la sociedad, no olvidando el fin último es garantizar la calidad y seguridad de los alimentos que consumimos.

INTEGRACIÓN DE MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA ACREDITADOS

Pilar Lara López  
Applied Biosystems, Quality and Safety Testing Branch

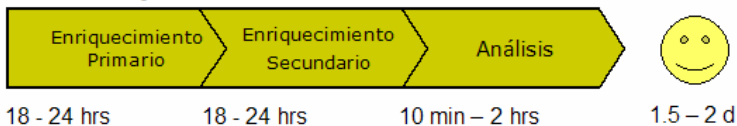
Los Laboratorios que realizan análisis de control microbiológico en matrices alimentarias o medioambientales consumen mucho tiempo, trabajo y en la detección de estos patógenos por cultivo clásico. Los diferentes tipos de métodos implican un tiempo diferente en la consecución de los resultados. Como se muestra en la siguiente figura la consecución de los resultados utilizando técnicas basadas en biología molecular, como es la PCR Real-Time reducen estos períodos a sólo 19 hrs-1.5 días:

## Comparación entre diferentes métodos

### Tradicional (Cultivo)



### Inmunoensayo



### PCR a Tiempo Real



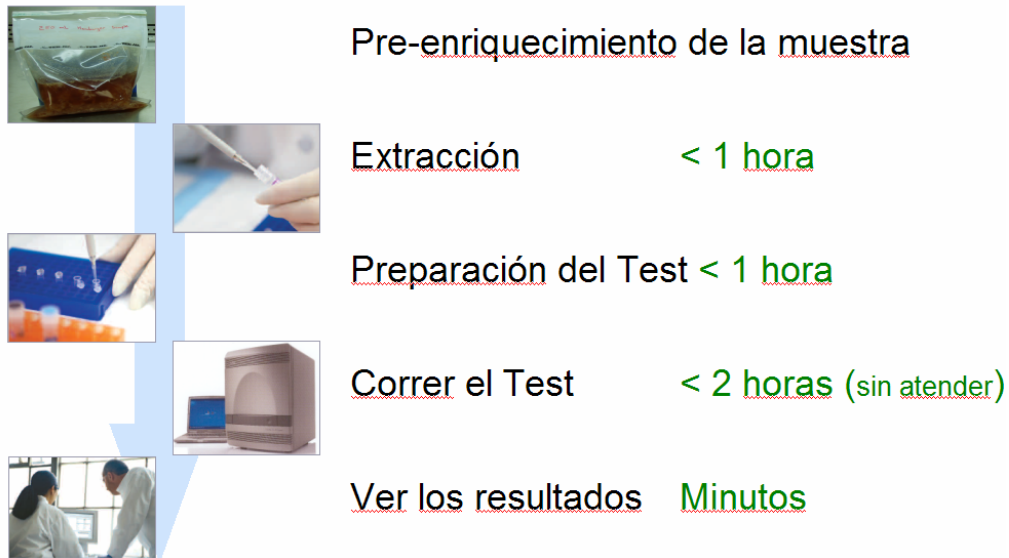
**La amplificación exponencial de la PCR ayuda a reducir significativamente el tiempo requerido para el paso de pre-enriquecimiento.**

Por lo tanto, aquellos laboratorios que necesiten liberar los productos en un corto período de tiempo serían los candidatos ideales para la utilización de este tipo de métodos.

Los protocolos que se utilizan en la detección de patógenos alimentarios (vease *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, por ej.) o medioambientales (como la *Legionella pneumophilla*) utilizando la PCR a Tiempo Real se resumen en cinco pasos que van desde el pre-enriquecimiento al resultado final.

En la siguiente figura mostramos el esquema del procedimiento donde tras el pre-enriquecimiento (que se realiza según los protocolos de microbiología clásica que se utilizan ya en los laboratorios), se extrae el DNA para realizar la detección en el equipo de PCR a Tiempo Real y tras unas 2 horas en el instrumento se determinan los resultados:

### Desde la muestra al resultado en 5 pasos



El patógeno que más se controla dentro de la microbiología alimentaria es la *Salmonella*. Su presencia implica que esos productos no salgan al consumo diario ya sea humano o no. La utilización de estos métodos alternativos en los laboratorios que realizan microbiología clásica deben pasar por una validación interna para poder realizar la acreditación ante los cuerpos pertinentes. Si estos métodos se encuentran ya certificados por instituciones como AFNOR o AOAC, el trabajo de los laboratorios que quieren implementarlas pasa por una validación interna mucho más somera que si han de acreditar un método propio del laboratorio.

Muestra de ello es que kits como el de detección de *Salmonella* de nuestra compañía esté certificado como método alternativo a la ISO 6549 a través de la ISO 16140 por dos de los cuerpos de certificación internacionales:



ABI 29/01- 09/07

Si nos fijamos en las muestras medioambientales, el agua es una de las que se revela como más relevante. El control de la *Legionella spp* o la *Legionella pneumophilla* de las aguas que forman parte de las torres de refrigeración en las instalaciones de aire acondicionado de fábricas o grandes edificios, como pueden ser los hospitales es una de las tareas que se debe realizar para evitar potenciales brotes de este patógeno.

La Legislación Española no contempla la utilización de métodos basados en Biología Molecular de momento pero el control realizado con la microbiología clásica implica 10 días de espera para todas y cada una de las muestras, sean positivas o negativas. Esto conlleva un gran número de placas a procesar. La utilización de la PCR a Tiempo Real para la discriminación de las muestras positivas frente a las negativas ayuda a que el número de muestras a procesar mediante el cultivo. El kit de detección de *Legionella* que nuestra empresa proporciona se basa en una norma de AFNOR T90-471 Real-Time PCR norm y permite detectar no sólo las células viables, si no las viables no cultivables y las bacterias incluidas dentro de las amebas. Laboratorios acreditados en las técnicas habituales están implementando esta tecnología debido a la rapidez del resultado (24 horas) para eliminar las muestras que son negativas y que por lo tanto no se han de cultivar.

Si la por otra parte, el objetivo del laboratorio es la identificación de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) en instalaciones blancas o estériles, la utilización de la secuenciación del DNA de estos microbios y la comparación de los resultados contra librerías validadas de secuencias facilita la rápida identificación de los mismos. En este punto se basa MicroSeq™ que sigue las recomendaciones que realiza la FDA en la utilización de métodos genotípicos en lugar de los fenotípicos (dónde la probabilidad de una identificación no acertada es bastante alta).

## **MESA REDONDA IV**

### **“AVANCES EN MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA”.**

Moderadores: Dr. Enrique David Sancho Puebla.  
Dra. María del Carmen Millán Pérez.  
Universidad de Córdoba.

### **“VINO Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”.**

Dr. José Antonio Suárez Lepe.  
Universidad Politécnica de Madrid.

### **“NUEVOS SISTEMAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN ENOLOGÍA”.**

Dr. Sergi Ferrer.  
Universidad de Valencia.

### **“LA INMOVILIZACIÓN CELULAR EN ENOLOGÍA”.**

Dr. Juan Carlos García Mauricio.  
Universidad de Córdoba.

**VINO Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.**

**José Antonio Suárez Lepe.**

*Universidad Politécnica de Madrid. Grupo Enotec-UPM.*

**I. INTRODUCCIÓN.**

Que el vino sea o no, un alimento seguro depende esencialmente de la evaluación toxicológica correspondiente a los compuestos que vehícula sospechosos de producir toxicidad. Estas sustancias potencialmente tóxicas podrían clasificarse, en cuanto a su origen en:

- Contaminantes, como los pesticidas, o el plomo.
- Aditivos, como el anhídrido sulfuroso.
- Moléculas relacionadas con el metabolismo microbiano tales como las aminas biógenas, el carbamato de etilo o la ocratoxina A.

Los alimentos obtenidos por vía fermentativa son susceptibles de presentar según las condiciones de elaboración, concentraciones más o menos significativas de determinadas moléculas –metabolitos microbianos-, que pueden afectar a la seguridad alimentaria del consumidor, lo que ha requerido una particular atención por parte de los enólogos y la investigación biomédica.

También es importante resaltar, que para valorar el potencial toxicológico de una sustancia, hay que conocer su biodisponibilidad; una vez introducida en el organismo la metabolizará el hígado, perdiendo o disminuyendo su carácter tóxico o, por el contrario, aumentándolo. Asimismo, influye en este carácter tóxico que pueda determinar una sustancia, su facilidad para interaccionar con tejidos, u órganos diana sobre los que puede actuar afectándolos.

**II. LAS AMINAS BIÓGENAS.**

Las aminas biógenas son bases orgánicas dotadas de actividad biológica, alifática o cíclicas, que provienen de la descarboxilación de aminoácidos. En vinos, las principales aminas son la histamina, el diaminobutano o putrescina, la tiramina, la etilamina y la fenil etilamina, y al igual que en otros alimentos fermentados como quesos, salchichones, o cerveza, las bacterias lácticas están estrechamente relacionadas con su producción.

Con excepción de la etil amina que alcanza valores significativos tras la fermentación alcohólica, todas las demás son más abundantes en vinos que han realizado la fermentación maloláctica, aunque la capacidad de formar aminas biógenas está ligada a la cepa bacteriana y no a la especie, por lo que su ausencia debe constituir un criterio importante de selección de bacterias lácticas para la industria enológica.

A partir de los años 80 se han multiplicado notablemente los trabajos de investigación la formación de aminas biógenas particularmente en vinos tintos, y al tratarse de metabolitos esencialmente bacterianos, la concentración aumenta notablemente al término de la fermentación maloláctica, y todavía más en la etapa posterior de envejecimiento en vinos no sulfatados, SUÁREZ y col. (1982), BRAVO y col. (1983), LONVAUD FUNEL y col. (1994).

Estudios más recientes, MARCOBAL y col. (2006), en vinos tintos comerciales españoles ponen de manifiesto que la amina más frecuentemente encontrada es la histamina, que se ha detectado en un 88% de los vinos analizados, seguida de la etilamina, tiramina y putrescina, que se han detectado respectivamente, en un 84 %, 56 % y 46 % de los vinos. Los valores individuales de la concentración de cada amina se encuentran dentro de los rangos descritos en la bibliografía para otros vinos (LETHONEN. 1996; Gloria y col., 1998; SOUFLEROS y col., 1998; VAZQUEZ Lasa y col., 1998; MAFRA y col., 1999) y van desde la no detección en algunas muestras hasta niveles próximos a 24 ppm.

En cuanto al origen de la descarboxilación de los aminoácidos precursores la actividad histidina descarboxilasa ha sido estudiada por LONVAUD-FUNEL y col. (1994), en *Oenococcus oeni*, el enzima

como tal purificado, y el gen que codifica la proteína clonado y secuenciado. El resultado práctico de mayor interés aplicado es el aislamiento de una sonda de ADN, y la correspondiente definición de las secuencias oligonucleotídicas específicas para la detección de posibles cepas bacterianas implicadas en la histaminogénesis.

En la bibliografía al respecto además, se han descrito oligonucleótidos para amplificar mediante PCR fragmentos internos del gen que codifica la histidina descarboxilasa en bacterias lácticas del vino, LE JEUNE y col. (1995), COTON y col. (1998), TORRES ALVES y col. (2002). Más recientemente se ha modificado un oligonucleótido (CL/mod) para la detección del gen *hdc*, y posibilitar los criterios de tercer orden en la selección de bacterias vínicas para inducir la fermentación maloláctica, LANDETE y col. (2005).

### III. CARBAMATO DE ETILO.

A principios de los años 70 la revista *Science* denunció por primera vez la presencia en las bebidas alcohólicas de una sustancia cancerígena, el etil carbamato o uretano. Dado que la presencia de etil carbamato en las bebidas no ofrecía ninguna ventaja tecnológica, se excluyó la hipótesis de la adición fraudulenta de esta sustancia y se empezó a investigar las causas de la formación de uretano. Como precursor del uretano fue indicado el pirocarbonato de etilo, un fungicida utilizado en aquel tiempo y cuyo uso en la industria alimentaria fue consecuentemente prohibido.

Después de estas observaciones la "Health Protection Branch", organismo federal canadiense, definió los contenidos máximos de etil carbamato en las bebidas alcohólicas: 30 ppb para los vinos de mesa, 100 ppb para vinos, licores y vermouths, 150 ppb en los destilados (excluido el whisky) y 400 ppb para los aguardientes de fruta.

La investigación sobre el carbamato de etilo y sus precursores ha mostrado tres orígenes diferentes, SUÁREZ y col. (2004):

- La variedad de vinífera, dentro de su contexto cultural, climático y de fertilización nitrogenada.
- La vinificación, y particularmente la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica, las desviaciones bacterianas y la maceración final en caliente, y finalmente.
- El envejecimiento, KODAMA y col. (1994).

Normalmente los vinos jóvenes suelen contener menos de 6 µg/l de carbamato de etilo. Las tasas que exceden de esta cantidad provienen de una desviación bacteriana o del envejecimiento.

Las experimentaciones han demostrado que la urea es, por término medio, responsable de la formación de 2/3 del carbamato de etilo que aparece en el curso del envejecimiento (1 mg de urea es responsable de la formación de 2 µg/l de carbamato de etilo). La urea es un importante producto final del metabolismo del nitrógeno a cargo de *Sacch. cerevisiae* y este compuesto puede reaccionar con el etanol (alcohol mayoritario del vino) produciendo carbamato de etilo.

Pero además muchas bacterias lácticas heterofermentativas como *Oenococcus oeni*, y numerosas cepas dentro de esta especie pueden (en condiciones de escasez de hidratos de carbono), obtener energía en forma de ATP mediante la degradación de la arginina empleando la vía de la enzima arginina deiminasa (vía ADI) incrementando los niveles de amonio y de precursores del carbamato de etilo como la citrulina y en menor extensión el fosfato de carbamilo. Los datos experimentales obtenidos demuestran que fermentaciones malolácticas conducidas por ciertas cepas *Oenococcus oeni* a determinados pH y temperaturas más elevadas, pueden producir niveles mayores de carbamato de etilo. Además, la tendencia a incrementar la producción de carbamato de etilo se observa en la mayoría de los fermentados con *Oenococcus oeni* independientemente de las condiciones físico-químicas impuestas, prevaleciendo su probable actividad arginina desaminasa, PARDO (2007), BORDONS (2004).

Otras vías posibles de producción de carbamato de etilo, a partir de derivados de los ácidos nucleicos procedentes de la autólisis celular de levaduras y/o bacterias, muestran que los rendimientos ponderales de las reacciones que implican a bases nitrogenadas, son muy bajos, y su contenido en los vinos extremadamente reducido, por lo que estos derivados del ADN quedan excluidos en la formación de cantidades significativas del compuesto en cuestión, UTHURRY y col. (2005).

En resumen, de todo lo expuesto anteriormente se puede concluir que el carbamato de etilo se forma en vinos espontáneamente por reacción entre etanol y un compuesto carbamílico, con un ritmo de formación y rendimiento final que dependen de la facilidad de transferencia de la fracción carbamílica, y de la presencia o ausencia de otras moléculas captadoras competidoras, SUÁREZ y col. (2007).

#### IV. LA OCRATOXINA A.

La ocratoxina A debe su interés actual sobre el plano de la salud pública y sobre el plano económico a su implicación en la llamada *Nefropatía Endémica de los Balcanes* (NEB). Se trata esta enfermedad de una tubulonefritis intersticial crónica que da origen a la larga en el hombre a tumores del tracto urinario, OSPITAL y col. (1998).

Su presencia en vinos señalada por ZIMMERLY y DICK (1996) en Suiza por primera vez, fue contrastada posteriormente por otros autores, aunque estos estudios son escasos y difieren notablemente en el tipo, origen y número de muestras analizadas. No obstante no se aportan evidencias que impliquen un riesgo para la salud de los consumidores.

La escala de valores señalados en los diferentes países donde se ha analizado la presencia de ocratoxina A en mostos y vinos va, de la ausencia total, a valores de 20 mg/l, DUBERNET (2002), aunque estos últimos son excepcionales y limitados a casos muy concretos.

BURDASPAL y LEGARDA (1999) han investigado la presencia de Ocratoxina A en 267 muestras de vinos de distintos tipos aplicando un método de análisis basado en utilización de columnas de inmunoafinidad y cromatografía líquida con adición postcolumna de hidróxido amónico y con un límite de detección de 0,003 µg/l.

El resumen de los resultados obtenidos dado por los autores es el siguiente:

Se ha detectado la presencia de OA en el 92,3 % de las 91 muestras de vino tinto, en el 90,6 % de las 32 de vino rosado y en el 65,2 % de las 69 muestras de vino blanco analizadas. El contenido medio de OA fue de 0,054 µg/l, 0,031 µg/l y 0,020 µg/l en los vinos tintos, rosados y blancos respectivamente. En 15 de las 16 muestras de vinos de postre (tipo Moscatel, Málaga, Marsala) se detectó OA con nivel medio de 1,048 µg/l.

Estos valores implican que para un bebedor habitual de 60 kg con un consumo medio de 156,8 ml de vino tinto, el aporte de OA representaría el 1 % y el 2,8 µg/l de la ingesta diaria tolerable establecida provisionalmente por el Comité Mixto FAO/OMS sobre aditivos Alimentarios (1995) y un Grupo Nórdico de Expertos (1901), respectivamente.

Con posterioridad, DUBERNET (2002) ha señalado en comunicación personal a la Subcomisión de Métodos de Análisis de la Organización Internacional de la Viña y el Vino OIV, que el 75 % de los vinos franceses no contienen cantidades apreciables de Ocratoxina A, y que más del 97 % registran valores inferiores al 1 %.

En cuanto a los agentes, etiológicos productores de la ocratoxina A en la uva, los estudios efectuados hasta el momento presente señalan principalmente a *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus carbonarum*. Se trata de especies muy extendidas en la Naturaleza sin que su parasitismo sobre la baya modifique profundamente la calidad tecnológica de los frutos, excepción efectuada de la producción de OA.

Dos vías de actuación para evitar y/o disminuir la concentración de OA en vinos son posibles:

- evitar la contaminación de la uva, evitando asimismo la producción de OA, o
- una vez presente en el vino, tratar de eliminarla con eficacia.

Sobre la contaminación del viñedo y su complejidad técnica y biológica se necesitan investigaciones actuales sobre la fisiología de estos mohos filamentosos, sobre el impacto de las técnicas vitícolas, y lo que es también muy importante, sobre las moléculas de fungicidas susceptibles de ser eficaces y activas contra estos mohos y sus condiciones óptimas de actuación.

En el segundo contexto relativo a su eliminación del vino, se han ensayado determinados coadyuvantes de uso enológico, como gel de sílice, gelatina, carbón, o celulosa. Solamente el carbón activo se ha mostrado eficaz en tal sentido, solo o asociado al gel de sílice, completándose el tratamiento con un encolado con gelatina.

Recientemente la 82 asamblea General de la OIV celebrada en Bratislava en Junio de 2002, ha decidido fijar para los vinos obtenidos a partir de la cosecha de 2005, un contenido máximo en ocratoxina A de 2 µg/l, solicitando que sean examinadas desde ahora las condiciones para su reducción, y recomendando a los estados miembros que continúen las investigaciones sobre las medidas de prevención y de protección adecuadas para establecer un código de buenas prácticas vitivinícolas. A este respecto, se investigan en la actualidad por parte de varias industrias, sistemas enzimáticos – (generalmente procedentes también de mohos) – que degraden esta problemática toxina.

Finlandia fue el único país que lamentó que ese límite máximo de dos microgramos de Ocratoxina A, recomendado por la OIV, no entrase en vigor ya a partir del año 2002.

#### V. REFLEXIONES FINALES.

En vinos, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), a través de los grupos integrados en la Subcomisión “Vino, Nutrición y Salud”, y particularmente el Grupo “Seguridad Alimentaria”, estudian el estado actual de las alteraciones del vino que pueden incidir en la salud del consumidor, para tratar de dilucidar sus orígenes y vías de formación, y en su caso evitar concentraciones que pueden llegar a ser perjudiciales o nocivas, SUÁREZ (2004).

Por otro lado, hay que considerar la importancia del estudio de estos compuestos tóxicos en la competitividad de nuestros productos, ya que en un mercado mundial global como es al que se tiende, las barreras arancelarias clásicas de entrada para productos de importación van desapareciendo ya que son consideradas frenos a la competitividad, y sutilmente, son remplazadas por otras barreras como las sanitarias y de seguridad alimentaria en las que se ponen límites en exceso cautelosos para frenar las importaciones.

En esta línea se encuentran en parte las estrictas limitaciones que se imponen y que se pretenden acentuar para las aminas biógenas, el carbamato de etilo, o la ocratoxina A, a veces más por razones económicas que puramente toxicológicas.

En cualquier caso, sería aconsejable lanzar un mensaje de tranquilidad a los consumidores, no sólo porque, como se acaba de indicar, numerosos grupos interconexiónados en los distintos países vitivinícolas se ocupan de velar por la calidad y fomentar el consumo de un producto tan natural como el vino, sino que además estas moléculas si realmente están presentes en el vino en la mayoría de los casos lo están en concentraciones muy alejadas de su ingesta diaria admitida, cuando no a niveles ínfimos o de trazas.

#### VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Bordons, A., Gil, J., Araque, I., Reguant, C., Carreté, R. (2004). Estudios para la producción de carbamato de etilo por las bacterias lácticas. *Tecnología del Vino*, 4, 94-100.
- Coton, E. (1996). Etude de l'histidine decarboxilase de *Leuconostoc oenos* (*œnococcus œeni*). *Thèse de Doctorat*. Faculté d'œnologie. Université de Bordeaux 2.
- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (1998). Histamine-producing lactic acid bacteria in wines; early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 199-204.
- Dubernet, M. (2002). Note de synthèse sur l'Ochratoxine A dans les vins. *Communication Commission Œnologie OIV*. SCMAV, 03-2002-21, FV1161, 4.
- European Commission, SCOOP task 3.2.2. (1997). Reports on tasks for scientific cooperation: Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population in EU member states. *Report EUR 17523 EN*.

- Glória, M.B., Watson, B.T., Simon-Sarkadi, L., & Daeschel, M.A. (1998). A survey of biogenic amines in Oregon Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal Of Enology and Viticulture*, 49, 279-282.
- Health Protection Branch (Health and Welfare-Canada). Rationale for the establishment of guidelines to limit ethylcarbamate levels in alcoholic beverages. *Gennaio*, 1986, direttiva.
- Iñigo, B., & Bravo, F. (1980). Histaminogénesis vínica. Estudios del contenido en histamina en vinos españoles. *Alimentaria*, 117, 57.
- JECFA (1995). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 44<sup>th</sup> Meeting. *Technical Report Series, Nº 859*, Ginebra, OMS.
- Kodama, S., Suzuki, T., Fujinawa, S., De La Teja, P., Yotsuzuka, F. (1994). Urea Contribution to Ethyl Carbamate Formation in Commercial Wines During Storage. *American Journal of enology and Viticulture*, 1, 45: 17-24.
- Landete, J. Ferrer, S., Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*, 99, 580-586.
- Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., Ten Brink, B., Hofstra, H., & van der Vossen. (1995). Development of a detection system for histidine decarboxylase of lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 316-326.
- Legarda, T.M<sup>a</sup>, & Burdaspal, P.A. (1989). Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos, *Alimentaria*, 291, 115-122.
- Lehtonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine- A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 127-133.
- Lonvaud-Funel, A., & Joyeux, A. (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria. Isolation of histamine producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 401-407.
- Lucas, P., & Lonvaud-Funel, A. (2002). Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiology Letters*, 211, 85-89.
- Mafra, I., Herbert, P., Santos, L., Barros, P., & Alves, A. (1999). Changes of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 128-132.
- Majeus, P., & Ottender, H. (1996). Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft, *Dtsch-Lebensm-Rundsch.*, 92, 115-122.
- Marcobal, A., Martín-Alvarez, P.J., Polo, M.C., Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V. (2006). Formation of biogenic amines during red wine manufacture. *Journal of Food Protection*, 69, 391-396.
- Moreno-Arribas, M.V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2000). Isolation, properties and behavior of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 584-593.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., & Muñoz, R. (2002). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 117-123.
- Soufleros, E., Barros, M.L., & Bertrand, A. (1998). Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 266, 278.
- Suárez-Lepe, J.A. (2003). Vino y Seguridad Alimentaria. *Grupos de Investigación enología. Gienol 2003*, Logroño. Universidad de La Rioja.
- Suárez-Lepe, J.A., & Agudelo, J. (1993). Characterization of yeast and lactic acid bacterial species in red wines. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 196, 152-154.
- Suárez-Lepe, J.A., & Iñigo, B. (2004). Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación. 3<sup>a</sup> Edición. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Suárez-Lepe, J.A., & Uthurry, C. (2007). Las levaduras y la baja producción de urea y de carbamato de etilo. *Bulletin de l'OIV*, 80, 409-423.
- Suárez-Lepe, J.A., Bravo, F., & Iñigo, B. (1982). Histaminogénesis en vinos II. Producción de histamina por levaduras vínicas en mostos de uva y cultivos sumergidos en vino. *Viticultura y Vino*, 809, 35.
- Suárez-Lepe, J.A., Bravo, F., Burdaspal, P., & Iñigo, B. (1982). Histaminogénesis en vinos III. Fermentación de mostos de uva por asociación binaria levadura-bacteria. *Alimentaria*, 148, 31.
- Suárez-Lepe, J.A., Callejo, M.J. & Colomo, B. (1994). Lactic acid production in Sherry-type wines from the Rueda Appellation of Origin Region. *Bulletin de l'OIV*, 67, 15-24.
- Torres-Alves, R., & Teia dos Santos, A. (2002). Detection of histamine-producing bacteria using polymerase chain reaction techniques and DNA probes. *European Food Research and Technology*, 214, 178-180.
- Trioli, G., & Colagrande, O. (1991). El Carbamato de Etilo en el vino. *Vitivinicultura*, 2, 45-49.

- Uthurry, C., Calderón, F., Colomo, B., Morata, A., & Suárez-Lepe, J.A. (2002). El carbamato de etilo y su relación con diferentes parámetros en vinos tintos. III Foro Mundial del Vino. *Rioja. III Milenio*. Logroño, 22-24, mayo, 2002.
- Uthurry, C.A., Varela, F., Colomo, B., Suárez-Lepe, J.A., Lombardero, J., & García del Hierro, J.R. (2004). Ethyl carbamate by selected yeast and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*, 94, 262-270.
- Vázquez-Lasa, M.B., Iñiguez-Crespo, M., González-Larraina, M., & González-Guerrero, A., (1998). Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 229.
- Zimmerli, B. (1986). *Eurotox. Proceedings*, Zurigo, 243-248. Citado por Trioli en *Vitivinicultura* (1991), 2, 45-49.
- Zimmerli, B., & Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 6: 655-668.

## NUEVOS SISTEMAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN ENOLOGÍA

***Ferrer S.<sup>1</sup>, Polo L.<sup>1</sup> y Pardo I.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>ENOLAB. Departament de Microbiologia i Ecologia, Universitat de València. 46100. Burjassot-Valencia. Sergi.Ferrer@uv.es

### **- Introducción y objetivos**

El control microbiológico en enología constituye la gran asignatura pendiente a lo largo de la historia de la industria de la fabricación, conservación y comercialización de vinos. Esta situación continúa estando vigente en el momento presente, y posiblemente lo será incluso en un futuro (cercano al menos). Los sistemas de control de parámetros físicos y químicos se han instalado desde antiguo con fuerza en el terreno de la enología, y están plenamente arraigados entre los profesionales del sector. Sin embargo, parece como si las levaduras y las bacterias fueran ajenas al proceso. Hacia 1856 Louis Pasteur ya explicó los fenómenos de fermentación alcohólica de azúcares por parte de las levaduras. Posteriormente en 1890 Trouessart preconiza el uso de levaduras para vinificación, y hacia 1900 en el Instituto La Claire (Francia) se desarrolla un sistema para el aislamiento, mantenimiento y producción de levaduras para establecer pies de cuba en mostos. En 1930 Juan Marcilla publica "Defectos, alteraciones y enfermedades de los vinos", y da un impulso definitivo a la Microbiología Enológica en España. Desde entonces, mucho se ha avanzado en este campo de la ciencia, pero muy poco de ello ha llegado a las bodegas.

En la presente ponencia vamos a revisar los principales y más modernos sistemas de control microbiológico en enología, y también intentar analizar las causas por las cuales estos sistemas difícilmente llegan a las bodegas y empresas del sector.

### **- El recuento de microorganismos**

Los métodos de recuento de microorganismos pueden ser directos o indirectos. Los primeros nos indican directamente el número de células que contiene la muestra, como los recuentos microscópicos (con múltiples variantes desde el recuento en cámara a las técnicas fluorescentes de hibridación), los recuentos con contadores electrónicos (contadores de partículas o citómetros de flujo), o el recuento de viables mediante la técnica de NMP (Número Más Probable) (RODRIGUES et al., 2001), siembra en placa (en superficie, en profundidad, sobre filtro, Petrifilm, etc. (NERO et al., 2008)). Los métodos indirectos nos miden alguna propiedad relacionada con el número o la biomasa de las células, como el peso (seco o húmedo), determinación de componentes celulares (DNA, proteína, quitina o ATP), pruebas de reducción de colorantes (azul de metileno o resazurina), actividad metabólica, inmunoensayos, medida de metabolitos degradados o producidos por unidad de tiempo, pérdida de masa, medidas de dispersión de la luz (absorbancia, turbidimetría), medidas de propiedades eléctricas (conductancia, impedancia), y otras.

De todos ellos, solamente una pequeña parte de los métodos se emplean con una cierta regularidad, como el recuento microscópico en cámara, recuento de viables por siembra en placa (en alguna de sus variantes), y en menor medida PCR, contadores electrónicos (FRÖHLICH, 2002), o propiedades eléctricas (HENSCHKE and THOMAS, 1988).

### **- Nuevos sistemas de control**

Los métodos que se han desarrollado más recientemente, o que se encuentran actualmente en perfeccionamiento, se han fijado especialmente en obviar el crecimiento de los microorganismos con el fin de acelerar la obtención de resultados, y están dotados de una alta sensibilidad. Sirvan de ejemplo las técnicas como PCR específica, PCR cuantitativa, FISH, o chips para la identificación y recuento de microorganismos. La PCR específica se basa en una reacción con unos cebadores concretos que amplificarán solamente el fragmento diana para el que han sido diseñados (BARTOWSKY and HENSCHKE, 1999; SPANO et al., 2002; ZAPPAROLI et al., 1998). Estos cebadores pueden estar dirigidos tanto para la identificación de un microorganismo (bacterias lácticas, bacterias acéticas, levaduras u hongos filamentosos), como para detectar genes de interés tecnológico con propiedades positivas (p.e. enzimas liberadores de aromas) o negativas (p.e. producción de aminos biógenas) (LANDETE et al., 2007). La PCR cuantitativa detecta en tiempo real la amplificación del gen de interés mediante alguna variante de técnica de fluorescencia; dicha

fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando, y por lo tanto al número de células originales en la muestra (PHISTER and MILLS, 2003). La técnica de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) es una técnica microscópica que permite detectar, identificar y cuantificar la presencia de un DNA específico, y por lo tanto de las células diana (BLASCO et al., 2003). Permite la concentración de distintos volúmenes de vino (según la cantidad de células en la muestra original) y un tratamiento visual o automatizado de la muestra. Existen también una serie de fluorocromos para microscopía que permiten diferenciar entre células vivas o muertas de una forma muy rápida. Estos mismos fluorocromos, y otros distintos, pueden emplearse también para citometría de flujo (MALACRINÒ et al., 2001), lo que permite un análisis exacto de un número muy elevado de microorganismos (bacterias y levaduras) en tiempos muy cortos. Se han desarrollado chips de ADN capaces de identificar decenas de microorganismos del vino (bacterias acéticas, bacterias lácticas y levaduras), directamente sin cultivo y en un solo análisis. Estos chips se basan en procesos optimizados de hibridación de sondas específicas, y se emplean con equipos especiales.

Muchas de estas técnicas son de base indirecta (al analizar el DNA microbiano) pero se ajustan a un recuento directo al acoplarse a técnicas microscópicas (como FISH), o emplearse controles cuantitativos de los genes analizados (como la PCR cuantitativa). Los contadores electrónicos también permiten realizar el recuento directamente de la muestra, y con resultados inmediatos en muchas ocasiones (en otras en las que se requieren marcajes pueden necesitarse unas pocas horas).

Una ventaja adicional de estas técnicas es que permiten el recuento de un número muy elevado de células, lo que redundará en una mejor estimación de la situación microbiológica del vino analizado. También son muy útiles en situaciones complejas, como en el caso de biofilms o agrupaciones de células, y en otras ocasiones pueden distinguir células vivas y muertas, lo que resulta especialmente útil para el control de los pies de cuba, o para verificar la efectividad de distintos tratamientos como sulfitado, adición de lisozima, etc.

#### **- ¿Sobre qué puntos del proceso es necesario establecer un control microbiológico?**

- En vinos inoculados para control de la implantación.
- En las alteraciones para identificar el agente contaminante.
- En la crianza (cada 3 meses) para evitar posibles alteraciones y síntesis de aminas biógenas.
- En vinos embotellados.
- Como medida de la eficacia de los sistemas de filtración.

#### **- ¿Qué niveles de microorganismos son admisibles en un vino?**

No existe una normativa, pero algunos autores (LOUREIRO, 2007) consideran como aceptables para vinos embotellados <100 cfu/mL para vinos jóvenes, entre 1 y 10 cfu/mL para secos, y < 1 cfu/mL para dulces y bag-in-box. Evidentemente, según el tipo de vino (y de microorganismos detectados) los niveles pueden ser diferentes, y ello estará en función del riesgo de alteración que pueda sufrir este vino. Consideramos en cualquier caso que es necesario desarrollar estudios que relacionen la carga microbiana con el tiempo de estabilidad microbiológica de cada tipo de vino en el mercado, a fin de establecer una normativa al respecto que ayude tanto a productores como a consumidores.

#### **- ¿Porqué no llegan los sistemas de control microbiológico a las empresas?**

Las nuevas tecnologías deberían cubrir una serie de necesidades de las empresas desarrollando sistemas rápidos, fiables, fácilmente interpretables, económicos, automáticos, que requieran poca infraestructura e inversión, y un entrenamiento fácil y rápido del personal. No todos los nuevos sistemas cumplen todas estas características, ya que frecuentemente es necesario un equipamiento y entrenamiento de personal que está lejos de las bodegas.

Los conceptos y métodos de análisis microbiológico no acaban de llegar a los técnicos del sector, y ello se debe en parte a una falta de formación microbiológica del enólogo. Ese sesgo lleva a un cierto miedo por parte del enólogo y falta de confianza en los microbiólogos especialistas que pudieran prestar ayuda. Es cierto que los nuevos estudios de Enología están comenzando a proporcionar mayor formación microbiológica a los enólogos, pero la inercia general es todavía muy grande.

Se piensa por otro lado que son técnicas caras, cuando en muchas ocasiones son igual de baratas o más que los métodos químicos clásicos. Además frecuentemente los análisis microbiológicos se encargan a otra empresa, lo que evidentemente redundaría en un incremento de los precios.

Finalmente, al no existir una legislación normativa al respecto, no se considera necesario realizar un análisis microbiológico, sin percatarse que es una práctica de control más que redundaría sin lugar a dudas en una mejor calidad, estabilidad y seguridad alimentaria del vino. Las administraciones y asociaciones del sector deberían reflexionar y actuar en consecuencia.

#### **- Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2006-08495/ALI y RM 2007-407-00-00.

#### **- Referencias** (listado demostrativo, no exhaustivo)

- Bartowsky, E.J. and Henschke, P.A., 1999. Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 5:39-44.
- Blasco, L., Ferrer, S., and Pardo, I., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 225:115-123.
- Fröhlich, J., 2002. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) and single cell micromanipulation as novel applications for identification and isolation of new *Oenococcus* strains. *Yeast-Bacteria Interactions. Lallemand technical meeting, Langenlois*. 10:33-37.
- Henschke, P.A. and Thomas, D.S., 1988. Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *J Appl Microbiol* 64:123-133.
- Landete, J.M., Pardo, I., and Ferrer, S., 2007. Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *Int J Food Microbiol* 115:364-368.
- Loureiro, V., 2007. Alteraciones microbianas de los vinos. *IX Congreso Nacional de Investigación Enológica. Gienol 2007. Libro de Ponencias. Universidad de Badajoz*.
- Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., and Dellaglio, F., 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 45:127-134.
- Nero, L.A., De Andrade Rodrigues, L., Viçosa, G.N., and Ortolani, M.B.T., 2008. Performance of Petrifilm aerobic count plates on enumeration of Lactic Acid Bacteria in fermented milks. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 16:132-139.
- Phister, T.G. and Mills, D.A., 2003. Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7430-7434.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J Appl Microbiol* 90:588-599.
- Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G., and Massa, S., 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Lett Appl Microbiol* 35:370-374.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P., and Dellaglio, F., 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett-Appl-Microbiol* 27:243-246.

## **LA INMOVILIZACIÓN CELULAR EN ENOLOGÍA**

**Mauricio J.C.**

*Dpto. Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Edif. Severo Ochoa, Campus Universitario de Rabanales, 14014, Córdoba, [mi1gamaj@uco.es](mailto:mi1gamaj@uco.es)*

### **-Introducción.**

El cultivo de células inmovilizadas tiene un gran interés por sus ventajas técnicas y económicas. En la actualidad, es un área de la investigación en expansión y su aplicación en procesos industriales cada vez es mayor. Las células inmovilizadas son biocatalizadores localizados físicamente en un espacio definido, que conservan sus capacidades metabólicas y que pueden ser empleados de forma repetitiva y continua.

### **-Ventajas de usar células inmovilizadas.**

En relación a los procesos fermentativos tradicionales, el uso de células inmovilizadas ofrece una serie de ventajas como son: mejora de la productividad de las fermentaciones (densidad celular elevada), acorta el tiempo del proceso, se reduce el riesgo de contaminación, se puede adaptar a procesos continuos que son mejor optimizados y controlados, se consigue una mayor tolerancia de las células a sustancias inhibitoras, se introduce y retira fácilmente los microorganismos de los medios de cultivo después de la total o parcial biotransformación de los sustratos en el momento más deseado y conveniente, las fermentaciones se pueden realizar a menor escala reduciendo costes y facilitando el uso de una variedad de cepas microbianas que incluyen organismos modificados genéticamente. Algunos inconvenientes que puede tener la inmovilización son: incremento de la turbidez de las bebidas fermentadas por el desprendimiento de células debido a la gran cantidad de células inmovilizadas y dependiendo del método de inmovilización, inestabilidad mecánica de la matriz usada para la inmovilización y pérdida de actividad en operaciones prolongadas. Además, dependiendo del tipo de inmovilización, ésta puede influir en el metabolismo de las levaduras y como consecuencia en el aroma del vino y, por lo tanto, en la calidad del vino.

### **-Sistemas de inmovilización de células.**

Según la técnica o el método de inmovilización los sistemas de células inmovilizadas se pueden clasificar de la siguiente manera:

#### ***Inmovilización natural.***

Existen microorganismos que espontáneamente de una manera natural, sin ningún tratamiento, se unen entre sí formando agregados, flóculos, micelios, velos, o se unen a determinados tipos de soportes produciendo **biofilms**, en el que los microorganismos se encuentran atrapados por polímeros extracelulares secretados por ellos mismos. Un tipo de inmovilización natural lo constituyen las bacterias del ácido acético (vinagre) o las levaduras de flor (crianza biológica de los vinos), que producen espontáneamente un velo sobre la superficie del vino. También se ha conseguido inmovilización celular mediante modificaciones genéticas.

Para el resto de microorganismos que no se pueden inmovilizar de una manera natural, existen los siguientes sistemas de inmovilización, que sirven tanto para microorganismos, como para orgánulos, enzimas y células animales y vegetales.

#### ***Inmovilización artificial.***

##### ***A.- Sistemas de inmovilización por retención física:***

##### ***1) Atrapamiento con matrices porosas.***

Consiste en la retención física del biocatalizador en una red de una matriz constituida por uno o varios polímeros, que pueden ser naturales (colágeno, alginato, carragenato) o sintéticos (poliacrilamida, poliuretano). La matriz rígida debe permitir la difusión de sustratos y productos y hacer posible el crecimiento y mantenimiento de las células activas. En general, el proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de las células en una solución del monómero. Iniciándose la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo

químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, éstas suelen ser más resistentes que los geles.

2) *Inclusión en membranas.*

a) *Microencapsulación.*

En este tipo de inmovilización, las células están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de ellas. Pueden ser de polímeros sintéticos, liposomas o microcápsulas de celulosa. Las microcápsulas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro.

b) *Reactores de membrana.*

El desarrollo de reactores o sistemas que contengan células atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a las células. Mediante una bomba se establece un flujo líquido donde el producto atraviesa la membrana del reactor.

*B.- Sistemas de inmovilización por unión química:*

1) *Unión a soportes.*

Son los sistemas de inmovilización más usados en procesos biotecnológicos y de los que se dispone de mayor información. El biocatalizador se puede unir a un soporte insoluble en agua mediante fenómenos de adsorción (interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno), por unión covalente (enlaces diazo, enlaces peptídicos) y más raramente por uniones bioespecíficas. El primer caso tiene el problema de que los microorganismos pueden separarse del soporte, con pérdida de actividad del inmovilizado, ya que las uniones no son covalentes.

Los soportes se pueden clasificar en dos grandes grupos:

a) *Soportes inorgánicos.*

Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser *naturales* (arcillas como bentonita, piedra pómez, sílice, magnetita, etc.) o *materiales manufacturados* (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).

b) *Soportes orgánicos.* Se pueden clasificar en:

*Polímeros naturales:*

- polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar, agarosa, alginatos, quitina, etc.).
- proteínas (gelatina, albúmina, colágeno, queratina, etc.).

*Polímeros sintéticos:*

- poliolefinas (poliestireno).
- polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.).
- otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.).

2) *Reticulado o Entrecruzamiento.*

Este método consiste en usar reactivos bifuncionales como el glutaraldehído, diisocianato de tolueno o de hexametileno, para formar bases de Schiff con grupos funcionales de los biocatalizadores, produciendo un entramado de redes insolubles en agua. En este caso, las propias células actúan como soporte.

**-.Soportes usados en vinificación.**

Tanto el método como el soporte de inmovilización para la producción de vinos debe de cumplir una serie de condiciones que hagan atractivo su uso, como ser: barato, fácil de llevar a cabo en la industria, no susceptible de contaminación, apto desde el punto de vista alimenticio, no tóxico, higiénico, químicamente inactivo, no debe influenciar la composición sensorial del vino y ser abundante en la Naturaleza. Aunque se han propuesto muchos soportes, solamente unos pocos se pueden aplicar en alimentación.

Las principales técnicas o métodos que se han usado en vinificación, que permiten el confinamiento de biomasa, han sido la adsorción sobre un soporte, autofloculación y el atrapamiento en geles. Uno de los soportes ensayados en primer lugar fue la poliacrilamida, que presenta unas excelentes propiedades de resistencia mecánica, pero tiene el grave inconveniente de ceder monómeros tóxicos al vino, llegando incluso a inhibir la viabilidad de las células incluidas. Los geles de carragenato y de alginato también se han usado para la producción de vinos, ambos son polisacáridos naturales extraídos de algas marinas. La polimerización de estos geles se produce a temperaturas bajas en presencia de cationes de potasio o de calcio. Investigadores de la Universidad de Patras (Grecia) han investigado y comparado el uso de varios soportes para la producción de vinos como el Kissiris (una roca volcánica porosa), bolitas porosas de  $\gamma$ -alúmina, perlas de alginato cálcico, material celulósico deslignificado, bolitas de gluten, trozos de frutas (pera, manzana y membrillo) y hollejos de uva. Por lo general, todos estos soportes incrementaron la velocidad de producción de etanol en comparación con la fermentación clásica con células libres. Sin embargo, unos tienen más ventajas que otros dependiendo de su uso en vinificación.

**-Aplicaciones de la inmovilización celular en vinificación:**

- 1) *Para producir vinos espumosos.*
- 2) *Para fermentaciones a bajas temperaturas, o el tratamiento de fermentaciones lentas o de paradas de fermentación.*
- 3) *Para la desacidificación biológica.*
- 4) *Para producir vinos dulces.*
- 5) *Para la fermentación maloláctica.*
- 6) *Para controlar el pardeamiento de vinos blancos.*

**-Aplicación de biocápsulas de levaduras para la producción de vinos dulces.**

El grupo de investigación "Viticultura y Enología" de la Universidad de Córdoba tiene una patente en relación con la inmovilización de levaduras. La originalidad de esta técnica consiste en inducir una co-inmovilización espontánea de un hongo filamentoso (*Penicillium chrysogenum*) y una levadura de flor (*Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*) en ausencia de compuestos químicos de unión y de soportes externos, creando artificialmente las condiciones adecuadas para favorecer una simbiosis. Ésta se consigue por la adición al medio de cultivo de un nutriente no utilizable por la levadura y sí por el hongo filamentoso. Mediante este procedimiento se obtienen esferas huecas, lisas, elásticas y muy resistentes a condiciones drásticas, a las que hemos denominado **biocápsulas de levaduras**. Al microscopio óptico y electrónico se observa que la pared de la biocápsula está compuesta por micelio y células de levaduras atrapadas, asociadas por la secreción de un polímero. El número de células aumenta hacia el interior de la biocápsula. Las paredes limitan un espacio interior parcialmente ocupado por células de levaduras libres y otras asociadas a hifas, formando racimos. Por otro lado, las uniones e interacciones que se producen entre los microorganismos son naturales (inmovilización natural), por lo que sus actividades catalíticas no deben afectarse profundamente, ya que no se trata de una inmovilización artificial forzada. Destacar que durante la fermentación el hongo filamentoso muere, quedando éste como un mero soporte inerte para futuras reutilizaciones. Las biocápsulas son elásticas y resistentes, se hinchan debido al desprendimiento de CO<sub>2</sub> durante la fermentación y luego finalizada ésta vuelven a su estado inicial, sin sufrir variación alguna de forma ni de consistencia. No se producen roturas, ni por el desprendimiento de CO<sub>2</sub>, ni por el crecimiento de las levaduras, como sí ocurre cuando se utilizan otros soportes. Se podrían aplicar en vinificación en todos los casos descritos anteriormente. En concreto, este sistema de inmovilización lo hemos usado para la producción de vinos dulces, ya que posee una serie de ventajas, como son: la facilidad de retirar las biocápsulas en el momento deseado, su reutilización que, además de agilizar el proceso, reduce costes, y también se podrían utilizar en procesos continuos. Los resultados obtenidos mostraron que no se observaron diferencias significativas en los contenidos de compuestos volátiles, acidez volátil y etanol entre los vinos obtenidos con células libres o con células inmovilizadas, lo que parece indicar que el método de inmovilización no afectó al metabolismo de la levadura ensayada. El ión amonio junto con los aminoácidos L-arginina y L-valina fueron la fuente principal de nitrógeno para las levaduras en las condiciones ensayadas. Las biocápsulas se reutilizaron cinco veces sucesivas sin pérdida de actividad y sin transmitir malos caracteres al vino. No se observaron diferencias en el análisis sensorial de los mostos fermentados con células libres e inmovilizadas. Por lo que estos resultados sugieren que las biocápsulas podrían usarse en la producción de vinos dulces.

## **CONFERENCIA CLAUSURA**

**VI PLAN NACIONAL DE I+D+i: CAMBIOS EN EL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN  
FUNDAMENTAL.**

**Dr. Félix García-Ochoa Soria.  
*Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid.***

**COMUNICACIONES ORALES**

SESIÓN I. 15/09/08. HORA: 16.00-17.30 H.

**SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**CONTROL DE PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA EN FRUTA MÍNIMAMENTE PROCESADA MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS. (PAG 60)**

I. ALEGRE; M. ANGUERA; J. USALL; I. VIÑAS; M. ABADÍAS.

**VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS Y DE LA FASE DE LATENCIA DE LAS CÉLULAS SUPERVIVIENTES. (PAG 62)**

J. AGUIRRE GARCÍA, M<sup>a</sup>.R. RODRÍGUEZ; G. GARCÍA DE FERNANDO

**CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE TRASMISIÓN ALIMENTARIA EN MANZANA MÍNIMAMENTE PROCESADA. (PAG 64)**

I. ALEGRE; M. ABADIAS; M. OLIVEIRA; V. SANCHIS; I. VIÑAS.

**PREVALENCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN ALIMENTOS ELABORADOS Y/O COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO. 2002-2007. (PAG 66)**

D. COLL JORDÁ; M.V. BRAVO VÁZQUEZ; B. DE PABLO BUSTO; MC. ORIA ERASO; MC. ZIGORRAGA ARRIEN

**INFLUENCIA DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE HUEVO LÍQUIDO INOCULADO CON SALMONELLA SENFTENBERG 775 W. (PAG 68)**

S.J. RAMOS LÓPEZ; R. VIRTO RESANO; S. GARCÍA DE LA TORRE; C.J. GONZÁLEZ NAVARRO.

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES, SALMONELLA Y ESCHERICHIA COLI O157:H7 EN LECHUGA ALMACENADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA. (PAG 70)**

M. OLIVEIRA; J. USALL; M. ANGUERA; I. VIÑAS; M. ABADIAS.

**LEUCONOSTOC MESENTEROIDES COMO AGENTES DE BIOPROTECCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS FRENTE A LISTERIA MONOCYTOGENES. (PAG 72)**

R. TRIAS; E. BADOSA; E. MONTESINOS; L. BAÑERAS.

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS SOBRE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS SERVIDAS EN COMEDORES COLECTIVOS. (PAG 74)**

A. VALERO; E. CARRASCO; F. PÉREZ-RODRÍGUEZ; G.D. POSADA IZQUIERDO; R.M. GARCÍA-GIMENO; G. ZURERA.

## CONTROL DE PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA EN FRUTA MÍNIMAMENTE PROCESADA MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS

Alegre, I.<sup>1</sup>, Anguera, M.<sup>2</sup>, Usall, J.<sup>2</sup>, Viñas, I.<sup>1</sup> y Abadías, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitat de Lleida, Departamento de Tecnología de Alimentos, XaRTA, Rovira Roure 191, 25198-Lleida

<sup>2</sup>IRTA, Poscosecha, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure 191, 25198-Lleida. E-mail: [isabel.abadias@irta.cat](mailto:isabel.abadias@irta.cat)

### - Introducción y Objetivos

La fruta mínimamente procesada (MP) puede contaminarse con patógenos de transmisión alimentaria (PTA) en cualquier etapa del procesado. Una vez contaminada, y debido a su riqueza en nutrientes y elevado contenido en agua es un producto que proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento rápido de microorganismos. Algunos de los PTA asociados a estos productos son *Escherichia coli* O157:H7 (Ackers *et al.*, 1998), *Listeria monocytogenes* (Beuchat, 1996) y *Salmonella* (Salleh *et al.*, 2003).

Actualmente existe una demanda de productos “naturales”, no tratados con agentes químicos y libres de aditivos con lo que es deseable conservar los alimentos por métodos naturales. El control biológico se ajusta a esta nueva tendencia mediante la aplicación de cepas bacterianas o levaduras que crecen rápidamente o producen sustancias antimicrobianas, la adición de estas sustancias purificadas o bien los líquidos de fermentación de los microorganismos antagonistas.

El objetivo de este estudio es evaluar el uso de microorganismos (bacterias y levaduras) aislados de fruta como sistema de control de PTA en manzanas y melocotones MP como alternativa al uso del hipoclorito sódico ya que puede ser una estrategia de control más eficaz, más respetuosa para el medio ambiente y más segura, tanto para el consumidor como para el operario en la industria.

### - Material y Métodos

Los PTA utilizados son: una cepa no patogénica de *Escherichia coli* O157:H7 (NTCC 12900), la cepa de *Salmonella* Michigan BAA-709 (aislada de melón), ambas adaptadas a crecer en medio suplementado con estreptomina y la cepa CECT-910 de *L. innocua*. Se inocularon individualmente en medio líquido y se incubaron de 20 a 24 h a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron, se redisolviéron en solución salina y se estimó la concentración usando un espectrofotómetro ( $\lambda=420$  nm). Los posibles microorganismos antagonistas se aislaron de la superficie de manzanas y melocotones y de fruta MP mediante siembra en medios selectivos. También se testaron como posibles agentes de biocontrol, una colección de antagonistas fúngicos pertenecientes al Laboratorio de Patología.

Se utilizaron manzanas ‘Golden Delicious’ y diferentes variedades de melocotón. La fruta fue lavada, desinfectada superficialmente y cortada en cilindros. Cada cilindro se co-inoculó con 15  $\mu$ L de una suspensión de patógeno ( $10^7$  ufc/mL) y antagonista (30 % transmitancia) o sólo patógeno (control) y se conservaron a 20 °C o 5 °C. Para determinar la población de patógeno, se realizó recuento en placa utilizando medios específicos para cada uno de ellos.

### - Resultados y Discusión

Se han probado 98 microorganismos frente a *E. coli* O157:H7 en manzanas ‘Golden Delicious’ (2d 20 °C). De éstos, 9 han reducido la población final de patógeno entre 1 y 2 unidades logarítmicas respecto al control y 2 la redujeron más de 2 unidades. Los 11 microorganismos efectivos fueron testados frente a *L. innocua* (2d 20 °C): 4 redujeron entre 1 y 2 unidades y 7 más de 2. En las mismas condiciones, pero frente a *Salmonella* las reducciones obtenidas fueron inferiores y sólo 2 microorganismos, aquéllos que habían mostrado mayores reducciones frente *E. coli* y *L. innocua* (POG18 y M172PSI1), redujeron más de 2 unidades logarítmicas su población final. En condiciones de refrigeración (5° C) no se observó actividad antagonista hasta el 7º día y sólo POG18 y M172PSI1 fueron capaces de reducir más de 2 unidades logarítmicas la población de *E. coli* O157:H7 al 10º día.

En melocotón se han testado 108 microorganismos frente a *E. coli* O157:H7 (2d 20 °C). De éstos, 94 no redujeron la población final de patógeno, 3 la redujeron entre 1 y 2 unidades logarítmicas

y 11 más de 2 unidades. Éstos 11 microorganismos fueron seleccionados para ser ensayados frente *Salmonella* y *L. innocua*. En el caso de *Salmonella*, 1 microorganismo no redujo la población de patógeno, 7 la redujeron entre 1 y 2 unidades logarítmicas y 3 de ellos la redujeron más de dos unidades. En los ensayos frente *L. innocua*, 4 microorganismos no redujeron su población, 2 la redujeron entre 1 y 2 unidades logarítmicas y 5 la redujeron más de dos unidades. Finalmente, se estudió la eficacia de los 11 posibles antagonistas frente a *E. coli* O157:H7 en condiciones de refrigeración. En este caso, sólo dos microorganismos fueron capaces de reducir la población de patógeno. Estos dos microorganismos (POG18 y M172PSI1) fueron los mismos que consiguieron las mayores reducciones frente a todos los patógenos en los ensayos a 20 °C.

Los microorganismos POG18 y M172PSI1, no sólo frenaron el crecimiento de los tres patógenos, si no que además tuvieron un efecto bactericida, llegando a una población final inferior a la inoculada tanto en manzanas como en melocotones. Janisiewicz *et al.* (1999) observaron que el uso del agente de biocontrol *Pseudomonas syringae* prevenía el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en heridas de manzanas 'Golden Delicious'. Leverentz *et al.* (2006) observaron reducciones de la población de *L. monocytogenes* por debajo del inóculo inicial y reducciones en el crecimiento de *Salmonella* en manzanas 'Golden Delicious' tratadas con microorganismos antagonistas y conservadas a 10 y 25 °C. Trias *et al.* (2008) testaron 6 cepas de bacterias lácticas frente *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* en lechuga y manzana. En manzana, ninguna de ellas redujo la población de *E. coli*, y 5 redujeron a *Salmonella* y *L. monocytogenes*, mostrando en éste último un efecto bactericida.

#### - Conclusiones

Los resultados han demostrado que los agentes de biocontrol pueden reducir el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria en fruta mínimamente procesada o, incluso, eliminarlos. En este estudio, 2 de los microorganismos testados, POG18 y M172PSI1, han demostrado eficacia reduciendo el crecimiento de los tres PTA estudiados a 20 °C y 5 °C. Los agentes de control biológico pueden ser una alternativa a los conservantes químicos para controlar los PTA en manzanas y melocotones MP. Ambos microorganismos serán identificados y estudiados más a fondo.

#### - Referencias Bibliográficas

- Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E. & other authors (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* 177, 1588-1593.
- Beuchat, L.R. (1996). *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control* 7, 223-228.
- Janisiewicz, W., Conway, W.S., Leverentz, B. (1999). Biological control of postharvest decays of apple can prevent growth of *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds. *J. Food Prot.* 62, 1372-1375.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C. P., Camp, M.J. (2006). Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Appl. Environ. Microb.* 72, 1135-1140.
- Salleh, N. A., Rusul, G., Hassan, Z., Reezal, A., Isa, S. H., Nishibuchi, M., Radu, S. (2003). Incidence of *Salmonella* spp. in raw vegetables in Selangor, Malaysia. *Food Control* 14, 475-479.
- Trias, R., Baneras, L., Badosa, E., Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 50-60.

## VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE *Enterococcus faecalis* Y DE LA FASE DE LATENCIA DE LAS CÉLULAS SUPERVIVIENTES.

Aguirre J., Rodríguez M. y García de Fernando G.

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense.

### Introducción y Objetivos

La Microbiología y la vida útil de los alimentos dependen de las características microbiológicas de la materia prima, de la inactivación microbiana lograda mediante las operaciones de conservación que se apliquen y de la capacidad de desarrollo de los microorganismos supervivientes<sup>6</sup>. No obstante, y por regla general, no se presta atención alguna a la variabilidad de tales procesos, ni a la de la inactivación, ni a la diferente potencialidad de la microbiota superviviente para el desarrollo.

Si todos los microorganismos fuesen idénticos, un determinado tratamiento térmico inactivaría a toda la población en un mismo instante, lo que contradiría la universal observación de que la muerte microbiana es logarítmica<sup>5</sup>. Lo mismo puede decirse de la fase de latencia de los supervivientes a un tratamiento conservante. Unas células se reparan antes y otras después, por lo que unas inician su multiplicación antes que otras<sup>1, 2</sup>. ¿Por qué una bacteria es más resistente que otra de la misma especie, incluso una "hermana"? ¿Por qué unas células que han recibido idéntico tratamiento no tardan lo mismo en iniciar el desarrollo? ¿Qué mejor explicación cabe a tales cuestiones más que las diferencias entre unas células y otras? Esto nos obliga a considerar que el resultado de un tratamiento conservante determinado y el tiempo que pueden tardar los microorganismos supervivientes en alcanzar una tasa concreta van a ser variables, nunca constantes<sup>3, 4</sup>, y que tal variabilidad afectará a la vida útil del producto en cuestión.

Por todo lo expuesto, se propone como objetivo el estudio de la variabilidad de la inactivación mediante tratamientos térmicos y de la fase de latencia de los supervivientes a tales procesos. Este conocimiento debería servir para que la industria tome conciencia –si no la tuviera ya– de la crucial importancia de ajustar con exquisita precisión la intensidad de los tratamientos para conseguir determinados objetivos microbiológicos.

### Materiales y Métodos

#### Variabilidad de la inactivación

*E. faecalis* LM24 se inoculó en solución salina estéril (0,75 % NaCl). Esta bacteria tiene un valor  $D_{57^{\circ}\text{C}}$  en ese sustrato de 15,66 minutos, y se trató térmicamente a esta temperatura durante tiempos suficientes para lograr, teóricamente, 0, 2, 3 y 4 reducciones logarítmicas. Lo mismo se hizo con leche, pero las bacterias se trataron a 61°C (valor  $D_{61^{\circ}\text{C, leche}} = 17,09$  minutos). El número de muestras por lote fue de 10 para los controles (0 D) y de 100 para el resto. Los supervivientes se sembraron en agar soja tripticasa con un equipo de siembra en espiral (Eddy Jet TelStar AV-100), se incubaron a 37°C durante 36 horas y se hizo el recuento con un analizador de imagen (Counter Flash). Los datos se analizaron estadísticamente con el programa VariFit, amablemente donado por el Computational Microbiology Group of the Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom), obteniéndose distribuciones normales.

#### Variabilidad de la fase de latencia

Los supervivientes se diluyeron convenientemente hasta alcanzar una concentración teórica de 1 célula en 300  $\mu\text{l}$  de TSB, volumen que se inoculó en cada uno de los cien pocillos de la microplaca del equipo Bioscreen C (Thermolabsystems). Este equipo mide la absorbancia desarrollada en cada pocillo durante un tiempo preestablecido y a una temperatura controlada, en este caso 18°C, lo que permite obtener 100 curvas de crecimiento a la vez. Una vez conseguidas las curvas de crecimiento, se estima el tiempo necesario para que la multiplicación de una célula genere una población cuya turbidez llegue a un nivel de detección arbitrario (0,2 UA) y, conociendo el tiempo de duplicación de la cepa en las condiciones experimentales, se calcula la fase de latencia de la célula que inició el desarrollo de la población. Los datos (fases de latencia) se analizaron estadísticamente con el programa indicado más arriba, obteniéndose distribuciones gamma.

### Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran los valores de las medias (Fig. 1A) y las desviaciones estándar (Fig. 1B) de *E. faecalis* supervivientes a los tratamientos 0, 2, 3 y 4 D en solución salina y leche. La desviación estándar de las muestras control siempre es menor que la de los lotes tratados

térmicamente. Además, conforme se incrementa la intensidad del tratamiento, menos células se mantienen viables, pero la desviación estándar se incrementa. Esto significa, si los tratamientos de conservación no son esterilizantes, que la variabilidad del número de supervivientes va a ser mayor cuanto más drástico sea el proceso.

Las fases de latencia de los microorganismos que no han soportado tratamientos térmicos son más cortas que las de los que lo han sufrido (Fig. 1A). Además, las fases de latencia se van haciendo más prolongadas a medida que los tratamientos térmicos son más severos (Fig. 1A). Asimismo, la variabilidad de las fases de latencia se va incrementando a medida que aumenta la intensidad del tratamiento térmico (Fig. 1B). La combinación de un incremento de la variabilidad del número de supervivientes con un aumento de la dispersión del tiempo que pueden estos tardar en iniciar el desarrollo hace que el número de microorganismos en un producto tras un tiempo de almacenamiento concreto pueda ser bastante variable y, por tanto, difícil de predecir. Este hecho es relevante para cualquier alimento cuya vida útil dependa de la carga microbiana que contiene y de su capacidad de multiplicación, ya que la predicción de la vida útil de un alimento habrá de hacerse atendiendo a una probabilidad más que a una certeza. En efecto, habrán de combinarse la probabilidad de que una unidad de alimento contenga el número más elevado de supervivientes con la de que su fase de latencia sea la más corta de las posibles. Ese producto alcanzará la tasa microbiana de deterioro en un determinado tiempo, que deberá exceder a la vida útil preestablecida para el producto, que, claro está, será demasiado larga para la mayor parte de las unidades del producto, con el consiguiente perjuicio económico y comercial.

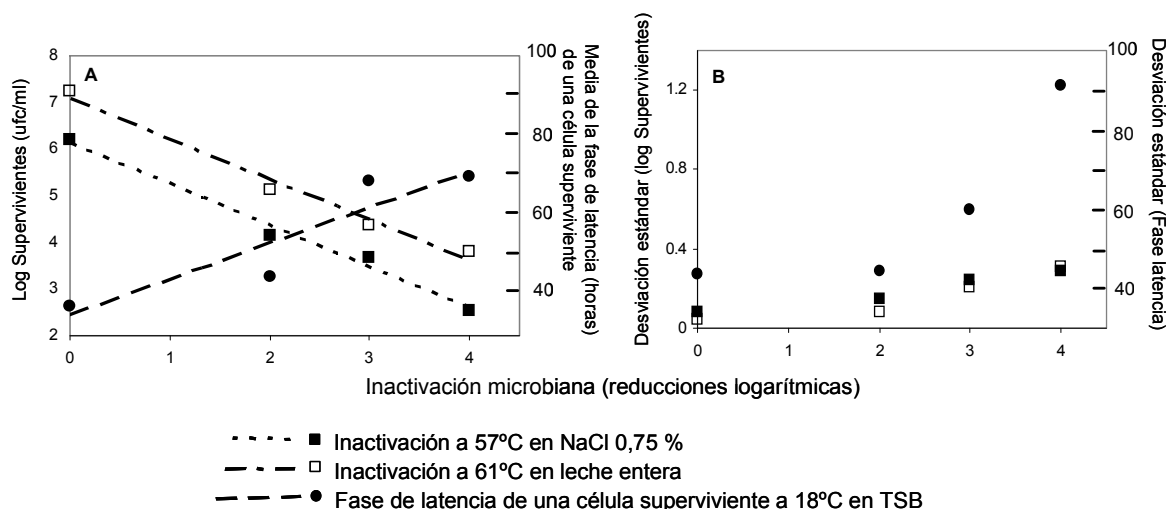


Figura 1. Inactivación de *Enterococcus faecalis* mediante diferentes tratamientos térmicos y fases de latencia de células supervivientes individualizadas (A) y sus respectivas desviaciones estándar (B).

### Conclusiones.

La mayor variabilidad de la inactivación y de la fase de latencia de los supervivientes conforme los tratamientos térmicos se hacen más severos pone sobre aviso a la industria alimentaria sobre la necesidad de conocer este parámetro a la hora de ajustar los tratamientos que deben aplicarse a sus productos para conseguir un determinado objetivo microbiológico.

### Referencias bibliográficas.

- 1 Baranyi J. (1998) Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology*, 192, 403-408.
- 2 D'Arrigo, M., Garcia de Fernando, G.D., Velasco de Diego, R., Ordonez, J.A., George, S.M., Pin, C., 2006. Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Appl Environ Microbiol* 72, 2533-2538.
- 3 Metris, A., George, S.M., Baranyi, J., 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Appl Environ Microbiol* 72, 6674-6679.
- 4 Nauta M.J. (2000) Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 9-18.
- 5 Pelleg M. (2006) Isothermal microbial heat inactivation. In: *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems. Models for predicting growth and inactivation*. Chapter 1, pp. 1-46. CRC Press, 6000 Broken Sound Parkway NW, Boca Raton, Florida 33487-2742, 417 pp. (ISBN 0-8493-3645-4).
- 6 Pin, C., Baranyi, J., 2006. Kinetics of single cells: observation and modelling of a stochastic process. *Appl Environ Microbiol* 72, 2163-2169.

### Agradecimientos

Los autores agradecen las subvenciones recibidas para los proyectos AGL-2005-01239, Consolider CSD2007-0016 y S-0505/AGR-0314 (CAM).

## CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA EN MANZANA MÍNIMAMENTE PROCESADA

Alegre, I.<sup>1</sup>, Abadías, M.<sup>2</sup>, Oliveira, M.<sup>1</sup>, Sanchis, V.<sup>1</sup> y Viñas, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Lleida, Departamento de Tecnología de Alimentos, XaRTA, Rovira Roure 191, 25198-Lleida. E-mail: [ivinas@tecal.udl.es](mailto:ivinas@tecal.udl.es)

<sup>2</sup>IRTA, Poscosecha, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure 191, 25198-Lleida.

### - Introducción y Objetivos

En las últimas décadas, las frutas y verduras mínimamente procesadas (MP) se han popularizado entre los consumidores europeos reflejando su interés por alimentos frescos, saludables y fáciles de preparar.

Los brotes de transmisión alimentaria asociados al consumo de frutas y verduras enteras son poco frecuentes gracias a la barrera protectora suministrada por la piel. Sin embargo, esta barrera es eliminada durante el procesado de los productos MP haciéndolos especialmente vulnerables y más susceptibles para el crecimiento microbiano y aumentando el riesgo de causar brotes (Leverentz et al., 2001). Los brotes resultantes del consumo de sidra y zumo de manzana demuestran que *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* sobreviven en alimentos ácidos (Dingman, 2000, CDC, 1975). El crecimiento de *Listeria monocytogenes* también se ha demostrado en la superficie de alimentos ácidos como tomates (Beuchat and Brackett, 1991).

La vida útil de los productos MP puede verse aumentada mediante el envasado en atmosfera modificada (AM) con bajo O<sub>2</sub> y/o elevado CO<sub>2</sub>, el uso de antioxidantes y la refrigeración.

El objetivo de este trabajo es determinar la supervivencia y el crecimiento de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Michigan y *Listeria innocua* en tres variedades de manzana MP conservadas a diferentes temperaturas. Además se examina el efecto del uso de sustancias antioxidantes y el envasado en AM en las dinámicas de crecimiento de los patógenos de transmisión alimentaria (PTA).

### - Material y Métodos

Se utilizaron la cepa no patogénica de *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, la cepa BAA-709 de *Salmonella* Michigan, ambas adaptadas a crecer en medio con estreptomycin, y la cepa de *L. innocua* CECT-910. Tras 20-24 h de crecimiento individual en medio líquido, los cultivos se centrifugaron y se redisolieron en peptona salina. Se estimó la concentración con un espectrofotómetro ( $\lambda=420$  nm) y se preparó el inóculo a 10<sup>7</sup> ufc/mL.

Se utilizaron manzanas 'Golden Delicious', 'Granny Smith' y 'Shampion'. Se desinfectaron superficialmente y se cortaron en cilindros que se introdujeron aleatoriamente en tubos estériles. En las manzanas 'Golden Delicious' se probó el efecto del ácido ascórbico (AA) mediante el baño de los cilindros durante 2 min en una solución al 2 %. En el caso de las manzanas 'Granny Smith' el antioxidante usado fue el NatureSeal AS1 al 6 %. Tras el baño, los cilindros se dejaron secar y se introdujeron en tubos estériles. Los cilindros se inocularon con el patógeno correspondiente y se conservaron a 25, 20, 10 y 5 °C. Para los ensayos de envasado en AM, las manzanas se cortaron en octavos y se pusieron en barquetas de polipropileno. Cada rodaja se inoculó con un patógeno, se sellaron las barquetas con un film semipermeable (40,000 cc m<sup>-2</sup> 24 h<sup>-1</sup> OTR) y se conservaron a 25 y 5 °C. Paralelamente se dejó un control sin inocular para determinar la evolución de los microorganismos mesófilos y psicrótrofos. Tanto para los ensayos en aire como AM, periódicamente, se siguió la evolución de los patógenos mediante recuento en placa con medios específicos. Se determinó pH, acidez titulable y sólidos solubles en los lotes de manzanas utilizadas. Además, se determinó la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de cada barqueta a lo largo de la conservación.

### - Resultados y Discusión

La población de los 3 PTA creció exponencialmente (más de 2 unidades logarítmicas en 24-48 h) en los cilindros de manzana 'Golden Delicious' conservados a 25 y 20 °C. Cuando los cilindros se conservaron a 10 °C, sólo *L. innocua* logró éstos incrementos poblacionales tras 6 días, mientras *E. coli* y *Salmonella* tan solo lograron la mitad. A 5 °C las poblaciones de *E. coli* y *Salmonella* se

mantuvieron estables y *L. innocua* creció ligeramente. Resultados similares fueron obtenidos en los trabajos realizados por Janisiewicz et al. (1999) y Leverentz et al. (2001 y 2006).

En nuestro ensayo no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en las diferentes variedades de manzana ensayadas, a diferencia de lo observado por Dingman (2000) en que las manzanas 'McIntosh' inhibieron el crecimiento de *E. coli*.

El crecimiento observado de PTA en productos ácidos, como la pulpa de manzana, es un aspecto de seguridad alimentaria que debe tenerse en cuenta en este tipo de productos, ya que, en general, está descrito que colonizan medios con pH superiores. El crecimiento observado puede ser debido a la habilidad de estos patógenos de modificar el microambiente adyacente. Por otro lado, hay que destacar la importancia de la temperatura de conservación para mantener los PTA a niveles bajos.

El baño de los cilindros de manzana 'Golden Delicious' con ácido ascórbico no tuvo ningún efecto en la dinámica poblacional de los PTA cuando se conservaron a 25 °C. A 5 °C las poblaciones finales de patógenos tampoco se vieron afectadas por el antioxidante. En el caso de los cilindros de manzana 'Granny Smith' tratadas con NatureSeal, la población de *E. coli* no mostró diferencias hasta el último día de conservación a ambas temperaturas, la población de *Salmonella* solo fue diferente a 25 °C y la de *L. innocua* a 5 °C. Por lo tanto, las sustancias antioxidantes, aunque pueden ayudar a alargar la vida útil de fruta MP mejorando su calidad visual, no son útiles reduciendo el crecimiento de los PTA.

En cuanto a las pociones de manzana envasadas en AM, *E. coli*, *Salmonella* y *L. innocua* crecieron exponencialmente (incremento >2 log) las primeras 24 h a 25 °C para luego mantenerse, mientras que a 5 °C, los dos primeros disminuyeron respecto la concentración inicial y *L. innocua* aumentó la población más de 1,5 unidades logarítmicas. Las poblaciones de microorganismos mesófilos se mantuvieron estables a la concentración inicial y los psicrótrofos se mantuvieron bajo el nivel de detección durante todo el ensayo. La concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el interior de las barquetas varió de forma más acusada a 25 °C (más de un 4 %) que a 5 (aproximadamente un 2 %). El envasado en AM aumenta la vida útil de los productos mínimamente procesados evitando la oxidación enzimática e inhibiendo a los microorganismos alterantes, no obstante el crecimiento de los PTA no se ve afectado.

#### **- Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este estudio nos demuestran la importancia prevenir la contaminación de las materias primas destinadas a productos mínimamente procesados con PTA y de mantener la cadena de frío en su transporte y manipulación para asegurar la calidad microbiológica, ya que ni el bajo pH de las manzanas utilizadas (3.32) es suficiente para frenar el crecimiento de los PTA a partir de 10 °C. Es también muy importante tener en cuenta que aunque el uso de antioxidantes o atmosferas modificadas puede aumentar la vida útil de este tipo de productos, los PTA nos se ven afectados, por lo que podríamos tener productos con buen aspecto, que el consumidor no rechazaría consumir, con un alto nivel de patógenos.

#### **- Referencias Bibliográficas**

- Beuchat. L.A., Brackett, R.E., 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1367-1371.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1975. Salmonella typhimurium outbreak traced to commercial apple cider- New Jersey. MMWR 24:87-88.
- Dingman, D.W. 2000. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised Apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest and source. Appl. Environ. Microbiol. 66:1077-1083.
- Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., Brown, M.W., Sapers, G.M., Fratamico, P. and Buchanan, R.L. 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. Appl. Environ. Microbiol. 65:1-5.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W.J., Fuchs, Y., Camp, M.J., Chighladze, E. and Sulakvelidze, A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. J. Food Prot. 64 (8): 1116-1121.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C.P., Camp, M.J. 2006. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. Appl. Environ. Microbiol. 72(2):1135-1140.

**PREVALENCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS ELABORADOS Y/O COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO. 2002-2007**

**Coll D.<sup>1</sup>, Bravo, M<sup>a</sup>V.<sup>2</sup>, Karkamo J.<sup>4</sup>, De Pablo B.<sup>3</sup>, Oria C.<sup>4</sup> y Zigorraga, C.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Dirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Donostia-San Sebastián, 1. 01010 Vitoria-Gasteiz, dcoll@ej-gv.es

<sup>2</sup>Subdirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Santiago, 11. 01002 Vitoria-Gasteiz.

<sup>3</sup>Subdirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, C/ M<sup>a</sup> Díaz de Haro, 58. 48010 Bilbao.

<sup>4</sup>Subdirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Navarra, 4. 20013 Donostia-San Sebastián.

**- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La listeriosis es una enfermedad de origen alimentario cuyo interés principal para la salud pública reside en su gravedad, su carácter no entérico, periodo de incubación frecuentemente largo (3-70 días), mortalidad elevada (20-30%) y predilección por individuos con el sistema inmunitario deficitario.

Su importancia también radica en su capacidad de sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en muchos medios diferentes y a su carácter psicrotrofo, por lo que el alimento puede ser contaminado en cualquier eslabón de la cadena alimentaria y el almacenamiento en refrigeración no inhibe su crecimiento.

Por lo tanto, los alimentos preparados listos para su consumo y conservados a temperatura de refrigeración durante periodos largos de tiempo, son los principales alimentos de riesgo en la transmisión de *Listeria monocytogenes*.

En este sentido, en el 2002, se iniciaron las actividades para determinar la prevalencia de *Listeria monocytogenes*, en determinados alimentos de riesgo elaborados y/o comercializados en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV).

Los productos objeto de muestreo están regulados actualmente por el Reglamento (CE) 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

**- MATERIAL Y METODOS**

Se ha recopilado toda la información relativa a determinaciones de *Listeria monocytogenes* realizadas desde 2002 a los alimentos de riesgo en la CAPV.

Para ello, de los distintos planes de muestreo diseñados durante el periodo 2002-2007 se han definido 4 grupos de alimentos de riesgo de los cuales obtener dicha información: productos lácteos, productos de la pesca ahumados, productos cárnicos tratados térmicamente y productos a base de vegetales y frutas.

Las muestras fueron recogidas siguiendo el procedimiento normalizado de toma de muestras de la CAPV.

**- RESULTADOS Y DISCUSION**

Para los grupos de alimentos seleccionados, en la tabla siguiente se exponen el número de muestras que superaron el valor límite de *Listeria monocytogenes* (100 ufc/g) establecido por la actual normativa vigente para productos comercializados durante su periodo de vida útil.

Tabla Nº 1: Distribución de muestras con aislamiento de *Listeria monocytogenes*. Periodo 2002-2007

TIPO DE ALIMENTOS	Nº MUESTRAS ANALIZADAS	RESULTADO + (>100 ufc/g)
Productos lácteos	289	2 (0,69%)
Productos de la pesca ahumados	139	8 (5,75%)
Productos cárnicos tratados térmicamente	804	5 (0,62%)
Productos a base de vegetales o frutas	283	0
TOTAL	1515	15 (0,99%)

De la totalidad de las muestras investigadas entre 2002 y 2007, el 1,05% (15) superaron el valor límite establecido para *Listeria monocytogenes*. Por tipo de alimento, a pesar de que el número de muestras analizadas en cada grupo difiere mucho, la mayor prevalencia fue detectada en productos de la pesca ahumados (5,75%) tal y como recoge la bibliografía, seguida de los productos lácteos (0,69%) y de los productos cárnicos tratados térmicamente (0,62%). En las muestras correspondientes a productos a base de vegetales y/o frutas envasadas y listas para su consumo, no se obtuvo ningún aislamiento de *Listeria monocytogenes*.

El nivel de contaminación de las muestras positivas a *Listeria monocytogenes*, tal y como se muestra en la tabla nº 2, también difiere en los distintos grupos de alimentos, obteniéndose un mayor recuento de gérmenes en las muestras de productos cárnicos tratados térmicamente.

TABLA Nº 2: Nivel de recuento de *Listeria monocytogenes* en las muestras positivas

	>10 <sup>2</sup> ≤ 10 <sup>3</sup> ufc/g	>10 <sup>3</sup> ≤ 10 <sup>4</sup> ufc/g	>10 <sup>4</sup> ufc/g
P. lácteos	2	0	0
P. de la pesca ahumados	3	5	
P. cárnicos tratados térmicamente	0	3	2
TOTAL	5	8	2

#### - CONCLUSIONES

1. El 1,05% de las muestras de alimentos de riesgo muestreados en el País Vasco, entre el 2002 y 2007, superaron el valor límite de *Listeria monocytogenes* (100 ufc/g) establecido por la normativa vigente durante su periodo de vida útil para los productos comercializados.
2. La mayor prevalencia de *Listeria monocytogenes* fue detectada en el grupo de productos de la pesca ahumados.
3. El mayor nivel de contaminación de *Listeria monocytogenes* fue detectado en las muestras de productos cárnicos tratados térmicamente, con recuentos superiores a 10<sup>4</sup> ufc/g en dos de ellas.

#### - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- European Food Safety Authority (2007). The Community summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006.
- 2.- Food Safety Authority of Ireland (2005). The Control and Management of *Listeria monocytogenes* contamination of foods.
- 3.- FDA/FSIS/CDC (2003). Quantitative Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to Eat Foods.
- 4.- Rorvik LM. (2000). *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. J. Food Microbiol. 62 (3): 183-90

## INFLUENCIA DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE HUEVO LÍQUIDO INOCULADO CON SALMONELLA SENFTENBERG 775 W

Ramos S. J., Virto, R., García de la Torre, S. y González, C.J.

Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTTA-Laboratorio del Ebro) Carretera NA-134. Km. 50. 31570 San Adrián (Navarra) España. [sramos@cnta.es](mailto:sramos@cnta.es)

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las últimas décadas, el número de brotes causados por alimentos contaminados con diferentes serotipos de *Salmonella* ha incrementado paulatinamente (1). Los huevos y los ovoproductos han sido los alimentos más frecuentemente implicados en dichos brotes. La pasteurización ha sido el tratamiento elegido principalmente para controlar *Salmonella*. La USDA señala que el tratamiento de pasteurización por calor a 60°C durante 3,5 min (64°C durante 2,5 min . según UK) en huevo líquido consigue de 5-9 ciclos de reducción decimal en el número de los serotipos más frecuentes de *Salmonella*: *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*.(2). Sin embargo, también otros serotipos muy resistentes al calor, como *Salmonella senftenberg 775 W*, han sido aislados en alimentos (3). El tratamiento de pasteurización tradicional no consigue más de 4 ciclos de reducción en la población de *Salmonella senftenberg 775 W* (4), por consiguiente, el nivel de seguridad en huevo líquido pasteurizado contaminado con *Salmonella senftenberg 775 W* es bajo. Además la alta sensibilidad al calor de los componentes del huevo líquido limita la temperatura a la cual el producto puede ser sometido. La pasteurización no causa cambios significativos en las características nutricionales del huevo, pero sus propiedades funcionales (espumante, espesante, emulsionante, etc.), color y aroma se ven afectadas (5).

A través de las altas presiones, se consigue mejorar la calidad microbiológica de los productos del huevo consiguiendo cambios mínimos en las propiedades funcionales del mismo, a la vez que se puede evitar la adición de aditivos químicos (6).

El objetivo de este estudio fue describir la cinética de inactivación por altas presiones de *Salmonella senftenberg 775W* en huevo líquido y comparar la eficacia de los ciclos de tratamientos con la conseguida mediante tratamientos en continuo. Al mismo tiempo correlacionar la eficacia higienizante de los tratamientos con los cambios organolépticos que aparecen en el producto tratado.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los huevos a procesar se sometieron a batido durante 10 segundos con un homogeneizador doméstico, consiguiendo una mezcla homogénea de la clara y la yema. El volumen total se distribuyó en bolsitas con 50 mL. de muestra a las que se inoculó 5 mL. de la suspensión de *Salmonella senftenberg 775W* alcanzando una concentración final en el producto  $\approx 1 \times 10^8$  UFC/mL. Las bolsitas se termosellaron a vacío y por duplicado se envasaron en bolsas de agua termoselladas. Estas bolsas son las que se sometieron al tratamiento de altas presiones a diferentes intensidades 200, 300, 400 y 500 MPa durante 0, 5, 10 y 15 minutos. Con objeto de estudiar la influencia de los ciclos de tratamiento en la eficacia de las altas presiones sobre este microorganismo se aplicaron las mismas intensidades de presión en forma de ciclos de tratamiento de 5 minutos. Así pues, los tiempos aplicados a cada presión fueron: 0, 5, 5+5, 5+5+5.

De forma simultánea a la evaluación de la eficacia microbiológica de los tratamientos, se han llevado a cabo distintas pruebas para determinar los cambios organolépticos del producto. Las medidas que se han realizado han sido:

- Medida del pH
- Media de los ° Brix usando un refractómetro digital RFM 340
- Medida de la humedad por microondas
- Medida del color mediante un espectro-colorímetro X-Rite, SP-64. Los resultados se expresan en la escala CIE-Lab
- Viscosidad (con un viscosímetro ST-2010).

### RESULTADOS y DISCUSIÓN

En las gráficas de supervivencia obtenidas se puede observar que, como cabría esperar, a intensidad de presión constante, al aumentar el tiempo de tratamiento se consigue mayor eficacia en la inactivación de *Salmonella senftenberg 775W*.

Del mismo modo, a tiempo constante (ejemplo 5 minutos), al aumentar la intensidad del tratamiento se consiguen mayor inactivación del microorganismo estudiado. Por ejemplo, 0,75 ciclos de inactivación a 300 MPa frente a 1,87 ciclos conseguidos a la máxima intensidad estudiada (500MPa).

A diferencia de los resultados presentados por Guamis et al., 1999 con *Salmonella enteritidis* en este producto, las curvas de supervivencia obtenidas a las distintas intensidades de presión muestran un hombro, de mayor duración a menor intensidad de tratamiento.

A 200 MPa son necesarios 15 minutos para reducir la población bacteriana 2 ciclos logarítmicos, mientras que solamente se requieren 12, 7 y 5 minutos respectivamente a 300, 400 y 500 MPa.

Cuando los tratamientos se aplicaron en forma de ciclos, un tratamiento de 15 minutos a 300 MPa redujo la población de *Salmonella seftenberg* 4,72 ciclos mientras que a la misma intensidad y mismo tiempo pero en forma de ciclos (5+5+5) la población se redujo 7,08 ciclos logarítmicos. La máxima eficacia (8,0 ciclos de reducción) se consiguió con un tratamiento de 400 MPa en dos ciclos de 5+5 minutos. Un tratamiento a la misma intensidad y de forma continua (10 minutos) redujo la población de *Salmonella seftenberg* 3,35 ciclos logarítmicos.

La evaluación organoléptica indica también cambios significativos en cuanto al *color* y *viscosidad* del producto en las distintas condiciones de tratamiento, sin embargo el resto de parámetros estudiados (pH, ° Brix, humedad) no modificaron significativamente sus valores originales.

En lo que respecta al color se observó un aumento de la coordenada  $a^*$  a 200 MPa, y por lo tanto de la relación  $a/b$ . El índice de color  $1000a/L^*b^*$  también se ve incrementado tras el tratamiento a esta intensidad. No se han observado diferencias significativas entre el tratamiento en continuo y en ciclos a esta intensidad de tratamiento. A intensidades superiores este aumento de la coordenada  $a^*$  no solo no tuvo lugar, sino que incluso se vio reducido.

El resto de coordenadas del espacio CIE-L\*a\*b\* ( $b^*$ ,  $h^\circ$ ,  $L^*$ ,  $C^*$ ) no mostraron variaciones significativas con las muestras analizadas hasta el momento (datos por completar).

En cuanto a la viscosidad, un incremento de ésta se comenzó a observar en el intervalo de 200 a 300 MPa y la coagulación del producto es total entre 400 y 500MPa.

#### **CONCLUSIONES**

- A la misma intensidad de presión y tiempo total de tratamiento, la eficacia de las altas presiones sobre el microorganismo *Salmonella senftenberg* fue mayor cuando éstos se aplicaban en forma de ciclos que de forma continua.

- La cinética de inactivación de *Salmonella senftenberg* 775W en huevo líquido (pH= 8) mostró una fase de retraso (hombro) previa a una cinética de destrucción exponencial.

- Los parámetros organolépticos, pH, humedad y °Brix no se modificaron significativamente con los tratamiento aplicados. El color y la viscosidad se vieron afectados a intensidades de presión superiores a las que consiguen reducir más de tres ciclos la población de *Salmonella senftenberg* 775W. Más estudios serán necesarios para conseguir un adecuado compromiso entre calidad sanitaria y organoléptica.

#### **REFERENCIAS**

- 1- Tauxe, R.T. et al., 1991. Salmonella: a postmodern pathogen. J. Food. Prot. 54,563-568.; Todd, E.C.D. et al., 1996. Worldwide surveillance of foodborne disease: the need to improve. J. Food Prot. 59,82-92.; Wallace, D.J. et al., 2000. Incidence of foodborne illness reported by the Foodborne Diseases Active surveillance Network (Food Net)-1997. J. Food Prot. 63,807-809.)
- 2- D'Áoust, J. Y. et al., 1987. Thermal inactivation of Salmonella species in fluid milk. J. Food Prot. 50(6),494-501.; Humphrey, T.J. et al., 1990. A comparative study of the heat resistance of salmonellas in homogenized whole egg, egg yolk or albumen. Epidemiol. Infect. 104,237-241
- 3- Anellis, A. et al., 1955. Heat resistance in liquid eggs of some strains of the genus Salmonella. Food Res. 19,377-395.; Davidson, C.M. et al., 1966. Thermal resistance of *Salmonella senftenberg*. Nature 212,1060-1061.; Baird-Parker, A.C. et al., 1970. The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of salmonellae. J. Appl. Bacteriol 33,515-522.; Bersani, C. and Cantoni, C, 1983. Termoresistenza della *Salmonella irumu*. Arch. Vet. Ital. 34(6), 118-121.)
- 4- Osborne, W. W. et al., 1954. Heat resistance of strains of *Salmonella* in liquid whole egg, egg yolk and egg white. Food Res. 19,127-139; Mañas, P. et al., 2003. Survival of *Salmonella senftenberg* 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments.
- 5- Guamis, B., Sendra, E. and Mor-Mur, M., 1999. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media.
- 6- Ponce, E. et al., 1995. Effect of high hydrostatic pressure treatments on egg's functional properties. In Proceedings of the VI symposium on the quality of Eggs and Eggs Products (Ed. R. Cepero) pp.223-229. Zaragoza, Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- 7- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B and Mor-Mur, M. 1999. Food Microbiology. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media.
- 8- Patterson et al., Effects of high pressure on vegetative Pathogenes, in High pressure processing of foods, D.A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw and A.P.M. Hasting, eds., pp. 47-63, ©

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA* Y *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN LECHUGA ALMACENADA EN ATMÓSFERA MODIFICADA

Oliveira M.<sup>1</sup>, Usall J.<sup>2</sup>, Anguera M.<sup>2</sup>, Viñas I.<sup>1</sup> y Abadías M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitat de Lleida, Departamento de Tecnología de Alimentos, XaRTA, Rovira Roure 191, 25198-Lleida.

<sup>2</sup>IRTA, Poscosecha, XaRTA, Centre UdL-IRTA, Rovira Roure 191, 25198-Lleida. E-mail: [isabel.abadias@irta.cat](mailto:isabel.abadias@irta.cat)

### Introducción y Objetivos

La producción y el consumo de lechuga mínimamente procesadas (listas para comer), han incrementado drásticamente en muchos países en los últimos años. La conveniencia de envasados de lechuga beneficia a los consumidores y ha creado una demanda de productos de alta calidad. No obstante, los productos vegetales frescos pueden ser un vehículo para la transmisión de bacterias, parásitos y virus patógenos capaces de causar enfermedades a los seres humanos (Nguyen-the and Carlin, 1994).

El envasado en atmósfera modificada (MAP) y en refrigeración, se ha utilizado con éxito para mantener la calidad de las frutas y hortalizas frescas y también puede afectar a los tipos y tasas de crecimiento de los microorganismos presentes (Nguyen-the and Carlin, 1994; Day, 1992; Ahvenainen, 1996).

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en lechuga envasada en dos tipos diferentes de atmósfera modificada (MAP) y compararlo con lechuga envasada en condiciones atmosféricas. También se evaluó el crecimiento de mesófilos y psicrótrofos almacenados a 5 °C y 25 °C.

### Material y Métodos

En este estudio se utilizaron una cepa no patógena de *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900), la cepa BAA-709 (ATCC) de *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (Smith) Weldin serotipo Michigan, y la cepa *Listeria monocytogenes* serotipo 1/2a, aislada en nuestro laboratorio a partir de lechuga iceberg mínimamente procesada (Abadías et al., 2008).

La lechuga cortada (Romana) se inoculó con una suspensión bacteriana de cada patógeno ( $10^5$  cfu/ml). Las muestras fueron envasadas en dos tipos de plástico de polipropileno orientado: el film PA60 (permeabilidad de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de 3500 cc/lm/día/atm a 23 °C) y el film PAPLain (permeabilidad de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de 1100 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/día/atm a 23 °C). Por último el film fue perforado manualmente para crear condiciones atmosféricas en el interior de las bolsas.

La población inicial de cada bacteria fue determinada en el momento 0 y después de conservación a 5 °C y 25 °C y durante diferentes períodos de tiempo, dependiendo del experimento. Para determinar la población, 10 g de lechuga de cada bolsa fueron diluidos en 90 ml de peptona salina, homogeneizados y sembrados en medios selectivos y posterior incubación.

A lo largo del experimento, el pH y las concentraciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y de oxígeno (O<sub>2</sub>) en las bolsas fueron analizados.

### Resultados y Discusión

*Salmonella*, *E. coli* y *L. monocytogenes* fueron capaces de crecer rápidamente a 25 °C en los diferentes tipos de envases, con un aumento de 2.0 hasta 3.3 log en 24h. Por el contrario, a 5 °C, ninguno de los patógenos fue capaz de crecer en cualquiera de los tratamientos, con excepción de *L. monocytogenes*, que obtuvo un crecimiento entre 0.5-1.5 log en los envases PAPLain y aire al final de 10 días de almacenamiento.

En general, no se observaron diferencias entre el crecimiento y la supervivencia de los patógenos en los diferentes tipos de atmósfera modificada, alcanzando un valor máximo de crecimiento muy similar entre ellos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por El-Goorani (1981), que demostró que la reducción de los niveles de O<sub>2</sub> de 21% a 2-3% que se encuentra con frecuencia en envases de atmósfera modificada no reprime la actividad de los patógenos. Resultados parecidos fueron encontrados por Abdul-Raouf (1993) y Diaz & Hotchkiss (1996), que demostraron que vegetales envasados en atmósfera con bajo nivel de O<sub>2</sub> no tenía efecto aparente sobre la supervivencia y el crecimiento de *E. coli* O157:H7 o *Listeria monocytogenes* (Beuchat & Brackett, 1990).

Las poblaciones de psicrótrofos almacenados a 5 °C y 25 °C fueron similares a las poblaciones de mesófilos con un crecimiento de 2.8-4.4 log y 3.7-5.5 log respectivamente. El crecimiento de estos microorganismos se vió influenciado por la composición de gas en el interior, obteniendo un mayor crecimiento en condiciones aerobias en relación a las atmósferas modificadas (PA60 y PAPlain).

Los niveles de oxígeno dentro de los envases a 25 °C disminuyeron rápidamente hasta un valor muy próximo del 0% al tercer día de almacenamiento, mientras que a 5 °C su disminución fue más lenta, llegando a valores próximos de 8 % al final de 10 días de almacenamiento. La concentración de dióxido de carbono en los envases aumentó a 25 °C, llegando a valores próximos del 15 % a los 3 días de almacenamiento. A 5 °C el aumento del CO<sub>2</sub> es mas lento, llegando al 8 % al final de los 10 días de almacenamiento. Estos resultados son debidos a una elevada tasa de respiración del producto a temperaturas elevadas.

No se observó una variación significativa del pH a lo largo del tiempo en los diferentes tipos de envases.

### **Conclusión**

En este trabajo se ha demostrado que la composición de la atmósfera de almacenamiento que se desarrolló en los envases de lechuga durante su conservación no afectó a la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli*.

Cabe destacar que si la lechuga mínimamente procesada se contamina con *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* durante su procesado, estos microorganismos son capaces de crecer y sobrevivir si no se mantienen en condiciones de refrigeración. Por tanto, para garantizar la seguridad microbiana de los vegetales frescos es fundamental evitar la contaminación y mantener las temperaturas de refrigeración hasta el consumo.

### **Referencias bibliográficas**

- Abdul-Raouf, U. M., Beuchat, L. R., & Ammar, M. S. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1999-2006.
- Ahvenainen, R., 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends Food Science Technology*. 7, 179-187.
- Beuchat, L. R., & Brackett, R. E. 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science*, 55, 755-758, 870.
- Day, B. P. F. 1992. Guidelines for the good manufacturing and handling of modified atmosphere packed food products. Technical Manual No. 34. Gloucestershire, UK: Campden & Chorleywood Food Research Association.
- Diaz, C., & Hotchkiss, J. H. 1996. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoilage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 433-438.
- El-Goorani, M. A. 1981. Effects of modified atmospheres on postharvest pathogens of fruit and vegetables. *Horticultural Reviews*, 3, 412-461.
- Nguyen-the, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, 371-401.

**LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES COMO AGENTES DE BIOPROTECCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS FRENTE A LISTERIA MONOCYTOGENES**

***Trias R.<sup>1,2</sup>, Badosa E.<sup>1</sup> Montesinos E.<sup>1</sup> y Bañeras L.<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CIDSAV. Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071. Girona. E-mail: rosalia.trias@gmail.com

<sup>2</sup>Grupo de Ecología Microbiana Molecular (IEA). Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071. Girona

**- Introducción y Objetivos**

La creciente demanda de frutas y hortalizas frescas procesadas mínimamente antes de llegar al consumidor ha sido la principal causa del incremento de brotes de toxiinfecciones alimentarias asociadas a su consumo (Lynch *et al.*, 2006). Algunos patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* pueden formar parte de la microbiota de las frutas y hortalizas frescas, aunque con muy baja frecuencia (Badosa *et al.*, 2008), representando un riesgo para la salud del consumidor. Los métodos que se utilizan actualmente para conservar los productos vegetales frescos (atmosferas modificadas, desinfectantes y bajas temperaturas, entre otros), son en ocasiones insuficientes para asegurar su calidad microbiológica. Los microorganismos bioprotectores representan una alternativa que puede complementar o sustituir los métodos estándar. De entre todos los grupos microbianos utilizados como bioprotectores destacan las bacterias del ácido láctico por su capacidad antagonista reconocida, y por su reconocimiento como bacterias inocuas para los seres humanos (Stiles and Holzapfel, 1997).

En un trabajo anterior se seleccionaron cepas de la especie *Leuconostoc mesenteroides* con capacidad de inhibición de *L. monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* en manzana y lechuga (Trias *et al.*, 2008). Sus mecanismos de inhibición se relacionaron con la producción de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos (cepa PM249) y bacteriocinas (cepas CM135 y CM160). El objetivo del presente trabajo fue determinar la relación entre la dosis de patógeno y de bacteria bioprotectora con la eficacia de control, utilizando dos modelos vegetales: manzanas de la variedad Golden y lechuga Iceberg, y caracterizar las bacteriocinas producidas por las cepas más efectivas, CM135 y CM160.

**- Material y Métodos**

Los ensayos de dosis-respuesta se realizaron con las cepas de *L. mesenteroides* CM135, CM160 y PM249, frente a *L. monocytogenes* ATCC 15313 en dos modelos de material vegetal: lechuga Iceberg troceada y en heridas en manzana Golden Delicious. El material vegetal fue tratado primero con las cepas bioprotectoras de *Leuconostoc*, utilizando las concentraciones de 0, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, y 10<sup>9</sup> ufc por g de lechuga o herida en manzana. A continuación se inoculó *L. monocytogenes*, a las concentraciones de, 1·10<sup>3</sup>, 5·10<sup>3</sup>, 1·10<sup>4</sup> y 5·10<sup>4</sup> ufc por g o herida. Se realizaron recuentos de ambos microorganismos al cabo de 1 y de 48 h de incubación a 25 °C. Los datos obtenidos fueron transformados mediante logaritmos y se realizó una regresión lineal entre la dosis de cultivo bioprotector aplicada y la supervivencia del patógeno para cada concentración de patógeno.

Se caracterizaron e identificaron las bacteriocinas producidas por las cepas CM135 y CM160. Dicho estudio consistió en: monitorizar la producción de bacteriocinas en cultivos *in vitro*, determinar el espectro de acción frente a diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, comprobar su resistencia al pH y a elevadas temperaturas, y establecer su capacidad de inducir lisis en las cepas tratadas. La identificación precisa de las bacteriocinas se realizó mediante amplificación y secuenciación por PCR utilizando cebadores específicos (Xiraphi *et al.*, 2008).

**- Resultados y Discusión**

Los ensayos de dosis respuesta mostraron que dosis elevadas de *Leuconostoc* eran capaces de inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* en los dos modelos utilizados. De las tres cepas probadas, la cepa CM160 fue la más efectiva (Figura 1), ya que se requerían menos células para inhibir la misma cantidad de patógeno. La efectividad de esta cepa era mayor en lechuga que en manzana, necesitando en el primer caso alrededor de 10 células de cultivo bioprotector por cada célula de patógeno, y en el segundo del orden de 50 células por unidad de patógeno inhibido.

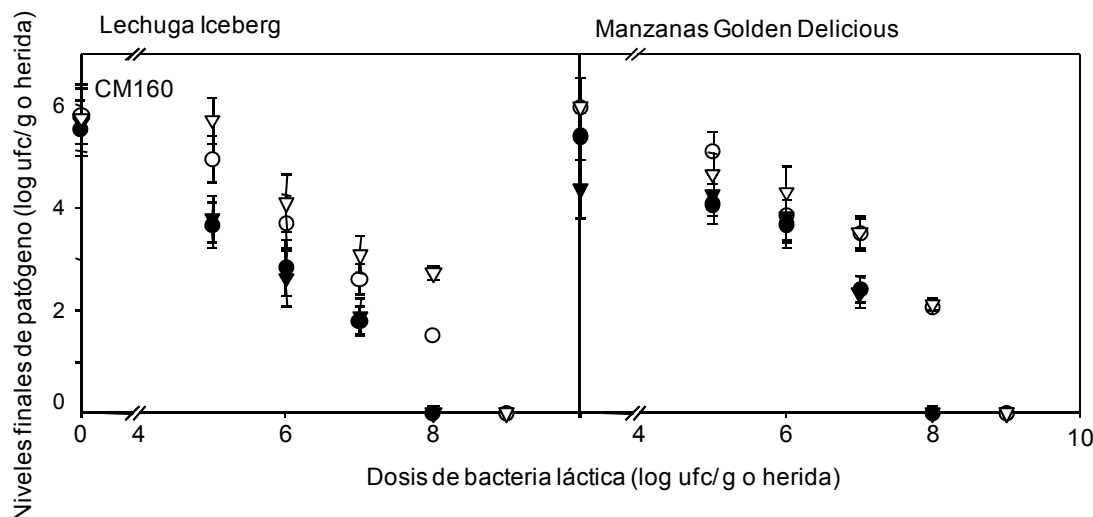


Figura 1\_ Concentración final de *Listeria monocytogenes* en lechuga Iceberg y manzanas Golden Delicious a diferentes concentraciones iniciales del patógeno y de la cepa bioprotectora *L. mesenteroides* CM160. Las concentraciones de patógeno usadas fueron  $10^3$  (●),  $5 \cdot 10^3$  (▼),  $10^4$  (○), and  $5 \cdot 10^4$  (▼) ufg por g o herida. Los valores representados son la media de tres repeticiones y las barras representan el error estándar.

La caracterización e identificación de las bacteriocinas producidas por las cepas CM135 y CM160 demuestra que producen una bacteriocina de clase IIa, resistentes a un amplio rango de temperaturas y pH, y con un amplio espectro de acción sobre bacterias Gram positivas. La producción de estas bacteriocinas tiene lugar principalmente al final de la fase exponencial del crecimiento del cultivo y tienen efecto lítico sobre *Listeria monocytogenes*. Además, se ha comprobado que el medio de cultivo, y en concreto la presencia de azúcares libres, influye directamente en la capacidad de producción. La secuenciación del gen *mesY* utilizando la pareja de cebadores *mesYF*-*mesYR* mostró que ambas cepas producían una bacteriocina idéntica (100% homología) a la mesentericina Y105 producida por la cepa *L. mesenteroides* FR52.

#### - Conclusiones

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* CM160 es un buen candidato para desarrollar un cultivo bioprotector de frutas y hortalizas frescas frente al patógeno *Listeria monocytogenes*. Esta cepa produce una bacteriocina de tipo IIa, idéntica a la mesentericina Y105, que resiste un gran rango de condiciones ambientales, y tiene un amplio espectro de acción, por lo que podría aplicarse también para bioprotección frente a otros patógenos de interés alimentario. Cabe resaltar que a las dosis ensayadas no se observan efectos adversos en los productos vegetales estudiados.

#### - Referencias Bibliográficas

Badosa, E., Trias, R., Parés, D., Pla, M., Montesinos, E., 2008. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 605-611.

Lynch, M., Painter, J., Woodruff, R., Braden, C., 2006. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 55, 1-34.

Stiles, M., Holzapfel, W., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1-29.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., Montesinos, E., 2008. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 123, 50-60.

Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., Drosinos, E.H. 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Sci* doi: 10.1016/meatsci.2007.11.020.

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS SOBRE LA SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS SERVIDAS EN COMEDORES COLECTIVOS**

**Valero, A.<sup>1</sup>, Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R.M., Zurera, G.**

<sup>1</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, bt2vadia@uco.es

**- Introducción y Objetivos**

La mayor demanda de los servicios de restauración colectiva ha hecho que en los últimos años se incremente el control sobre la seguridad de las comidas servidas en los comedores. En concreto, los comedores escolares y geriátricos presentan un mayor interés ya que los alimentos que allí se preparan van destinados a grupos de población susceptible.

Unas inadecuadas prácticas higiénicas y de manipulación en las cocinas de los centros pueden repercutir directa o indirectamente en la calidad microbiológica de ciertos platos preparados que no presentan un tratamiento térmico, como es el caso de las ensaladas (Martínez-Tomé y col., 2000).

En este estudio, se pretende determinar la influencia de las condiciones higiénico-sanitarias de las cocinas de comedores escolares y geriátricos sobre la calidad microbiológica de ensaladas preparadas.

**- Material y Métodos**

a) Diseño del estudio y procedimiento de toma de muestras

En este estudio se visitaron 7 comedores colectivos: 4 comedores escolares y 3 residencias geriátricas. Se llevó a cabo un diseño descriptivo transversal por el cual se visitaron periódicamente los centros a lo largo del periodo octubre 2007-abril 2008. Se realizaron en total 4 visitas por centro, donde se procedió a cumplimentar un cuestionario acerca de buenas prácticas de higiene y manipulación, así como a la toma de muestra de superficies. Asimismo, se tomaron dos muestras de ensaladas preparadas justo antes de ser servidas. Las muestras tomadas se transportaron en refrigeración (<4°C) hasta el laboratorio, donde se procedió a su análisis.

b) Cuestionario sobre buenas prácticas de higiene y manipulación

El cuestionario se basó en evaluar diferentes aspectos concernientes a la higiene de la cocina y del personal, en una escala puntuada de 0 a 4 (0 = inaceptable; 1 = mejorable; 2 = aceptable; 3 = bueno; 4 = muy bueno). Se evaluó el grado de limpieza de guantes/manos; superficies de trabajo; equipos y utensilios; hábitos de manipulación; vestuario y estado higiénico de la cocina.

c) Análisis microbiológico de superficies

Se analizó la concentración de microorganismos aerobios mesófilos de 4 superficies representativas: mesas de trabajo; tablas de corte; fregaderos y grifos. Se recogieron un total de 60 muestras en colegios y 48 muestras en geriátricos. Los recuentos se expresaron en ufc/cm<sup>2</sup>, tomando como referencia la Decisión de la Comisión Europea (2001/471/EC) en la que se determina como límite crítico una concentración de 10 ufc/cm<sup>2</sup>.

d) Análisis microbiológico de ensaladas preparadas

Los análisis se llevaron a cabo conforme al RD 3484/2000 de 29 de diciembre por el que por la que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Se analizaron los siguientes parámetros: aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, detección de *Salmonella* spp y detección de *Listeria monocytogenes*.

e) Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis estadístico de correlaciones bivariadas para las variables estudiadas a través del software SPSS 15.0 inc (Chicago, Illinois, USA).

## - Resultados y Discusión

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los distintos centros en cuanto al grado de limpieza e higiene de las cocinas ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se comprobó que existió una relación entre las condiciones higiénico-sanitarias y los recuentos obtenidos en las mesas de trabajo y tablas de corte ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se pudo demostrar una correlación directa entre dichas variables y los recuentos de aerobios mesófilos y coliformes totales encontrados en ensaladas, con lo que se pone de manifiesto la influencia de otros factores como la calidad microbiológica de la materia prima, o la temperatura de almacenamiento/preparación del alimento.

Un 16,67 % de las muestras de ensaladas procedentes de comedores escolares se clasificaron como no aceptables, mientras que en el caso de los geriátricos, este porcentaje aumentó hasta el 25 %. Estos elevados porcentajes pueden deberse al limitado número de muestras recogidas hasta la fecha. No obstante, estos resultados son coincidentes con otros estudios, donde el porcentaje de ensaladas no aceptable superó el 10 % (Reglier-Poupet y col., 2005). Se encontró un 7,14 % de muestras positivas de *E. coli*, aunque la concentración siempre estuvo por debajo de  $10^2$  ufc/g, considerándose aceptable. Ayçiçek y col. (2004) encontraron un 11,4 % de ensaladas con presencia de *E. coli*, demostrando la posibilidad de contaminación de origen fecal de la materia prima o la existencia de fenómenos de contaminación cruzada durante la elaboración del plato. No se detectaron los patógenos estudiados en las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos en las superficies de trabajo pusieron de manifiesto que los procedimientos de limpieza y desinfección de superficies no son siempre los más idóneos, existiendo zonas especialmente contaminadas como los grifos, donde algunos recuentos de aerobios mesófilos alcanzaron hasta  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>. En total, el 63,33 % y el 58,33 % de los muestreos se situaron fuera de los límites descritos en el Reglamento 2001/471/EC, en comedores escolares y geriátricos respectivamente.

Tabla 1. Recuentos de aerobios mesófilos y coliformes totales (log ufc/g) de ensaladas preparadas procedentes de comedores escolares y geriátricos

	Aerobios mesófilos (log ufc/g)				Coliformes totales (log ufc/g)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Comedores escolares	3,56	5,24	3,37	3,712	0,00	0,00	0,00	3,21
	3,67	4,57	5,34	4,312	2,43	3,81	3,16	3,06
	4,98	4,01	5,84	5,563	3,94	3,21	2,88	3,73
	4,20	4,65	4,93	5,180	0,000	4,12	3,92	4,12
Comedores de geriátricos	Aerobios mesófilos (log ufc/g)			Coliformes totales (log ufc/g)				
	A	B	C	A	B	C		
	5,28	5,06	4,05	4,00	1,96	2,61		
	6,95	5,39	4,24	5,39	2,54	0,64		
	4,99	6,35	4,58	3,73	2,76	2,02		
	4,75	3,96	6,07	3,14	1,99	3,68		

## - Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, se deduce que la calidad microbiológica de las ensaladas preparadas es mejorable. Asimismo, debe existir una mejora de las condiciones higiénico-sanitarias y una prevención de la contaminación cruzada en las cocinas con el objeto de incrementar la seguridad alimentaria en los consumidores, que en este caso, se encuadra dentro de un sector de población susceptible.

## - Referencias Bibliográficas

- Anonymous, (2001). Commission Decision (2001/471/EC) of 8th June 2001. Official Journal of the European Communities L165/48-53, 21/6/2001
- Ayçiçek, H., Sarimehmetoğlu, B., Çakiroğlu, S. (2004). Food Control 15 (5), 379-384
- Martínez-Tomé, M., Vera, A., Murcia, M. (2000). Food Control, 11, 437-445
- RD 3484/2000 de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. BOE; 11:1435-1441
- Réglier-Poupet, H., Parain, C., Beauvais, R., Descamps, P., Gillet, H., Le Peron, J.Y., Berche, P., Ferroni, A. (2005). Journal of Hospital Infection 59, 131-137

SESIÓN II. 16/09/08. HORA: 12.00-14.00 H.

**SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**DISEÑO DE PCR A PARTIR DEL ENZIMA DIMETILALIL TRIPTÓFANO SINTASA PARA LA DETECCIÓN DE MOHOS PRODUCTORES DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN ALIMENTOS.**

E.M. CASADO; B. SÁNCHEZ; M.I. LUQUE; M.M. RODRÍGUEZ; J.J. CÓRDOBA. (PAG 77)

**ESTUDIO DEL NIVEL DE INCIDENCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN INSTALACIONES DE LA INDUSTRIA CÁRNICA DE LA RIOJA.**

(PAG 79)

I. NAVARRO LEÓN; M. TORRES MARTÍNEZ.

**INVESTIGACIÓN DE UN CASO DE INFECCIÓN NEONATAL POR ENTEROBACTER SAKAZAKII ASOCIADA A UN PREPARADO EN POLVO PARA LACTANTES.**

(PAG 81)

M. DE SIMON; S.SABATÉ; AC OSANZ; R. BARTOLOMÉ; MD FERRER.

**LA EFICACIA DEL ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO EN LA RECUPERACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE BIOFILMS DE LISTERIA MONOCYTOGENES .**

(PAG 84)

D.I. SALAS-VÁZQUEZ; J.J. RORÍGUEZ-JEREZ.

**DESARROLLO DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE QUINOLONAS EN ALIMENTOS.**

(PAG 86)

D. SANZ; E. CATALÁN; P. RAZQUIN; L. MATA.

**METODOLOGÍA**

**UN NUEVO MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN RÁPIDA DE ADN GENÓMICO DE SUSPENSIONES BACTERIANAS PARA SU USO EN PCR A TIEMPO REAL.**

(PAG 88)

O. RUIZ-RUEDA; M. SOLER; L. CALVÓ; L.J. GARCÍA-GIL.

**ADAPTACIÓN DE LA NORMA EN 13697 PARA EVALUAR EL EFECTO RESIDUAL DE DESINFECTANTES SOBRE SUPERFICIES.**

(PAG 90)

A.G. RÍOS CASTILLO; D.I. SALAS VÁZQUEZ; J.J. RODRÍGUEZ JEREZ.

**LA NUEVA REVISTA DE SPRINGER "FOOD ANALYTICAL METHODS": UNA PLATAFORMA INTEGRAL PARA EL ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS.**

(PAG 92)

D. RODRÍGUEZ LÁZARO.

**OTRA**

**DESARROLLO DE TERMORRESISTENCIA EN ENTEROBACTER SAKAZAKII.**

(PAG 95)

C. ARROYO CASABONA; G. CEBRIÁN AURÉ; I. ÁLVAREZ LANZAROTE; R. PAGÁN TOMAS; S. CONDÓN USÓN.

**INFLUENCIA DEL FACTOR SIGMA SIGMAB EN LA RESPUESTA AL CHOQUE TÉRMICO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

(PAG 97)

G. CEBRIÁN; N. SAGARZAZU; R. PAGAN; S. CONDÓN; P. MAÑAS

## DISEÑO DE PCR A PARTIR DEL ENZIMA DIMETILALIL TRIPTÓFANO SINTASA PARA LA DETECCIÓN DE MOHOS PRODUCTORES DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN ALIMENTOS

Casado E.M., Sanchez, B., Luque, M.I., Rodríguez, M.M. y Córdoba, J.J.

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. 10071, Cáceres. evamcs@unex.es

### Introducción y objetivos

El ácido ciclopiazónico (CPA) tienen un elevado efecto toxigénico y se ha detectado su producción en mohos aislados de alimentos madurados. Se han descrito procedimientos rápidos basados en la metodología de los ácidos nucleicos para la detección sensible de mohos productores de diferentes micotoxinas. Sin embargo, existen pocos datos en la bibliografía referentes a la aplicación de esta metodología en la detección de mohos productores de CPA. Recientemente Casado y col. (2007) han desarrollado un método de PCR utilizando cebadores procedentes de las secuencias de genes de enzimas comunes a varias rutas de síntesis de micotoxinas. Si bien este protocolo detecta cepas productoras de CPA, no lo hace de forma específica. Es necesario encontrar un protocolo que permita detectar específicamente mohos productores de CPA.

Una posible alternativa es el diseño de cebadores para la PCR a partir de enzimas que tienen como precursores el aminoácido triptófano que interviene en la síntesis de CPA (McGrath y col., 1976). Entre los posibles enzimas se encuentra el dimetil-alil-triptófano sintasa (DMAT-S). Haarman y col. (2005) demostraron que este enzima participa en la ruta de biosíntesis de micotoxinas que tienen como precursor triptófano como ocurre en los alcaloides del ergot. DMAT-S cataliza la unión del triptófano a una molécula de dimetil-alil pirofosfato (DMAPP) obteniéndose dimetil-alil-triptófano (DMAT) (Wang y col., 2004). Esta ruta biosintética presenta similitud a la descrita por McGrath y col. (1976) para la biosíntesis de CPA en *Penicillium cyclopium*.

En este trabajo se pretende diseñar cebadores a partir de la secuencia publicada del enzima DMAT-S que permitan amplificar por PCR fragmentos de ADN en mohos productores de CPA. Estos fragmentos serán posteriormente secuenciados y analizados para el desarrollo de un protocolo específico para la detección de mohos productores.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un protocolo de PCR que permita detectar mohos productores de CPA.

### Material y Métodos

Se han utilizado 30 cepas, pertenecientes a diferentes Colecciones de Cultivo, de mohos productores y no productores de CPA, entre las que se encuentran varias especies de los géneros *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. tamarii*) y *Penicillium* (*P. commune*, *P. camemberti*, *P. griseofulvum*, *P. dipodomyticola* y *P. palitans*).

Se ha comprobado la producción y no producción de CPA de estas cepas preparando extractos clorofórmicos y utilizando técnicas de HPLC-MS y electroforesis capilar (MECC). De esta forma se obtuvieron 15 cepas productoras de CPA y 15 no productoras.

Se ha llevado a cabo la optimización de la PCR para diferentes cebadores; entre ellos dmaW (5'-TTGATCTGGAGTGGTTCCGC-3'/5'-CGTTCATGCCGAAGGTTGTG-3') que amplifican una zona de la DMAT-S en *Aspergillus fumigatus* para la síntesis de alcaloides del ergot (Coyle y Panaccione., 2005); TRP-S (5'-TTCACGCTCGTGGACTTCTAG-3'/5'-GGGTCACAAAGATCG CAAGATAT) diseñados a partir de las secuencias obtenidas con el cebador dmaW y DMAT-S (5'-GAANTGAGCTTNAABTGC-3'/5'-GTGNAGNGTATAGTTGGC-3') diseñado a partir de secuencias conservadas del enzima en distintas especies.

### Resultados y Discusión

Con los cebadores dmaW se amplificó un fragmento de 800 pb. Tras la secuenciación de este fragmento en las diferentes cepas utilizadas se diseñó el cebador TRP-S con el cual se obtuvieron bandas de 390 pb. en las cepas productoras de *P. commune*, *P. camemberti* y *P. palitans* analizadas (Tabla 1). Sólo en una cepa no productora de *P. commune* se observa amplificación. No se consiguió amplificación en las cepas productoras de *A. flavus*, *A. tamari* y *P. griseofulvum*. Con los cebadores DMAT-S obtenidos a partir de secuencias conservadas se detectó una banda de 700 pb en las mismas especies que en las encontradas con los cebadores TRP-S, además de *A. tamari*. No se

detectó amplificación en las cepas no productoras de *P. commune*, si bien se encontró amplificación en una cepa no productora de *P. dipodomyicola*. (Tabla 1). El protocolo diseñado con los cebadores DMAT-S constituye una primera aproximación utilizando la ruta enzimática de la DMAT-S para la detección de mohos productores de CPA, mostrándose muy eficaz en cepas de *P. commune*. Son necesarios estudios posteriores para conseguir la detección sensible en otras especies como *P. griseofulvum* y *A. flavus*.

Tabla 1. Resultados de la PCR con los cebadores dmaW, TRP-S y DMAT-S para cepas productoras y no productoras de CPA (+: amplificación, -: no hubo amplificación).

Productoras CPA	dmaW	TRP-S	DMAT-S
1. <i>A. flavus</i>	-	-	-
2. <i>A. flavus</i>	-	-	-
3. <i>A. tamarit</i>	-	-	+
4. <i>P. griseofulvum</i>	-	-	-
5. <i>P. griseofulvum</i>	-	-	-
6. <i>P. griseofulvum</i>	-	-	-
7. <i>P. palitans</i>	-	+	+
8. <i>P. camemberti</i>	-	+	+
9. <i>P. camemberti</i>	+	+	+
10. <i>P. camemberti</i>	+	+	+
11. <i>P. camemberti</i>	+	+	+
12. <i>P. commune</i>	+	+	+
13. <i>P. commune</i>	+	+	+
14. <i>P. commune</i>	+	+	+
15. <i>P. commune</i>	+	+	+

No Productoras CPA	dmaW	TRP-S	DMAT-S
16. <i>P. dipodomyicola</i>	-	-	+
17. <i>P. griseofulvum</i>	-	-	-
18. <i>P. griseofulvum</i>	-	-	-
19. <i>P. griseofulvum</i>	-	-	-
20. <i>P. commune</i>	-	-	-
21. <i>P. commune</i>	-	-	-
22. <i>P. commune</i>	-	-	-
23. <i>P. commune</i>	-	-	-
24. <i>P. commune</i>	-	+	-
25. <i>P. commune</i>	-	-	-
26. <i>P. commune</i>	-	-	-
27. <i>P. commune</i>	-	-	-
28. <i>P. commune</i>	-	-	-
29. <i>P. commune</i>	+	-	-
30. <i>P. commune</i>	+	-	-

### Conclusiones

El protocolo de PCR diseñado utilizando los cebadores DMAT-S podría utilizarse para detectar cepas de mohos productores de CPA pertenecientes a *P. commune* que constituye la especie de mohos mayoritaria en alimentos madurados.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología AGL2004-03291 y AGL2007- 64639

E.M. Casado es beneficiaria de una beca predoctoral de la Junta de Extremadura.

### Referencias bibliográficas

- Casado, E.M., Sánchez, B., Rodríguez, M.M. y Córdoba, J.J. 2007. Desarrollo de un método de PCR en tiempo real para la diferenciación de cepas de mohos productoras de ácido ciclopiazónico. Congreso SEM, Sevilla 2007.
- Coyle, C.M. y Panaccione, D. G. 2005 An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3112-3118
- Haarmann, T., Machado, C., Lübbe, Y., Correia, T., Schardl, C., Panaccione, D., y Tudzynski, P. 2005. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: extensión of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* 66, 1312-1320.
- McGrath, R., Steyn, P.S., Ferreira, N.P. y Neething, D.C. 1976. Biosynthesis of cyclopiazonic acid in *Penicillium cyclopium*: The isolation of dimethylallylpyrophosphate: Cyclo-acetoacetyltryptophanyl dimethylallyltransferase. *Bioorganic chemistry* 5, 11-23.
- Wang, J., Machado, C., Panaccione, D.G. Tsai, H.F. y Schardi, C.L. 2004. The determinat step in ergot alkaloid biosíntesis by an endophyte of perennial ryegrass. *Fungal Genetic and Biology* 41, 189.198.

ESTUDIO DEL NIVEL DE INCIDENCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN INSTALACIONES DE LA INDUSTRIA CÁRNICA DE LA RIOJA

Navarro L.<sup>1</sup>, Torres M.<sup>1</sup>, Área Técnica<sup>1</sup> y Área de Laboratorios<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Tecnológico de la Industria Cárnica de La Rioja-CTIC. Ctra. Nacional 120, km 22,8, 26315 Alesón, La Rioja, [mtorres@ctic.info](mailto:mtorres@ctic.info)

**- Introducción y Objetivos**

Durante los últimos 15-20 años ha habido una creciente preocupación en todo el mundo por el patógeno *Listeria monocytogenes* y sus implicaciones para la seguridad de los alimentos.

En España, el número de casos declarados al Sistema de Información Microbiológica (SIM) en los que *L. monocytogenes* es el microorganismo implicado en una infección alimentaria ha aumentado en los últimos años.

Tabla 1.- Casos registrados en el SIM correspondientes a los años 1999-2006

Microorganismo	Nº casos registrados							
	Año 2006	Año 2005	Año 2004	Año 2003	Año 2002	Año 2001	Año 2000	Año 1999
<i>Listeria monocytogenes</i>	78	79	99	50	48	44	11	12

Los productos cárnicos fermentados están frecuentemente contaminados con listerias y su elaboración no comprende ninguna etapa listericida, pero su composición final evita la proliferación de este microorganismo durante el almacenamiento (FAO/OMS, 2004). Además, éste es un microorganismo con capacidad de formar fácilmente biofilms, especialmente sobre superficies de acero inoxidable, material de uso generalizado en la industria alimentaria.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo en el que se muestrearon 60 embutidos crudos curados obtenidos en punto de venta, se obtuvo una incidencia de un 30% de muestras que mostraron presencia de *L. monocytogenes*.

Ante el elevado número de casos en los que se ha detectado *L. monocytogenes* en derivados cárnicos y la dificultad de eliminar los biofilms que forma este microorganismo en las instalaciones, se plantea esta estudio que tiene como objetivo estudiar el nivel de incidencia de *L. monocytogenes* en instalaciones dentro de la industria cárnica de La Rioja.

**- Material y Métodos**

Se estudian un total de 100 superficies en 10 industrias cárnicas de La Rioja, seleccionadas en función de las conclusiones obtenidas como consecuencia de las visitas previas realizadas a las mismas. Se recogieron 4 muestras de cada tipo de superficie en cuatro empresas diferentes.

La toma de muestras se realiza mediante el método de doble hisopado con una plantilla flexible esterilizada de 20 cm<sup>2</sup> y las muestras se transportan refrigeradas en un medio que contiene BPW+ neutralizante.

El método de análisis utilizado para el recuento de *L. monocytogenes* en placa se basa en el método de referencia NF EN ISO 11290-2.

**- Resultados y Discusión**

Se obtuvo una incidencia muy baja de *L. monocytogenes* en superficies. De las 100 superficies muestreadas solamente el 7% de las superficies presentaron recuentos positivos de *Listeria monocytogenes*.

Es importante destacar que la contaminación encontrada en las superficies que presentaron recuentos positivos fue muy reducida, entre <0,2 y 1,7 ufc/cm<sup>2</sup>, excepto en el caso de los desagües, que se eleva a 19,7 ufc/cm<sup>2</sup>.

Tres de las superficies que mostraron recuentos positivos eran superficies de contacto directo con los alimentos: la tapa de la amasadora, cinta transportadora y cuchillo; mientras que el resto correspondían a superficies de contacto indirecto: desagüe, interruptores de luz, paredes de obrador y ruedas de los carros

#### **- Conclusiones**

El número de superficies que presentan recuentos positivos de *Listeria monocytogenes* es bajo a pesar de haber utilizado el método de muestro de doble hisopado que según Midelet (2002) parece ser el más adecuado para el muestreo de superficies y para desprender los biofilms.

El nivel de contaminación encontrado ha sido muy reducido y muy próximo en la mayoría de los casos al límite de detección del método.

Estos resultados apuntan a que la contaminación cruzada del producto por contacto con las superficies no es el único causante de la presencia de este patógeno en producto terminado. Si bien el nivel de higiene de las superficies es cada vez más correcto dado la implantación cada vez más intensa de los planes de limpieza y desinfección en las empresas, no debemos olvidar realizar otro tipo de controles como es el de las materias primas utilizadas.

#### **- Referencias Bibliográficas**

Opinion of the Scientific Committee on Food in respect of *Listeria monocytogenes*. 1-3. Fuente: EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. (2000).

FAO/OMS (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. 1-86.

Midelet, G.; Carpentier, B. (2002). Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 ((8)), 4015-4024.

#### **- Agradecimientos**

Este proyecto ha sido financiado con fondos de la Agencia Económica de Desarrollo Económico de La Rioja: 2005-I-ID-00073.

**INVESTIGACIÓN DE UN CASO DE INFECCIÓN NEONATAL POR *ENTEROBACTER SAKAZAKII* ASOCIADA A UN PREPARADO EN POLVO PARA LACTANTES**

**De Simón M.<sup>1</sup>, Sabaté S.<sup>1</sup>, Osanz AC.<sup>2</sup>, Bartolomé R.<sup>3</sup> y Ferrer MD.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Laboratori de l' Agència de Salut Pública de Barcelona. Av. Drassanes, 13, 08001 Barcelona. dferrer@aspb.cat

<sup>2</sup>Sección de Higiene Alimentària i Zoonosi dels Serveis Territorials a Tarragona del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Av. de Maria Cristina, 54, 43002 Tarragona.

<sup>3</sup>Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Valle Hebrón de Barcelona, Paseo Valle Hebrón, 119-129, 08035 Barcelona.

**- Introducción y Objetivos**

*Enterobacter sakazakii* es un patógeno oportunista emergente que puede causar meningitis, encefalitis, septicemia y enterocolitis necrotizante en lactantes. La infección por este microorganismo es poco frecuente, pero puede comportar graves secuelas neurológicas y su tasa de mortalidad es elevada (40-80%). Los lactantes inmunodeprimidos y los recién nacidos (<28 días), en particular los prematuros de bajo peso (<2500g), son los que presentan un mayor riesgo de contraer la infección.

Actualmente, no se conoce el reservorio de *E. sakazakii*, pero se cree que es un microorganismo de amplia distribución. Se ha aislado en diferentes alimentos así como en numerosos ambientes (ámbito doméstico, hospitalario, zonas de producción de cereales y productos lácticos).

La contaminación por *E. sakazakii* en preparados en polvo para lactantes ha sido la causa de brotes y casos esporádicos de infección en EEUU y Europa. Este tipo de productos no son un producto estéril y, aunque *E. sakazakii* no sobrevive al proceso de pasteurización de la producción, pueden contaminarse durante la adición de micronutrientes posterior a la pasteurización o bien durante su reconstitución.

El mes de junio de 2007, un Centro Hospitalario en Catalunya notificó al servicio de Epidemiología del Servei Territorial de Tarragona del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya un caso de infección neonatal por *E. sakazakii*. Se trataba de un prematuro de 1.600g de peso, que al nacer presentó un buen estado general. A los 5 días el neonato presentó un cuadro de encefalitis, aislándose *E. sakazakii* en LCR, sangre y heces. La alimentación del prematuro se había realizado exclusivamente mediante un preparado en polvo para lactantes.

En este trabajo se describe la investigación de dicho caso nosocomial de infección neonatal por *E. sakazakii* en la Unidad de Prematuros de un Centro Hospitalario de Catalunya realizada con el objetivo de localizar la fuente de infección y los posibles factores contribuyentes.

**- Material y Métodos**

Ante la hipótesis de trabajo de que el vehículo de transmisión de la infección era el preparado en polvo para lactantes utilizado en la alimentación del recién nacido, miembros de la sección de Higiene Alimentària del Servei Territorial de Tarragona realizaron una inspección al Centro Hospitalario implicado para establecer si el origen de la contaminación por *E. sakazakii* procedía del propio preparado láctico en polvo o bien tuvo lugar durante el proceso de reconstitución del mismo en la preparación de los biberones. Así mismo se investigó entre los posibles factores contribuyentes la inadecuada conservación del producto reconstituido. Para ello, se comprobó la trazabilidad del producto, el control de temperatura de las neveras, se revisó el procedimiento de preparación y se inspeccionaron las instalaciones relacionadas. Al mismo tiempo se procedió a la inmovilización cautelosa de la totalidad del producto presente en aquel momento en el hospital y se convocó a la empresa responsable de la fabricación del producto para que estuviera presente en la toma de muestras oficial del producto inmovilizado. De acuerdo al Reglamento CE 2073/2005, que para este tipo de productos establece como criterio de seguridad alimentaria la ausencia de *E. sakazakii* en 10g (n=30, c=0), se recogieron 34 unidades de muestra correspondientes a dos lotes que constituyeron la alimentación del neonato afectado: 30 latas cerradas y una abierta del lote A y dos cerradas y una abierta del lote B.

La investigación de *E. sakazakii* (método ISO/TS 22964:2006) en las muestras del preparado infantil recogidas se llevó a cabo en el Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona. De cada unidad de muestra se analizaron dos submuestras de 10g, una para el análisis inicial y la otra para el contradictorio, realizándose un total de 68 determinaciones. Después de un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada a 37°C, 18h, se realizó un enriquecimiento en caldo lauril sulfato triptosa modificado-vancomicina a 44°C, 24h. El aislamiento se realizó en agar cromogénico ESIA incubado a 44°C, 24h. Para la identificación se utilizó el sistema API 20E, complementado con las pruebas de producción de pigmento en agar triptona soja a 25°C, 48 h y hidrólisis de la esculina en agar bilis esculina a 37°C 24-48h.

El recuento de *E. sakazakii* se llevó a cabo mediante la técnica del número más probable (NMP) utilizando tres series de 10g, 1g y 0.1g de producto en agua de peptona tamponada. El enriquecimiento, aislamiento e identificación se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

Para establecer las relaciones clonales de las cepas aisladas en el producto y en el recién nacido, se realizó una electroforesis en campo pulsado (CHEF-DR II, BioRad) de los fragmentos de restricción del DNA cromosómico. Se utilizó el enzima de restricción Xba I (Roche Diagnostics) para digerir el DNA genómico total de la cepa. Los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 1.2%. La electroforesis se llevó a cabo con tampón Tris borato EDTA pH 8.4, 20h a 14°C en un campo eléctrico de 6 v/cm, con un pulso inicial y final de 5 y 12 seg, respectivamente. Como marcador de peso molecular se utilizó el fago lambda digerido con el enzima de restricción Hind III. Los patrones de macrorrestricción se interpretaron según los criterios de tipado epidemiológico establecidos por Tenover *et al*, 1995.

### **- Resultados y Discusión**

La inspección realizada en el Centro Hospitalario puso de manifiesto la falta de trazabilidad interna lo que no permitió confirmar si, en la preparación de los biberones durante el periodo de alimentación enteral, se utilizaron uno o ambos lotes del producto. También se observaron deficiencias en la preparación y conservación del preparado láctico una vez reconstituido.

*E. sakazakii* se detectó en las tres unidades de muestra del lote B, una de ellas abierta y otras dos cerradas. En ninguna de las muestras del lote A se detectó la presencia del microorganismo.

El recuento de *E. sakazakii* obtenido fue de 9 NMP/100g en las tres unidades de muestra contaminadas. El perfil bioquímico de los tres aislamientos fue el mismo (API 20E 3307373).

Las cepas aisladas en el neonato infectado y en el preparado en polvo para lactantes presentaron perfiles de restricción PFGE idénticos, lo que permite considerar un origen común de las cepas.

El hecho que se aislara la misma cepa de *E. sakazakii* en muestras no abiertas previamente y en la muestra que había sido utilizada indica que la contaminación del preparado para lactantes se produjo durante el proceso de fabricación y no fue debida a falta de higiene durante su reconstitución. Por otro lado, los aislamientos obtenidos en el lactante infectado y en las muestras del preparado analizadas compartían el mismo patrón de restricción, lo que confirma que el preparado en cuestión fue la fuente de infección. La baja concentración inicial de *E. sakazakii* en la leche en polvo junto con la deficiencias observadas en la conservación del producto reconstituido demuestra que el principal factor contribuyente fue el prolongado periodo de conservación del producto una vez reconstituido en condiciones de refrigeración a temperaturas superiores a la mínima de crecimiento del microorganismo (5.5-8°C), que permitió un aumento del nivel de contaminación hasta alcanzar la dosis infectiva.

### **- Conclusiones**

Los resultados de la investigación permitieron confirmar que el caso de encefalitis neonatal en la Unidad de Prematuros del Hospital fue debida a una contaminación por *E. sakazakii* intrínseca al preparado en polvo para prematuros.

La presencia de *E. sakazakii* en este tipo de productos, incluso a niveles de contaminación muy bajos, constituye un factor de riesgo, si las condiciones después de la reconstitución permiten la multiplicación del microorganismo especialmente en recién nacidos susceptibles.

### **- Referencias Bibliográficas**

- Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG and Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. Food Safety 2006; 42: 996-1002.

- Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C and Arad I. Infection in the newborn. Acta Paediatr 2001; 90: 356-358.
- Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Serie 10 – FAO/WHO (2006) (ISBN-92-5-105574-2).

## LA EFICACIA DEL ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO EN LA RECUPERACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE BIOFILMS DE *Listeria monocytogenes*

Salas-Vázquez D. I. y Rodríguez-Jerez J. J.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), España. Tel.: +34 935811448; fax: +34 935812006. Autor correspondiente: [dora.i.salas@gmail.com](mailto:dora.i.salas@gmail.com)

### 1. Introducción y Objetivos

*Listeria monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en las plantas de procesamiento, siendo la contaminación ambiental la causa más frecuente de su transmisión a productos terminados<sup>1</sup>. *L. monocytogenes* puede fijarse y adherirse a las superficies de procesamiento y formar biofilms que impiden la eficiencia de los procedimientos de higienización<sup>2</sup>. Por lo tanto, las superficies son una de las vías de contaminación más frecuentes en la industria alimentaria<sup>3</sup>. La causa de los brotes se atribuye a un manejo inadecuado, principalmente por contaminación cruzada<sup>4</sup>. Por lo tanto, *L. monocytogenes* continua representando una grave preocupación en las plantas procesadoras de alimentos debido a su habilidad a multiplicarse a temperaturas de refrigeración y crecimiento en un amplio rango de pH<sup>5</sup>. No obstante, los patógenos en superficies están sometidos a varios estreses físicos o químicos (calor, secado, agentes de limpiadores, etc.). Debido a que la recontaminación con patógenos puede ser una causa importante de los brotes<sup>6</sup>, los patógenos lesionados resultantes deberían ser considerados, tanto como sus contrapartes no lesionadas, especialmente *L. monocytogenes*, debido a su habilidad para sobrevivir a diversas condiciones ambientales<sup>7</sup>.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del enriquecimiento primario en la recuperación de células viables de biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies no porosas de acero inoxidable después de un tratamiento de estrés por sequedad.

### 2. Material y Métodos

Los discos (EN 13697) fueron inoculados con 5-10 células de *L. monocytogenes* (CCUG 15526) suspendidas en solución triptona-salina diluida. Los biofilms fueron desarrollados durante 72h en condiciones de humedad relativa elevada y posteriormente sometidos a un tratamiento de estrés por sequedad con flujo laminar durante 0, 6, 12, 24 y 72 h. En cada muestreo, una parte de los discos fue analizada por microscopía de epifluorescencia directa (DEM) aplicando la tinción vital LIVE/DEAD BacLight (L-13152; Molecular Probes, EUA) y para la recuperación de las células viables del biofilm, otra parte fue transferida a los medios de pre-enriquecimiento, caldo triptona soja con 6 g/l de extracto de levadura (TSBYE) y Demi Fraser (DFraser). Ambos medios, adicionados con Tween 80, fueron incubados durante 0, 6 y 25 h a 30 °C. Posteriormente, alícuotas de 0,1 ml se inocularon a 10 ml de caldo de enriquecimiento selectivo Fraser e incubados a 37 °C durante 48 h. Finalmente, se tomaron 0,5 ml del caldo Fraser para el análisis VIDAS LMO2 (bioMérieux).

### 3. Resultados y Discusión

El crecimiento de los biofilms se llevó a cabo simulando condiciones ambientales que podrían originarse en las superficies de una planta procesadora de alimentos sin aplicar un secado posterior a la higienización, sobre todo después de un lapso de inactividad laboral<sup>1,2,8</sup>. Después de la exposición a sequedad los recuentos de células viables por DEM y TSAYE mostraron una regresión lineal significativa ( $P < 0,05$ )<sup>9</sup>. Sin embargo, los coeficientes de regresión fueron dependientes del medio de pre-enriquecimiento utilizado para su recuperación, siendo mayor a partir de D-Fraser (0,9713) que con TSBYE (0,8232). Los recuentos de células viables a partir de D-Fraser ( $1,56 \pm 0,35 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) fueron menores que aquellos obtenidos a partir de TSBYE ( $2,58 \pm 0,16 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>), lo que puede indicar que algunas células inicialmente estresadas y lesionadas por sequedad, al entrar en contacto con el medio D-Fraser, fueron más susceptibles a los componentes selectivos del medio, lesionándose aún más, resultando letal o cambiando a un estado VBNC<sup>7,10</sup>. Al observar el efecto del medio de pre-enriquecimiento a los distintos tiempos de sequedad y con distintos tiempos de pre-enriquecimiento, *L. monocytogenes* demostró mejor habilidad para recuperarse en TSBYE que con D-Fraser. Presumiblemente, se atribuye a la acriflavina la escasa recuperación de las células del biofilm lesionadas por desecación<sup>11</sup>. Asimismo, la detección de las células lesionadas por desecación con VIDAS LMO2 a las 6 y 25 h de pre-enriquecimiento en TSBYE fue del 100%. No obstante, la detección con VIDAS LMO2 a las 6h de pre-enriquecimiento en D-Fraser fue nula; sin embargo, la detección con 25 h pre-enriquecimiento disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de

exposición a sequedad. A pesar de la alta especificidad de VIDAS LMO2, *L. monocytogenes* lesionada por desecación demostró inhabilidad para recuperarse en el medio D-Fraser y no alcanzar el umbral mínimo requerido<sup>12, 13</sup>.

#### 4. Conclusiones

Las bacterias que sobreviven a un tratamiento de estrés adquieren un daño subletal y a su vez una mayor sensibilidad. Por lo tanto, la composición del medio de enriquecimiento primario es un factor importante a ser considerado en la recuperación de células lesionadas por desecación de *L. monocytogenes*. Los factores que puedan interferir en la sensibilidad del método utilizado, y a la vez resultar inefectivo para la detección del patógeno, deben ser resaltados. La capacidad de las células de biofilms de *L. monocytogenes* de permanecer viables sobre las superficies secas de acero inoxidable representan un riesgo potencial de recontaminación.

#### 5. Referencias bibliográficas

1. Herald, P.J. y Zottola, E.A. **1988**. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*. 53(5):1549-1562.
2. Norwood, D.E. y Gilmour, A. **2001**. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*. 33(4):320-324.
3. Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., y Beumer, R.R. **2003**. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 85(3):227-236.
4. Tirado, C. y Schmidt, K. **2001**. WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*. 43(1):80-84.
5. Lin, C.-M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C., Meyer, J.D., Hall, P.A., y Doyle, M.P. **2006**. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69(1):71-79.
6. FAO/WHO BfR **2004**. Report 5th World Congress Foodborne Infections and Intoxications 7-11 June 2004, Berlin, Germany Federal Institute for Risk Assessment (Bundesinstitut für Risikobewertung). *Newsletter*. 81/82:1-8.
7. Suh, J.-H. y Knabel, S.J. **2001**. Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk. *Journal of Food Protection*. 64(1):30-36.
8. Leriche, V. y Carpentier, B. **2000**. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 88(4):594-605.
9. Maukonen, J., Mattila-Sandholm, T., y Wirtanen, G. **2000**. Metabolic indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 33(3):225-233.
10. Chae, M.S. y Schraft, H. **2001**. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiology*. 18(1):103-112.
11. Budu-Amoako, E., Toora, S., Ablett, R.F., y Smith, J. **1992**. Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat-injured and freeze-injured *Listeria monocytogenes* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(9):3177-3179.
12. Keith, M. **1997**. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of Salmonellae in foods. *Journal of Food Protection*. 60(6):682-685.
13. Gasanov, U., Hughes, D., y Hansbro, P.M. **2005**. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(5):851-875.

## DESARROLLO DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE QUINOLONAS EN ALIMENTOS.

Sanz, D., Catalán, E., Razquin, P., Mata, L.

ZEU-Inmunotec, S.L., Zaragoza (España)

### Introducción y objetivos:

La detección de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos y, especialmente de antibióticos y sulfamidas, tiene una gran importancia debido a sus repercusiones en la Salud Pública, así como sobre algunos procesos tecnológicos de fermentación (OMS, 2001). Dada la gran variedad de residuos que pueden encontrarse presentes en los alimentos de origen animal, su detección se suele realizar, en un primer paso, mediante los denominados test microbianos de cribado o *screening*. La mayoría de estos test utilizan como especie diana *Geobacillus stearothermophilus*, microorganismo que presenta una insuficiente sensibilidad para la detección de quinolonas (Cullor y col., 1994). Según diversos autores, el empleo de la cepa *E. coli* ATCC 11303 permite detectar con fiabilidad residuos de quinolonas en alimentos de acuerdo a los niveles exigidos por la legislación (Calderón y col., 1996; Gaudin y col., 2004).

Los objetivos de nuestra investigación fueron:

1. Desarrollar un test cualitativo y sencillo en formato de tubo, basado en *E. coli* ATCC 11303, capaz de detectar residuos de quinolonas en varias matrices alimentarias (carne, leche, huevos).
2. Determinar la sensibilidad del test desarrollado frente a distintas quinolonas en diversas matrices alimentarias (carne, leche, huevos).
3. Evaluar la especificidad del test, determinando la sensibilidad del mismo frente a antibióticos distintos de las quinolonas y sulfamidas.

### Material y métodos:

**Muestras y patrones:** Los antibióticos y sulfamidas empleados en este estudio fueron suministrados por Sigma (norfloxacina, doxiciclina, tilosina, neomicina, penicilina G, sulfatiazol), Fluka Analytical (enrofloxacina, ciprofloxacina) y Riedel-de Haën (marbofloxacina, sarafloxacina). En cada ensayo, a partir de soluciones madre (1 mg/ml) se prepararon las diluciones correspondientes de cada uno de los antibióticos y sulfamidas utilizados. Se comprobó previamente la ausencia de residuos de antibióticos o sulfamidas en la carne, leche y huevos empleados en el estudio. El extracto de carne se obtuvo a partir de carne de ternera comercial (aguja), sometida a un tratamiento térmico en agua hirviendo (3 minutos) en trozos de  $3 \pm 0,5$  g. El fluido obtenido fue centrifugado (8500 g, 10 min) y congelado hasta el momento de su empleo. La leche cruda se sometió a un desnatado (5000g, 10 min, 28°C), filtrado en lana de vidrio, calentamiento (10 min, 80°C) y dilución final en agua destilada (1/3 en vaca y 1/6 en oveja). Los huevos utilizados fueron homogeneizados y diluidos 1/3 en agua destilada.

**Procedimiento:** El test desarrollado (Equinox) se presenta en forma de viales con células liofilizadas de *E. coli* ATCC 11303, que deben reconstituirse con el medio específico (con un indicador de óxido-reducción). El ensayo se realiza en placa multipocillo, añadiendo en cada pocillo 50 µl de la muestra-patrón y 200 µl de *E. coli* reconstituido. Una vez sellado el pocillo, se incuba a 37°C durante 16-20 h; en este tiempo, y como resultado del crecimiento microbiano, se produce la reducción del medio y el viraje del indicador de un color azul a naranja. Si la muestra contiene una concentración de quinolonas superior al límite de detección del test, el crecimiento microbiano se inhibirá, permaneciendo los pocillos de color azul.

**Interpretación de los resultados:** Atendiendo a una interpretación fotométrica, se considerará el ensayo concluido cuando los pocillos sembrados con un control negativo tengan una absorbancia inferior a 0,5 ( $ab_{590} - ab_{650}$ ). El punto de corte se establece sumando 0,4 unidades a la absorbancia de la muestra negativa, mientras que el umbral de sensibilidad corresponde a aquella concentración en la cual el 100% de los pocillos (8-10 réplicas) den lugar a valores de absorbancia considerados como positivos.

## Resultados y discusión

La sensibilidad de Equinox frente a distintas quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, sarafloxacina, marbofloxacina) en diversas matrices alimentarias (carne, leche de oveja y vaca, huevos) se resume en la tabla 1. Como demuestran los datos, el test es capaz de detectar con fiabilidad concentraciones de las quinolonas evaluadas en torno a los LMR (UE) fijados para cada una de ellas. Además, los resultados obtenidos a partir de criterios fotométricos y por medio de lectura visual -realizada por 4 evaluadores entrenados- fueron idénticos en todos los casos. Este hecho es de notable importancia, ya que le otorga una versatilidad al test que lo hace apto para ser utilizado en diversos ámbitos con diferente grado de equipamiento.

Por otra parte, se evaluó la especificidad de Equinox determinando su sensibilidad frente a otros antibióticos (distintos de quinolonas) y a sulfamidas. Muestras de extracto de ternera que contenían concentraciones de estos compuestos muy superiores a los umbrales máximos permitidos por la legislación (doxiciclina: 1000 ppb; penicilina G: 500 ppb; tilosina: 500 ppb; sulfatiazol: 1000 ppb; neomicina: 1000 ppb) fueron consideradas como negativas por Equinox. Estos datos confirman la gran especificidad del test para la detección de quinolonas: mientras que es necesaria la presencia de niveles muy altos de otros antibióticos/sulfamidas para dar lugar a un positivo en Equinox, residuos de quinolonas en torno al LMR serán detectados como positivos.

Actualmente existen técnicas muy diversas para la detección y cuantificación de residuos de quinolonas en distintas matrices alimentarias. Algunas de ellas deben emplearse a modo de confirmación o identificación, dado que son técnicas relativamente costosas, que requieren un instrumental especializado y que permiten procesar un número limitado de muestras de forma simultánea. Por otra parte, se han desarrollado técnicas microbiológicas de cribado/postcribado, más asequibles y sencillas, aunque presentan una serie de importantes inconvenientes (laboriosidad, difícil interpretación de los resultados, necesidad de mantener cultivos frescos, etc).

## Conclusiones

El empleo de Equinox complementa perfectamente el espectro de detección de los test de cribado basados en *Geobacillus stearothermophilus*. Equinox puede ser empleado como un test cualitativo, sencillo, económico y fiable para la detección de quinolonas en diversas matrices alimentarias.

	TERNERA		LECHE VACA		LECHE OVEJA		HUEVO	
	umbral	LMR (UE)	umbral	LMR (UE)	umbral	LMR (UE)	umbral	LMR (UE)
ENROFLOXACINA	100	100*	200	100*	400	100*	100	×
NORFLOXACINA	200	-	200	-	500	-	300	×
SARAFLOXACINA	100	-	300	-	500	-	200	×
CIPROFLOXACINA	25	100*	50	100*	100	100*	50	×
MARBOFLOXACINA	100	150	150	75	300	-	200	×

Tabla 1: Umbrales de sensibilidad ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  o ppb) de EQUINOX para diversas quinolonas en carne de ternera, leche de vaca, leche de oveja y huevo de gallina. (\*): suma de enrofloxacina y ciprofloxacina; (-): no existe LMR para ese compuesto; (×): no está permitido su uso en animales que produzcan huevos destinados al consumo humano (UE).

## Referencias Bibliográficas:

- Calderón, V., González, J., Díez, P., Berenguer, J. A. 1996. Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solutions of antimicrobials. Food Addit Contam 13(1), 13-9.
- Cullor, J. S., Van Eenennaam, A., Gardner, I., Perani, L., Dellinger, J., Smith, W. L., Thompson, T., Payne, M. A., Jensen, L. y Guterbock, W. M. 1994. Performance of various tests used to screen antibiotic residues in milk samples from individual animals. JAOAC Int. 77, 862-870.
- Gaudin, V., Maris, P., Fuselier, R., Ribouchon, J. L., Cadieu, N. y Rault, A. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. Food Addit Contam 21(5), 422-33.
- OMS. 2001. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups.

## UN NUEVO MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN RÁPIDA DE ADN GENÓMICO DE SUSPENSIONES BACTERIANAS PARA SU USO EN PCR A TIEMPO REAL

Ruiz-Rueda O., Soler M., Bonjoch X., Calvó L. y García-Gil, L.J.

Depto. De I+D. Microbial. Sistemas y Aplicaciones Analíticas SL  
Parque Científico y Tecnológico de la UdG. Edifici. J. Casademont, puerta E. Pic de Peguera 15.  
17003 Girona. [olaya.ruiz@microbial-systems.com](mailto:olaya.ruiz@microbial-systems.com)

### - Introducción y Objetivos

En el análisis de bacterias patógenas por PCR, la preparación de la muestra es tan importante como la propia detección. Dentro de esta preparación, la extracción de ADN cada vez más se revela como un paso crítico, pues de él se obtiene el analito de la técnica (ADN). En la actualidad existen dos tipos de extracción de ADN, dependiendo de si ofrecen o no una etapa de purificación, generalmente mediante adsorción y lavado del ADN a una columna con membrana de sílica.

En la investigación de *Salmonella* y *Listeria*, los cultivos “overnight” en agua de peptona tamponada (APT) o Half Fraser, ofrecen un material muy enriquecido en bacterias, donde que la presencia de inhibidores depende en gran medida de la matriz analizada. Cuando los inhibidores no son un problema, la etapa de purificación no es necesaria, por lo que es mucho más conveniente usar sistemas de extracción de ADN sin columna. Ante la variedad de métodos no sólo debe escogerse el más adecuado a la muestra sino que muchos laboratorios por su volumen de análisis buscan aquél que a su vez requiera menos tiempo y recursos El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema de extracción de ADN rápido sin columna que superara a los métodos actuales.

### - Material y Métodos

Para la comparación de distintos métodos de extracción se utilizaron distintas matrices alimentarias (lácteos, huevo, carne cruda, carne curada, plato precocinado congelado, salmón ahumado, mojama, ensalada, fruta, zumos, helado) a partir de las cuales se prepararon 2 réplicas de enriquecimientos independientes en medio APT (Biokar Diagnostics, Fr) y Half Fraser (Biokar Diagnostics, Fr), inoculados con 10 y 1000 ufc. procedentes de cultivos “overnight” de *Salmonella choleraesuis* spp. *choleraesuis* (cepa 4139 CECT) y *Listeria monocytogenes* (cepa 4032 CECT), respectivamente. Las muestras se homogeneizaron durante 1 minuto en bolsas de “stomacher”, y después de 24 horas de incubación a 37°C se llevó a cabo la extracción de ADN partiendo de 1 ml de los enriquecimientos. El método desarrollado (DNAget) se usó según el protocolo optimizado: 200 µl de tampón de lisis, incubación 30 min a 56 °C, 10 min a 95°C, 5 min a -20°C. Los métodos comparados fueron: Freeze and thaw: 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>o</sub>, 3 ciclos de 5 min a 95 °C y 5 min a -20 °C con paso final de centrifugación de 5 min a 11.000 × g. Chelex 100: 300 µl Chelex®, incubación 20 min a 56 °C, 10 min a 100 °C y 2 min en hielo. Paso final de centrifugación de 5 min a 11.000 × g. Nucleospin® tissue DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) según especificaciones del fabricante.

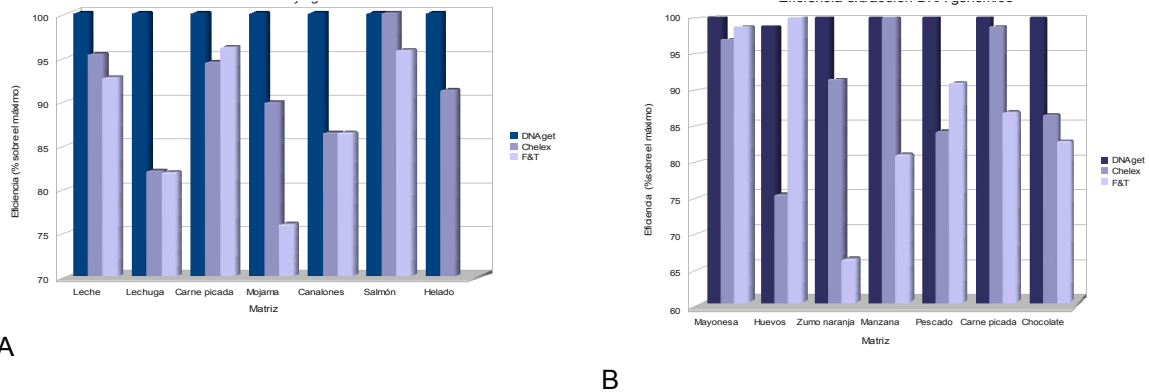
La eficiencia de la extracción se evaluó por PCR a tiempo real, en un termociclador Stratagene MX3000, utilizando los kits Salmofast y Listerfast (Microbial SL) siguiendo las instrucciones incluidas, considerando el valor de Ct como medida integrada de la cantidad y pureza del ADN obtenido.

### - Resultados y Discusión

De entre los distintos métodos ensayados, la mayor eficiencia, definida como la combinación de la cantidad de ADN más la pureza del mismo, correspondió a DNAget en todos los casos excepto en huevos y para ambos medios de enriquecimiento. DNAget se mostró especialmente eficaz (>15%) con lechuga mojama y canelones y en huevos, pescado y chocolate, para *Listeria* y *Salmonella*, respectivamente (Figura 1). Los resultados demuestran que con un método es eficaz, la ausencia de un paso de purificación físico-química en una columna con una membrana de sílica no presupone un problema en el caso de los enriquecimientos con suspensiones bacterianas, puesto que la densidad celular es suficientemente elevada para soportar los posibles retrasos en la aparición del positivo (valor de Ct) debido a la presencia de sustancias parcialmente inhibitoras. Estos retrasos son una medida de las pérdidas asumidas al no usar método con purificación en columna. La tabla 2 recoge las variaciones en relación a un método con columna. DNAget sufre un retraso medio de 2,4 unidades

de Ct lo que en términos cuantitativos significa un factor de pérdida efectiva de analito de 0,72 unidades logarítmicas (5 veces menor), comparada con pérdidas de 1,2 y 1,82 unidades logarítmicas (15 y 66 veces menor cantidad efectiva de ADN) en Chelex y F&T, respectivamente.

Figura 1. Comparación de la eficiencia de los tres métodos de extracción de ADN genómico sin columna comparados. A: *Listeria monocytogenes*; B: *Salmonella* spp.



A

B

Método	Variación (unidades Ct)	
	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
DNAget	2,3	2,4
Chelex	4,8	3,2
Freeze &Thaw	5,6	6,3

Tabla 2. Variación en relación al DNA purificado mediante columna (Nucleospin, Macherey-Nagel)

Otro aspecto a tener en cuenta en el uso de un método de extracción de ADN para laboratorios con elevado volumen de análisis es la simplicidad de su uso, el tiempo empleado y el coste por muestra. Si comparamos los distintos métodos ensayados se observa que DNAget ofrece las mayores ventajas operativas: una centrifugación, dos pasos de pipeteo, un cambio de tubo y menos de una hora de duración (tabla 3)

Característica	Nucleospin Macherey-Nagel	DNAget Microbial	Chelex Biorad	F&T
Pasos centrifugación	6	1	2	2
Pasos pipeteo	10	2	3	3
Cambios de tubo	3	1	2	2
Coste por reacción (€)	>3	<1,5	<1,5	<1,5
Tiempo (h)*	2h 30min	1h	1h 20min	1h 30min
Cambios de T <sup>a</sup>	2	3	3	7

Tabla 3. Ventajas operativas del uso de DNAget en relación a otros sistemas de extracción de ADN.

\*Calculado para 20 extracciones

## - Conclusiones

De los distintos métodos sin columna ensayados DNAget (Microbial SL) es una elección adecuada para la extracción de ADN en suspensiones bacterianas previa a su análisis por PCR. El estudio pone de manifiesto que se puede obtener un rendimiento aceptable en la extracción de ADN previa a PCR con un producto (DNAget, Microbial) que solamente requiere un paso de centrifugación, dos pipeteos, un cambio de tubo y menos de 60 minutos todo ello con costes muy inferiores a los métodos con columna.

## - Referencias Bibliográficas

- Bartlett, J.M.S. and D. Stirling. *PCR Protocols*. Humana Press. 2003
- MacKay, I. *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Horizon Scientific Press. 2007

## ADAPTACIÓN DE LA NORMA EN 13697 PARA EVALUAR EL EFECTO RESIDUAL DE DESINFECTANTES SOBRE SUPERFICIES

Ríos Castillo, A. G.; Salas Vázquez, D. I.; Rodríguez Jerez, J.J.

Departamento de Ciencia animal y de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.

### 1. Introducción y Objetivos

En el proceso de desinfección, la efectividad de un desinfectante esta condicionado por factores como son: la temperatura, el pH, el efecto de las condiciones limpias o sucias, la concentración y el tiempo de contacto.<sup>1</sup> Se ha observado que pocas horas después de la desinfección la mayoría de las superficies vuelven a encontrarse contaminadas presentado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos.<sup>2</sup> Dentro del sector de las industrias de alimentos una preocupación permanente es seleccionar desinfectantes que sean seguros y que posean acción antibacteriana prolongada sobre las superficies tratadas.<sup>3</sup> El objetivo del presente estudio fue adaptar la Norma EN 13697<sup>4</sup> para evaluar el efecto residual sobre superficies después de aplicar desinfectantes.

### 2. Material y Métodos

Se utilizaron discos de acero inoxidable (2 cm de diámetro) como soporte para la evaluación, los cuales fueron preparados conforme a la Norma UNE EN 13697. Los desinfectantes utilizados fueron cuatro formulaciones a base de amonio cuaternario y cinco a base de hipoclorito de sodio. En el centro de los discos se aplicaron 100 µl de la solución desinfectante al 25, 50, y 100% v/v, la cual fue dispersada sobre toda la superficie. Posteriormente se sometieron a un secado a 20 °C. Inmediatamente tras su secado, 0 h, y después de 24 h fueron inoculados con 50 µl de una suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus hirae* ATCC 10541, ambas con  $1,5 - 5 \times 10^8$  células. La solución desinfectante permaneció en contacto con la superficie durante 30 min. Después se inactivó el desinfectante colocando los discos en un medio neutralizante adecuado.<sup>4</sup> Finalmente, se recuperó y cuantificó el número de microorganismos de las superficies. En base a las Normas UNE EN 1040 y UNE EN 13697 y contemplando la perdida de efectividad del desinfectante, se estableció un efecto residual bactericida cuando el desinfectante mostró una reducción de 3 unidades logarítmicas después de 24 horas.<sup>4-5</sup>

### 3. Resultados y Discusión

Los resultados mostraron para todos los productos a base de amonio cuaternario, a las 24 h, un efecto residual bactericida, que indica una elevada estabilidad como desinfectante y alta eficacia contra *S. aureus* y *E. hirae*.<sup>6-7</sup> Respecto a los productos a base de hipoclorito de sodio todos presentaron acción bactericida a las 0 horas. Sin embargo, el efecto residual bactericida a 24 horas fue dependiente de la formulación para ambas cepas de estudio. Respecto a la resistencia entre las cepas, *S. aureus* presentó una mayor resistencia para los productos a base de hipoclorito de sodio a 24 horas.

Aunque, no enjuagar el desinfectante tras su aplicación puede ser una práctica no aceptable para superficies de equipos relacionados con la leche y el huevo, no obstante puede ser permitida en el resto de las superficies de producción alimentaria, garantizando que no sean tóxicos, ni contaminantes.<sup>8-9</sup>

### 4. Conclusiones

El incremento de la tendencia a no enjuagar tras la aplicación de los desinfectantes antes de reiniciar la producción, requiere de metodologías que evalúen la existencia de un verdadero efecto residual. Por lo tanto, la metodología propuesta en base a la Norma UNE EN 13697 es funcional para la evaluación del efecto residual bactericida de los desinfectantes a base de amonio cuaternario e hipoclorito de sodio sobre superficies no porosas de acero inoxidable.

## **5. Referencias Bibliográficas**

- 1.- Holah, J. 1995. Special needs for disinfectants in food-handling establishment. *Sci Tech*; 14(1):95-104.
- 2.- Scott, E. *et al.* 1984. Evaluation of disinfectants in the domestic environment under "in use" conditions. *Journal of Hygiene*, 92, 193-203.
- 3.- Carballo, J. 2001. Adherencia de bacterias a superficies de contacto con alimentos. *Alimentaria*. 320:19-26.
- 4.- Anónimo. 2002. AENOR, UNE-EN 13697. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (fase 2/etapa 2).
- 5.- Anónimo. 1997. AENOR, UNE-EN 1040. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1).
- 6.- Eaton, T. Gasson, M. 2001. The use "Enterococcus" in food requires safety evaluation. *Applied and Environmental Microbiol.* 67:1628-35.
- 7.- Kusumaningrum, H. *et al.* 2003. Tolerance of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to surface cleaning and household bleach. *J Food Protection*. 66(12):2289-95.
- 8.- Anónimo. 1989. Council Directive 89/437/EEC. Of 20 June 1989 on hygiene and health problems affecting the production and the placing on the market of egg products. *Official Journal of the European Communities*, L 122.
- 9.- Holah, J. *et al.* 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 92(s1):111S-120S.

**LA NUEVA REVISTA DE SPRINGER “FOOD ANALYTICAL METHODS”: UNA PLATAFORMA INTEGRAL PARA EL ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS**

**David Rodríguez Lázaro**  
**Editor-in-chief “FOOD ANALYTICAL METHODS”, Springer Verlag New York**

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Ctra Burgos Km 119. 47.071 Valladolid

La incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos se ha incrementado considerablemente durante los últimos años por la rápida globalización del mercado alimentario, el incremento del movimiento de personas y alimentos y por los profundos cambios en los hábitos de consumo alimentario. Además, la calidad de los alimentos es altamente demandada por los consumidores, ya que ellos esperan que los productos que consumen sean de calidad, saludables, y seguros. Esto también es un asunto fundamental para los productores y distribuidores de alimentos ya que éstos desean satisfacer las tendencias actuales en el consumo de alimentos que demandan una mejor cualidad y un amplia diversidad de productos para elegir. Por lo tanto, la aplicación de controles exhaustivos dentro de los programas de aseguramiento de la Calidad y Seguridad de la dentro de la cadena alimentaria es necesaria para minimizar el riesgo de enfermedad a los consumidores, y para garantizar, por otro lado, la calidad de los productos que se producen y consumen. Consecuentemente, existe una clara necesidad de desarrollar y optimizar estrategias para la implantación práctica y efectiva de metodologías analíticas alimentarias.

Por ello la editorial Springer ha lanzado la nueva revista “**Food Analytical Methods**” ([www.springer.com/12161](http://www.springer.com/12161)), cuyo primer número ha salido el mes de marzo de 2.008. El objetivo esta revista es publicar artículos originales y revisiones críticas sobre nuevos métodos de análisis alimentarios, sobre las problemáticas actuales que deben ser solucionadas así como sobre mejoras significativas o nuevas aplicaciones interesantes de los métodos existentes en el análisis de alimentos. Esta revista hará especial énfasis en la caracterización y cuantificación de contaminantes microbianos y químicos, alérgenos alimentarios, residuos de medicamentos, organismos modificados genéticamente, y en la identificación y caracterización de los ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos (Tabla 1).

---

**Tabla 1. Contenidos de la revista “Food Analytical Methods”**

---

**Microbiología de los alimentos:**

- Caracterización, cuantificación y trazabilidad de microorganismos patógenos de origen alimentario.
- Caracterización, cuantificación y trazabilidad de microorganismos alterantes de los alimentos.
- Caracterización, cuantificación y trazabilidad de microorganismos de interés para la Industria Alimentaria.
- Caracterización y trazabilidad de microorganismos resistentes a antibióticos transmitidos por los alimentos.

**Química y Toxicología de los alimentos:**

- Determinación de saborizantes y coadyuvantes alimentarios.
- Determinación de aditivos y productos o sustancias utilizados en alimentación animal.
- Identificación de alérgenos alimentarios en alimentos.
- Determinación de tóxicos naturales en alimentos.
- Determinación de plaguicidas en alimentos y productos de alimentación animal.
- Identificación, caracterización, cuantificación de micotoxinas en alimentos.
- Determinación de sustancias no autorizadas en alimentos.
- Determinación de residuos de antibióticos o fármacos en alimentos.
- Determinación de la presencia de materiales en contacto con los alimentarios.

**Calidad Alimentaria:**

- Detección e identificación de organismos modificados genéticamente en alimentos.
- Detección de alimentos o ingredientes derivados de “nuevos productos alimentarios”.
- Evaluación del bienestar animal.

**Autenticación alimentaria:**

- Identificación de la naturaleza o especie de los ingredientes de los productos utilizados en alimentación humana y animal (e.g. origen animal o vegetal de alimentos o harinas).
- Determinación del origen geográfico de los alimentos.
- Determinación de productos alimentarios obtenidos de la agricultura ecológica o sostenible.

**Trazabilidad alimentaria:**

- Contenido, gestión, implementación práctica y costes de las regulaciones nacionales o internacionales o acuerdos contractuales en trazabilidad alimentaria.
-

Para ello, la revista “**Food Analytical Methods**” cuenta con un equipo editorial internacional con una contrastada experiencia en los distintos campos que comprende el análisis alimentario (Figura 1).



### **Editor in chief**

**Dr. David Rodríguez-Lázaro**

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Spain)

### **Associate editors**

**Dr. Yves Bertheau**

INRA (France)

**Prof. Albert Bosch**

University of Barcelona (Spain)

**Dr. Nigel Cook**

Central Science Laboratory (UK)

**Dr. Samuel BenRejeb Godofroy**

Health Canada.

**Prof. Bernadene Magnuson**

Cantox Health Sciences International (Canada)

**Dr. Roland E. Poms**

International Association for Cereal Science and Technology (Austria)

### **Editorial board**

**Dr. Henk Aarts**

RIKILT – Institute of Food Safety (The Netherlands)

**Dr. Enke Anklam**

European Institute for Reference Materials and Measurements

**Dr. Sabah Bidawid**

Health Canada (Canada)

**Dr. Arvind A. Bhagwat**

United States Department of Agriculture (USA)

**Prof. Doris D'Souza**

University of Tennessee (USA)

**Prof. Maria Teresa Destro**

University of Sao Paulo (Brazil)

**Prof. Francisco Diez-Gonzalez**

University of Minnesota (USA)

**Dr. Max Feinberg**

INRA (France)

**Dr. Pina Fratamico**

United States Department of Agriculture (USA)

**Dr. Reiner Helmuth**

Federal Institute for Risk Assessment (Germany)

**Dr. Marta Hernandez**

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL)

**Dr. Arne Holst-Jensen**

National Veterinary Institute (Norway)

**Dr. Marta Hugas**

European Food Safety Authority

**Prof. Sophia Kathariou**

North Caroline State University (USA)

**Prof. Wolfgang Kneifel**

University of Natural Resources and Applied Life Sciences (Austria)

**Dr. Tomas Kuchta**

Food Research Institute (Slovakia)

**Dr. Alexandre Leclercq**

Institut Pasteur, Paris (France)

**Dr. Bertrand Lombard**

French Agency for Food Safety (France)

**Dr. Semir Loncarevic**

National Veterinary Institute (Norway)

**Prof. Ivo Pavlik**

Veterinary Research Institute (Czech Republic)

**Dr. Bert Pöpping**

Eurofins (Germany)

**Dr. Luis Rodriguez-Saona**

Ohio State University (USA)

**Dr. Artur Rzezutka**

National Veterinary Research Institute (Poland)

**Dr. Samin Saner**

Turkish Food Safety Organisation (Turkey)

**Prof. Huw Smith**

Scottish Parasite Diagnostic Laboratory (UK)

**Prof. Fidel Toldrá**

IATA-CSIC (Spain)

**Dr. Shui Tu**

United States Department of Agriculture (USA)

**Dr. Guy Van den Eede**

European Institute for Health and Consumer Protection (JRC-IHCP)

**Prof. Martin Wagner**

Veterinärmedizinische Universität Wien (Austria)

**Prof. Martin Wiedmann**

Cornell University (USA)

**Prof. Jana Žel**

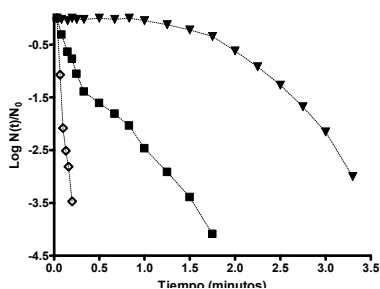
National Institute of Biology (Slovenia)

DESARROLLO DE TERMORRESISTENCIA EN *Enterobacter sakazakii*Arroyo C.<sup>1</sup>, Cebrían G.<sup>1</sup>, Álvarez I.<sup>1</sup>, Pagán R.<sup>1</sup> y Condón S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, carroyoc@unizar.es

**Introducción y objetivos:**

El aumento de la termorresistencia microbiana con el tiempo de cultivo es un hecho bien conocido, y suele estabilizarse al entrar las células en la fase estacionaria de crecimiento. Habitualmente la inactivación celular sigue un orden exponencial por lo que este aumento de termorresistencia se manifiesta con una disminución de la pendiente de las líneas de supervivencia. Ocasionalmente se ha observado que el desarrollo de resistencia con el tiempo de incubación da lugar a la aparición de hombros en las gráficas de supervivencia (1). A nuestro entender, ambos comportamientos podrían deberse a la existencia de dos mecanismos diferentes de desarrollo de resistencia.



**Figura 1.** Gráficas de supervivencia a 60°C de *E. sakazakii* a las: ◇8, ■24 y ▼96 horas de incubación

Al realizar un estudio rutinario sobre el efecto del tiempo de incubación en la termorresistencia de *Enterobacter sakazakii* – un patógeno emergente – observamos que las gráficas de supervivencia mostraban un perfil recto en la fase logarítmica de crecimiento (8 horas de incubación), un perfil sigmoideo tras 24 horas, y uno convexo tras 96 horas de incubación, tal como ilustra la figura 1. No existe por el momento ninguna explicación para este anormal comportamiento, ni ningún modelo matemático que permita ajustar curvas con perfiles sigmoideos. Esta investigación se planteó con objeto de subsanar ambas deficiencias.

Notándose que en *E. sakazakii* coexisten dos mecanismos de desarrollo de termorresistencia: el primero se desencadena al progresar la fase logarítmica de crecimiento y se manifiesta con un incremento en la pendiente de las gráficas de supervivencia, y el segundo, de mayor magnitud, se produce a lo largo de la fase estacionaria de crecimiento afectando cada vez a un mayor número de células y que se manifiesta con la aparición de un hombro relacionado con la capacidad de recuperación celular. De esta forma, a lo largo de la fase estacionaria coexistirían dos subpoblaciones de *E. sakazakii* de distinta termorresistencia, una que seguiría un curso de inactivación exponencial y otra que presentaría un perfil convexo. La primera subpoblación sería mayoritaria al alcanzarse la fase estacionaria de crecimiento y posteriormente iría disminuyendo en beneficio de la segunda, que terminaría por representar la totalidad de la población al cabo de 96 horas de incubación. De esta manera, todas las gráficas de supervivencia podrían describirse mediante una ecuación que integrara las cinéticas de inactivación de ambas subpoblaciones. Esta ecuación nos permitiría además cuantificar la termorresistencia de cada subpoblación y establecer la velocidad de transformación de una subpoblación en la otra.

**Material y Métodos:**

Las suspensiones de *E. sakazakii* CECT 858 se obtuvieron cultivando las células en TSB + EL (0,6%) a 30°C. Tras incubaciones de 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas se realizaron las determinaciones de termorresistencia a 60 °C según hemos descrito previamente (2). La recuperación de supervivientes se realizó en TSA + EL (0,6%) a 30 °C durante 24 horas, y el recuento con un contador automático según hemos descrito (3). El desarrollo del modelo matemático se realizó con las herramientas Solver y GraphPad Prism 4.

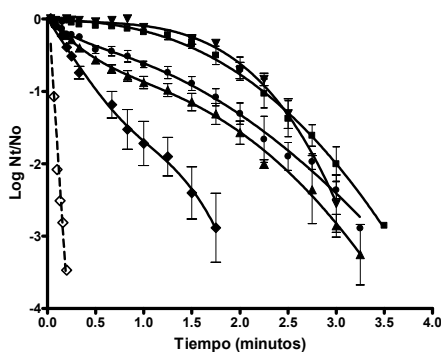
**Resultados:**

La tabla 1 muestra (A) la ecuación que describe la cinética lineal de inactivación definida por el parámetro  $D_T$ , (B) la ecuación correspondiente a la cinética de inactivación no lineal, basada en un

modelo weibulliano, viene definida por los parámetros de escala -b- y de forma -n-, y (C) la ecuación de nuestro modelo obtenido por integración de las anteriores, donde  $p$  y  $(1-p)$  representan la proporción de cada una de las dos subpoblaciones. La figura 2 muestra el ajuste de los datos experimentales a las curvas de supervivencia teóricas, calculadas con el modelo desarrollado; y la tabla 2 la proporción de ambas subpoblaciones a lo largo de una incubación prolongada, así como los parámetros del modelo que describen su termorresistencia.

<p>(A) <math>\log N(t) = \log N_0 - \frac{t}{D_T}</math></p>	<p>(B) <math>\log N(t)/N_0 = -\left(\frac{t}{b}\right)^n</math></p>
<p>(C) <math>\log N(t)/N_0 = \log \left[ p \cdot e^{-\left(\frac{t}{D_T}\right)} + (1-p) \cdot e^{-\left(\frac{t}{b-D_T \cdot \log(1-p)}\right)^n} \right]</math></p>	

Tabla 1. (A, B) Ecuaciones parciales y (C) ecuación global del modelo.



	8h	24h	48h	72h	96h	120h
<b>p</b>	1	0,984	0,839	0,719	-	-
<b>D<sub>60</sub></b>	0,05	0,484	0,629	0,73	-	-
<b>b</b>	-	0,806	1,724	1,861	2,247	2,292
<b>n</b>	-	3.98	2,372	2,386	2,429	3.662

Figura 2. Gráficas de supervivencia a 60°C de suspensiones de *E. sakazakii* tras: ◇ 8 h, ♦ 24h, ▲ 48h, ● 72h, ▼ 96h y ■ 120h, de incubación.

Tabla 2. Valores de los parámetros  $p$ ,  $D_{60}$  (min),  $b$  (min) y  $n$  del modelo para las gráficas de supervivencia de *E. sakazakii* a las 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación. **Conclusiones**

- Una ecuación basada en la coexistencia de dos poblaciones de diferente resistencia al calor y distintas cinéticas de inactivación permite modelizar con precisión todas las curvas de supervivencia de suspensiones de *E. sakazakii*, cualquiera que sea el tiempo de incubación.
- A partir de los parámetros de la ecuación puede deducirse que la fracción de la población más termorresistente aumenta linealmente con el tiempo de incubación, desde las 24 hasta las 72h.
- La termorresistencia de la fracción termosensible, que sigue un orden logarítmico de inactivación, aumenta diez veces al pasar de la fase logarítmica (8h) a la estacionaria de crecimiento (24h). Incubaciones adicionales apenas incrementan su termorresistencia.
- El tiempo necesario para inactivar al 90% de la población termorresistente es, para cada tiempo de incubación, entre 2 y 3 veces mayor que el necesario para inactivar a la población termosensible.

**Referencias bibliográficas**

(1) Condón, S., García M.L., Otero, A. y Sala F.J. 1992. Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Bacteriol. 72, 322-326.  
 (2) Condón, S., Arrizubieta, M.J. y Sala, F.J., 1993. Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. J. Microbiol. Methods 18, 357-366.  
 (3) Condón, S. Palop, A. Raso J. y Sala F.J., 1996 Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. Lett. Appl. Microbiol 22, 149-152.

## INFLUENCIA DEL FACTOR SIGMA $\square^B$ EN LA RESPUESTA AL CHOQUE TÉRMICO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Cebrián G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, C. y Mañas, P.

Dpto. de Producción Animal y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, guiceb@unizar.es

### Introducción y Objetivos

De todos los aspectos que conciernen a la inactivación microbiana por el calor el que a día de hoy sigue siendo el menos conocido es el de los mecanismos de resistencia que los microorganismos desarrollan frente a este agente. Tanto en el caso del calor, como en el de la resistencia a otros muchos agentes, la regulación de estos mecanismos depende en gran medida de la existencia de varias subunidades de reconocimiento, o también llamadas factores sigma, de la ARN polimerasa (Abee y Wouters, 1999). El factor sigma alternativo  $\square^B$  se considera el principal regulador de la respuesta al estrés de tipo general en las bacterias Gram positivas (Abee y Wouters, 1999; Gertz y col., 2000, Kullik y Giachino, 1997; van Schaik y Abee, 2005). Asimismo su importancia en el desarrollo de resistencia tras someter a las células microbianas Gram positivas a un choque térmico ha sido demostrada en *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes* (Benson y Haldenwang, 1993; Ferreira y col., 2001; Völker y col., 1994). No obstante la influencia de este factor sigma en la resistencia al estrés de *Staphylococcus aureus* todavía es, en gran parte, desconocida.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel del factor sigma alternativo  $\square^B$  en la resistencia al calor y en la respuesta al choque térmico de *Staphylococcus aureus*.

### Material y Métodos

La cepa *Staphylococcus aureus* Newman y su mutante isógeno  $\square^{sigB}$  se crecieron en TSB + EL (0,6 %) a 37 °C hasta que las suspensiones alcanzaron la fase exponencial ( $Abs_{600}=0,800$ ; aprox. 2,5-3 horas) y fase estacionaria de crecimiento (18-24 horas).

La termorresistencia de estas suspensiones se estudió mediante la utilización de un termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1996) según describen los autores. Las muestras extraídas del mismo se recuperaron en placas de Petri utilizando la técnica de siembra en masa en TSA + EL (0,6 %) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los recuentos de supervivientes se determinaron mediante la utilización de un contador automático de colonias modificado (Condón y col., 1993) y con estos valores se construyeron las gráficas de supervivencia a partir de las que se determinaron los valores  $D_{58}$  (tiempo para inactivar un ciclo logarítmico a 58 °C).

Para evaluar la presencia de daño subletal y el papel del factor  $\square^B$  en la reparación del mismo las suspensiones tratadas por calor también fueron recuperadas en presencia de cloruro sódico. La concentración del mismo fue del 12 % para la cepa *S. aureus* Newman y del 10 % para su mutante isógeno  $\square^{sigB}$  que corresponden a la CMNI (concentración máxima no inhibitoria).

El desarrollo de resistencia al calor tras un choque térmico en *S. aureus* se estudió mediante la incubación previa –preadaptación– a 45 °C de las células de *S. aureus* en fase estacionaria y exponencial de crecimiento durante diferentes periodos de tiempo. Posteriormente se determinó la termorresistencia de las poblaciones así adaptadas.

### Resultados y Discusión

La eliminación del operón *sigB* resultó en una disminución de aproximadamente 7 veces de los valores  $D_{58}$  de las células en fase estacionaria de crecimiento. Por el contrario, las células en fase exponencial de *S. aureus* Newman y su mutante isogénico  $\square^{sigB}$  presentaron una resistencia similar. Además las células de la cepa parental en fase exponencial fueron igual de sensibles al calor que la cepa  $\Delta sigB$  en fase estacionaria.

Las curvas de supervivencia de las células en fase estacionaria obtenidas tras la recuperación en medio selectivo (con NaCl) fueron prácticamente idénticas para la cepa parental y para el mutante  $\square^{sigB}$ . Esto demuestra que gran parte de las diferencias en resistencia en fase estacionaria de crecimiento existentes entre ambas cepas podría ser debida a la mayor capacidad de reparación del daño subletal en la cepa parental y que el mecanismo por el que el factor  $\square^B$  participa en la resistencia al calor de *S. aureus* es, al menos en este caso, a través de una mejora en la capacidad de reparación de este daño.

El choque térmico (45 °C; 5, 30, 120 minutos) condujo a un incremento de la termorresistencia en ambas cepas y en las dos fases de crecimiento. En todos los casos, el incremento en termorresistencia dependió del tiempo de choque, alcanzándose el valor máximo tras 120 minutos de choque. La magnitud de dicho incremento en fase exponencial de crecimiento fue mayor en el caso de la cepa parental en la que el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico pasó de 0,12 minutos (sin choque) a 3,16 minutos (tras 120 minutos de choque) frente al incremento de 0,12 a 1,5 minutos que se observó en las mismas condiciones en la cepa  $\square^{sigB}$ . De forma opuesta, el incremento en termorresistencia tras someter a las células en fase estacionaria a un choque térmico fue mayor para la cepa  $\square^{sigB}$ . Tanto la adición de cloranfenicol como la de rifampicina al medio de adaptación condujo a un menor desarrollo de resistencia demostrando que tanto la síntesis de RNA como la de proteínas se hallan implicadas en este fenómeno de desarrollo de resistencia. Este incremento en resistencia al calor se debió tanto a un aumento de la resistencia intrínseca como a un aumento en la capacidad de reparación del daño subletal como se evidenció mediante la siembra en medios selectivos y no selectivos tras el tratamiento térmico de las suspensiones de células nativas y adaptadas. Estos resultados demuestran que la respuesta al choque térmico se halla, en parte, regulada por mecanismos distintos del factor sigma  $\square^B$ .

### Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que  $\square^B$  desempeña un papel crucial en el incremento de resistencia al calor de *S. aureus* como consecuencia de la entrada en la fase estacionaria de crecimiento. Este incremento en termorresistencia estaría directamente relacionado con la capacidad de reparar los daños subletales causados por el calor. Por el contrario, el papel de  $\square^B$  en la respuesta al choque térmico parece ser menos importante dado que los mutantes  $\square^{sigB}$  también desarrollaron este tipo de respuesta adaptativa. Este segundo tipo de mecanismo de desarrollo de termorresistencia, el choque térmico, implica un incremento en la resistencia intrínseca de la célula además de una mayor capacidad de reparación del daño térmico.

### Referencias Bibliográficas

- Abee, T., y Wouters, J. A., 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 65-91.
- Benson, A. K. y Haldenwang, W. G., 1993. Regulation of  $\square^B$  levels and activity in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 2347-2356.
- Condón, S., Arrizubieta, M. J. y Sala, F. J., 1993. Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. *J. Microbiol. Methods* 18, 357-366.
- Condón, S., Palop, A., Raso J. y Sala F. J., 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 149-152.
- Ferreira A., O'Byrne C. P. y Boor K.J., 2001. Role of  $\square^B$  in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4454-4457.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A-K., Tischler K., Scharf, C., Hacker, J. y Hecker, M., 2000. Characterization of the  $\square^B$  regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 6983-6991.
- Kullik, I. y Giachino, P., 1997. The alternative sigma factor  $\square^B$  in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch. Microbiol.* 167, 151-159.
- Van Schaik, W. y Abee T., 2005. The role of  $\sigma^B$  in the stress response of Gram-positive bacteria-targets for food preservation and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 218-224.
- Völker, U., Maul, B. y Hecker M., 1999. Expression of the  $\sigma^B$ -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 3942-3948.

SESIÓN III. 16/09/08. HORA: 16.00-17.30 H.

## **PROBIÓTICOS**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DE EMBUTIDOS PARA SU POTENCIAL USO COMO PROBIÓTICOS EN EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS DE CERDO IBÉRICO.** (PAG 100)

S. RUIZ-MOYANO SECO DE HERRERA; A. MARTÍN GONZÁLEZ; M.J. BENITO BERNÁLDEZ; E. ARANDA MEDINA; A. HERNÁNDEZ LEÓN; M.J. SERRADILLA SÁNCHEZ; M.G. CÓRDOBA RAMOS  
**FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE AGAVE TEQUILANA WEBER COMO FUENTE DE CARBONO EN LA FERMENTACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.** (PAG 102)

J.R. SOLÍS PACHECO; MA.R. TORRES VITELA; M.T. REYES BLANCO; M.Y. BAÑNUELOS FERNÁNDEZ; B.R. AGUILAR USCANGA.

**PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE LACTOBACILLUS CASEI Y L. ACIDOPHILUS AISLADOS DE LECHE FERMENTADA.** (PAG 104)

M.R. TORRES VITELA; V. NAVARRO HIDALGO; L.E. GARAY MARTÍNEZ; A. VILLARRUEL LÓPEZ; I.O. OROZCO HERNÁNDEZ.

## **PRODUCTOS FERMENTADOS**

**ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE EXTRACTOS DE PARED CELULAR DE LEVADURAS TEQUILERAS.** (PAG 106)

B.R. AGUILAR USCANGA; J.R. SOLÍS PACHECO; M.L. NÚÑEZ VALLEJOS; V. GONZÁLEZ ÁLVAREZ; J.M. VIVEROS PAREDES.

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y TECNOLÓGICA DE AISLADOS DE LEUCONOSTOC DE QUESO DE DENOMINACIÓN DE ORIGEN "MANCHEGO".** (PAG 108)

P. NIETO ARRIBAS; S. SESEÑA; J.M. POVEDA COLADO; M.L.L. PALOP HERREROS; I. CABEZAS REDONDO.

## **MICROORGANISMOS ALTERANTES**

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR DE CEPAS DE SALMONELLA AISLADAS DE CARNE DE POLLO DE TÁNGER.** (PAG 110)

J. BENAZZOUZ; M. MAADOUZI; T. SOTO ESTERAS; A. ECHEITA; S. BARRIJAL.

## **OTRA**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CUATRO ACEITES ESENCIALES Y SUS ÓLEO-RESINAS DE USO COMERCIAL.** (PAG 112)

J.M. RODRÍGUEZ-CALLEJA; M. CRUZ-ROMERO; M.L. GARCÍA-LÓPEZ; J.P. KERRY.

**BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS EN PASTAS Y ORUJOS DE ACEITUNAS: ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE INTERÉS.** (PAG 114)

S. ROMO-SÁNCHEZ; M. ARÉVALO-VILLENA; J. ÚBEDA; A. BRIONES.

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DE EMBUTIDOS PARA SU  
POTENCIAL USO COMO PROBIÓTICOS EN EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS DE CERDO  
IBÉRICO**

***Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M.J., Aranda E., Hernández A., Serradilla M.J. y Córdoba M.G.***

*Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Área de Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura. Carretera de Cáceres s/n, 06071, Badajoz, [srmsh@unex.es](mailto:srmsh@unex.es)*

**- Introducción y Objetivos**

Las bacterias probióticas son utilizadas en los alimentos por su capacidad de producir un efecto beneficioso sobre una o varias funciones del organismo. Para desarrollar sus efectos beneficiosos, los microorganismos probióticos deben ser ingeridos a concentraciones entre  $10^7$ - $10^8$  ufc/g del producto. Las bacterias ácido lácticas (BAL) de origen intestinal son consideradas la principal fuente de microorganismos probióticos, dado que para desarrollar sus efectos beneficiosos en el intestino estos microorganismos tienen que ser capaces de sobrevivir a las condiciones de acidez del estómago, resistir las sales biliares del intestino delgado y tolerar las enzimas pancreáticas (Rönka y col., 2003; Pennachia y col., 2004).

Los microorganismos probióticos han sido muy utilizados en la elaboración de leches fermentadas. Sin embargo, existen en el mercado una amplia gama de productos cárnicos fermentados que podrían ser usados como alimentos probióticos. En los últimos años la atención ha ido dirigida al uso de microorganismos probióticos en embutidos crudos curados. Sin embargo, estos microorganismos deben estar bien adaptados a las condiciones de maduración de los mismos, para llegar en un número elevado al final del procesado.

En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la capacidad que las BAL, aisladas de embutidos crudos curados del cerdo ibérico, tienen para llegar viables al intestino y ser seleccionadas como probióticos para su uso en la elaboración de los mismos.

**- Material y Métodos**

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 25 chorizos y 25 salchichones de diferentes industrias cárnicas. Los aislamientos se realizaron en Agar LAMVAB (Hartemink y col., 1997), M17 y Slanetz Bartley. Aquellos aislados que resultaron ser gram+ y catalasa-, fueron seleccionados para evaluar su comportamiento a las condiciones ecológicas de los embutidos (diferentes pHs y distintas concentraciones de NaCl), mediante el estudio de la cinética de crecimiento en un turbidómetro automático (Bioscreen C) a 600 nm. Posteriormente se estudió la capacidad de los aislados de supervivencia a las condiciones del estómago, utilizándose PBS a pH 2, 2,5, 3 y 5 durante los tiempos 0, 1, 1,5, 2 y 4 horas. También se estudió la tolerancia a las condiciones del intestino delgado, utilizándose sales biliares a 0,3% de concentración a pH5 y pH7 a los tiempos 0, 1, 2, 4 y 8 horas y pancreatina a una concentración de 1,9 mg/ml a los tiempos 0 y 3 horas. Por último la identificación de las cepas potencialmente probióticas se realizó mediante secuenciación del producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA), analizando las primeras 700 pb que contienen las regiones V2-V3 del ADNr 16S.

**- Resultados y Discusión**

Del total de los aislados, 363 resultaron ser Gram + y catalasa -. Un total de 204 mostraron una adaptación adecuada a una concentración de NaCl del 2,5% y pH 5,5. Sin embargo, con el aumento de la concentración de sal el número de aislados bien adaptados disminuía hasta 95. Con respecto a otros valores de pH de 4,5 y 2,5% de NaCl el número de aislados bien adaptados era de 105, mientras que a pH 4 y 2,5% de NaCl era de 31, el efecto de la concentración de sal a estos valores de pH no fue apreciable. Dado que es importante usar microorganismos bien adaptados a las condiciones del producto, se seleccionaron aquellos aislados que se adaptaron a las condiciones más restrictivas de pH 4,5 y 3,5% de NaCl, siendo considerados adaptados adecuadamente a las condiciones ecológicas de los embutidos y utilizados para el estudio in vitro de la tolerancia a la acidez, sales biliares y pancreatina. De los aislados previamente seleccionados, 78 toleraban un pH

de 3 durante 4h, mientras que sólo 15 aislados toleraban adecuadamente un pH de 2,5 durante 1,5h (Figura 1), siendo este pH considerado por algunos autores como adecuado para la selección de microorganismos probióticos (Klingberg y col., 2006). Así mismo, todas las cepas acidotolerantes fueron capaces de sobrevivir durante más de 8 horas y más de 3 h, a las concentraciones de sales biliares y de pancreatina estudiadas, respectivamente. De los 15 aislados, 11 fueron identificados como *P. acidilactici*, esta especie ha sido descrita como una de las BAL predominantes en embutidos crudos curados de cerdo ibérico (Benito y col., 2007). Los otros 4 aislados fueron identificados como *Enterococcus faecium*. Si bien el uso de miembros de este género como probióticos es controvertido, debido a su relación con infecciones, a la aparición de resistencia a antibióticos y presencia de factores de virulencia, sin embargo en el caso de *E. faecium* su peligro para el uso en alimentos parece ser menor que en el caso de *E. faecalis*, debido que posee menos factores de virulencia reconocidos (Franz y col., 2003).

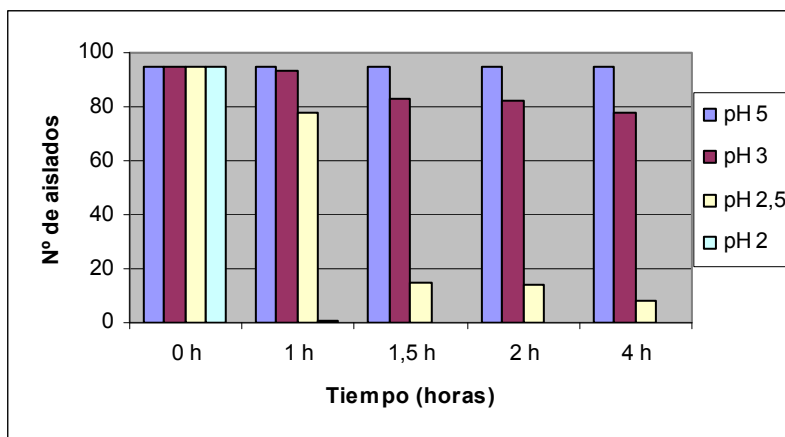


Figura 1: Tolerancia a la acidez del estómago.

#### - Conclusiones

Quince de las cepas adaptadas a las condiciones ecológicas de los embutidos toleraban adecuadamente las condiciones del tránsito gastrointestinal estudiadas, siendo estas cepas preseleccionadas para su inoculación en embutidos crudos curados de cerdo ibérico como probióticas.

#### - Referencias Bibliográficas

- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M.G., (2007). Characterization and selection of autochthonous Lactic Acid Bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented Salchichón and Chorizo sausages. *J. Food Sci.*, 72, 193-201.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H., (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105-122.
- Hartemink, R., Kok, B.J., Weenk, G.H., Rombouts, F.M., (1997). LAMVAB-A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces, *J. Microbiol. Meth.*, 29, 77–84
- Klingberg, T.D., Budde, B.B., (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 109, 157-159.
- Pennachia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., (2004). Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* 67, 309-317.
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J., Palva, A., (2003). Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 63-74.

## FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE AGAVE TEQUILANA WEBER COMO FUENTE DE CARBONO EN LA FERMENTACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.

Solís-Pacheco J.R<sup>1</sup>, Torres-Vitela R<sup>1</sup>, Reyes M.T<sup>1</sup>, Bañuelos, M<sup>1</sup> y Aguilar-Uscanga B.R<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. M. García Barragán 1451, Guadalajara, Jalisco, México. josuesolis@gmail.com

### 1. Introducción y Objetivos

Las bacterias *Lactobacillus casei* y *L. rhamnosus*, son denominadas probióticos, debido a que son efectivas en la prevención de diarrea e infecciones intestinales (1). El *Lactobacillus rhamnosus* es un microorganismo que habita naturalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, esta bacteria junto con *L. casei*, han sido ampliamente estudiadas, encontrado que posee propiedades benéficas como: no posee actividad antimicrobiana contra otras bacterias ácido láctico, poseen buena adhesión a las glicoproteínas del íleon humano y a los productos prebióticos (fibra, polisacáridos, ácidos grasos de cadena corta) evitando la transformación de células normales a tumorosas y aumentando la actividad inmunológica (2). Normalmente para la producción de probióticos, se utiliza fuentes de carbono convencionales como lactosa y glucosa, que en combinación con las condiciones de cultivo favorecen al crecimiento de la bacteria y producción de ácido láctico (3). Sin embargo, existen diversas fuentes de carbono (prebióticos) que pueden ser utilizadas entre las que podemos mencionar: a los galactooligosacáridos (GOS), Lactulosa, Lactitol, fructooligosacáridos (FOS) de inulina de achicoria y agave. Algunos estudios efectuados en humanos sugieren que la fermentación de FOS estimula la movilidad intestinal y el crecimiento de la flora reflejándose en un mejor funcionamiento del intestino y del sistema inmunológico. La ingesta de FOS (incluida en la dieta) con una grado de polimerización (DP) mayor a 25 se verá reflejada con una disminución el estreñimiento y favoreciendo las evacuaciones (4). En Jalisco (México) existe una enorme producción de *agave tequilana Weber* variedad azul, el cual es utilizado para elaborar tequila tradicional, sin embargo recientes estudios, han demostrado que el agave contiene fructanos que posee ramificaciones, a diferencia de la estructura lineal de los fructanos de achicoria. Dicha conformación, podría influir en las propiedades y aplicaciones biotecnológicas de estas moléculas (5). Por otro lado, Roberfroid (2005) estudió que las bacterias lácticas poseen eficiencia en la fermentación de FOS, ya que poseen la  $\beta$ -fructofuranosidasa, capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta(1\rightarrow2)$ , lo que les permite aprovechar directamente a los FOS. Los ácidos grasos de cadena corta resultantes de la fermentación de los fructanos son en su mayoría absorbidos en sangre, y es a través de esta que son enviados a órganos mayores como el hígado y el páncreas, lo que trae consigo cambios significativos en el metabolismo de grasas y monosacáridos como la glucosa. Debido a la importancia del uso de probióticos y prebióticos para el desarrollo de nuevos productos funcionales, nuestro objetivo fue estudiar el comportamiento cinético de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* durante la fermentación de FOS de agave tequila como fuente de carbono en un medio sintético.

### 2. Material y Métodos

La cepa de *Lactobacillus casei* fue obtenida a partir de un producto comercial (Yakult) y *L. rhamnosus* fue aislada del estómago del cerdo. Las cepas se propagaron en matraz con medio líquido YP (2 g/L de extracto de levadura y peptona) y como fuente de carbono se utilizó lactosa y FOS de agave a concentración de 20 g/L. Los FOS de agave se extrajeron a partir de la lixiviación de agave desfibrado (6). Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en 350 mL de medio antes descrito, a temperatura de 37 °C, con agitación constante a 250 rpm. La concentración celular se medio cada hora determinando la densidad óptica y por conteo de células. El consumo de sustrato se determinó por el método de azúcares totales con fenol sulfúrico y azúcares reductores por DNS.

### 3. Resultados y Discusión

La figura 1 muestra la cinética de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus casei*, cultivada en medio YP con lactosa y FOS de agave como fuente de carbono. Observamos que la fase exponencial de esta bacteria con lactosa, es muy prolongada en comparación de la cinética con FOS de agave, calculando una velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de 0.30 h<sup>-1</sup> para el cultivo en FOS y 0.23 h<sup>-1</sup> para lactosa. La cantidad de células vivas del cultivo de *L. casei* con lactosa creció 6 X10<sup>7</sup> cel/mL en 20 horas, mientras que el cultivo con FOS de agave alcanzó su máximo crecimiento en 5 horas, manteniendo su nivel de células vivas hasta por 9.0 X 10<sup>7</sup> cel/mL durante las 24 horas de la cinética.

El tiempo de duplicación de la bacteria fue de 2.3 horas con FOS de agave, mientras que para el medio con lactosa fue de 3.0 horas. La bacteria mostró capacidad para crecer en los FOS y logra mantener su nivel de células vivas.

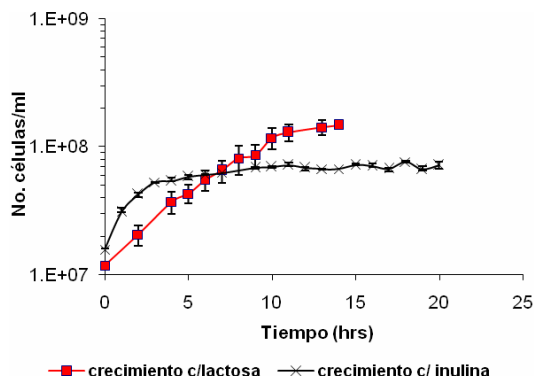


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* en presencia de lactosa y FOS de agave.

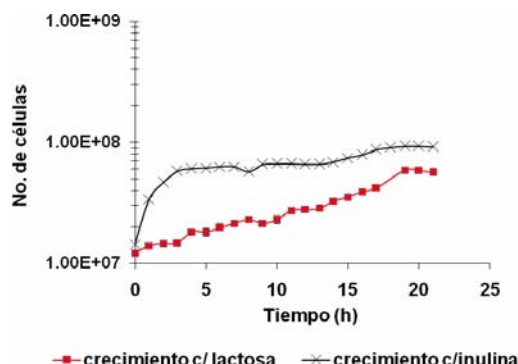


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* en presencia de lactosa y FOS de agave.

Respecto a *Lactobacillus rhamnosus* (fig. 2), observamos que la velocidad de crecimiento es mayor cuando la bacteria es cultivada con FOS ( $0.45 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que la fase exponencial de la cinética con lactosa tiende a ser prolongada logrando un máximo de células vivas de  $6 \times 10^7 \text{ cel/mL}$  y una  $\square_{\text{max}}$  de  $0.07 \text{ h}^{-1}$ . La bacteria crece en promedio de 5 horas en cultivo con FOS de agave, manteniendo su nivel de células vivas hasta por  $9 \times 10^7 \text{ cel/mL}$ . El tiempo de duplicación para *L. rhamnosus* fue de 1.6 horas en FOS de agave y 9.7 horas en medio con lactosa.

#### 4. Conclusiones

Las bacterias *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, tienen la capacidad de crecer en FOS de agave, obteniendo un considerable número de células vivas, las cuales se mantienen estables durante un periodo de tiempo prolongado de hasta 25 horas de fermentación. Los FOS de agave tequila Weber variedad azul, por consiguiente, son una fuente de carbono que puede ser aprovechada para la obtención de biomasa de bacterias lácticas probióticas de interés industrial. Además es posible que la combinación de las bacterias probióticas con el FOS, podrían ejercer una actividad simbiótica dando quizá mayor funcionalidad al organismo humano.

#### 5. Referencias Bibliográficas

- Juárez M; Olano A y Morais F. 2005. Alimentos Funcionales. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. Edit. RUMAGRAF. pp. 1-313.
- Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents, Am. J. Clin. Nut. 2001; 73:1147-1151.
- Sejong Oh, Sungsue Rheem, Jaehun Sim, Sangkyo Kim, And Youngjin Baek (1995). Optimizing Conditions for the Growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone-Yeast Extract-Glucose Medium by Using Response Surface Methodology. Appl. and Environmental Microb., Vol. 61, No. 11. p. 3809–3814.
- Roberfroid M. B. 2005. Inulin type fructans: functional food ingredients. CRC Press. Pag. 46 - 50.
- López M., Mancilla N., Mendoza G., 2003. Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul; J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 7835 – 7840.
- Zúñiga P. V., Camacho L. A. Martínez G. A. 1998. Method of producing fructose syrup from agave plants. Patente No. 5,846,333.

PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE *LACTOBACILLUS CASEI* Y *L. ACIDOPHILUS* AISLADOS DE LECHE FERMENTADA

Torres Vitela M. R. \*, Navarro Hidalgo V., Garay Martínez L. E., Villarruel López A. Orozco Hernández L. O. y Ruiz Quezada S. L.

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

[torresvitela@gmail.com](mailto:torresvitela@gmail.com)

**Introducción y objetivos:** Las leches fermentadas han sido tradicionalmente utilizadas como el vehículo mas usual de bacterias probióticas en cultivo puro o mezcla de microorganismos viables, que al ser administrados al hombre le aportan efectos benéficos (1, 3). Las bacterias probióticas deben cumplir algunos criterios, dentro de los cuales se encuentra la resistencia a jugos gástricos y efecto antagonico sobre microorganismos patógenos (2, 6). El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial antagonico de cepas de *Lactobacillus* probióticos obtenidas de productos comerciales, contra bacterias patógenas transmitidas por alimentos, y la resistencia de los *Lactobacillus* a algunos constituyentes del jugo gástrico.

**Material y Métodos:** Para este estudio se aislaron bacterias ácido lácticas (BAL) de dos productos comerciales (dos marcas de leches fermentadas) tal como se expenden al público. Las bacterias aisladas se identificaron mediante el Sistema API CHL-50 como *Lactobacillus acidophilus* y *casei*, respectivamente. Se estudio la supervivencia de las BAL en dos modalidades, como células lavadas y a través de la leche. Las condiciones a las que se sometieron fueron: solución de sales biliares al 6%, extracto de bilis porcina al 0.3% y HCl a pH 1.5 y 3.0 (2, 5). Los recuentos se realizaron durante 3 h en agar MRS. Se determinó posteriormente el efecto antagonico de las BAL sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei* y *Escherichia coli* O157:H7 (7). Se prepararon mezclas de cada BAL con cada uno de los patógenos a concentraciones de  $10^7$  cél/mL y  $10^5$  cél/mL, respectivamente en caldo MRS. Las mezclas y sus controles fueron incubadas a 35°C/24h, realizándose recuentos cada 3h durante 24 h, mediante siembra por superficie en placas de agar selectivo para cada microorganismo.

**Resultados y discusión:** Los resultados mostraron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el número de células lavadas de BAL al contacto con HCl a pH 1.5 y 3.0 (Fig. 1). Las BAL en la leche lograron sobrevivir durante más tiempo, lo que indica que la leche protegió a las BAL de dicho efecto. Las BAL antagonizaron a las bacterias patógenas probadas en este estudio, después de 15h de incubación (Fig. 2). La bacteria más susceptible al antagonismo fue *E. coli* O157:H7 (4, 6).

Figura 1. Supervivencia de *L. casei* en algunos componentes sintéticos del jugo gástrico

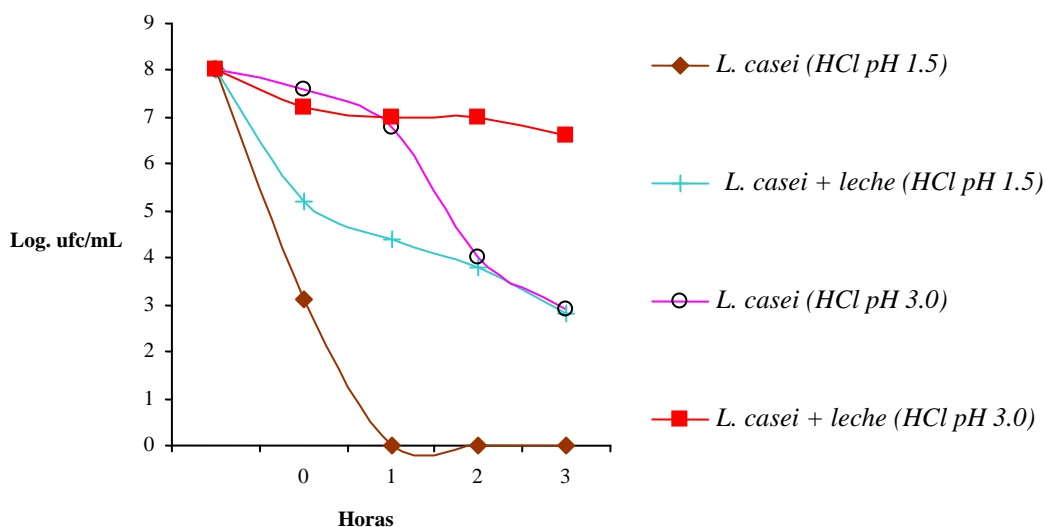
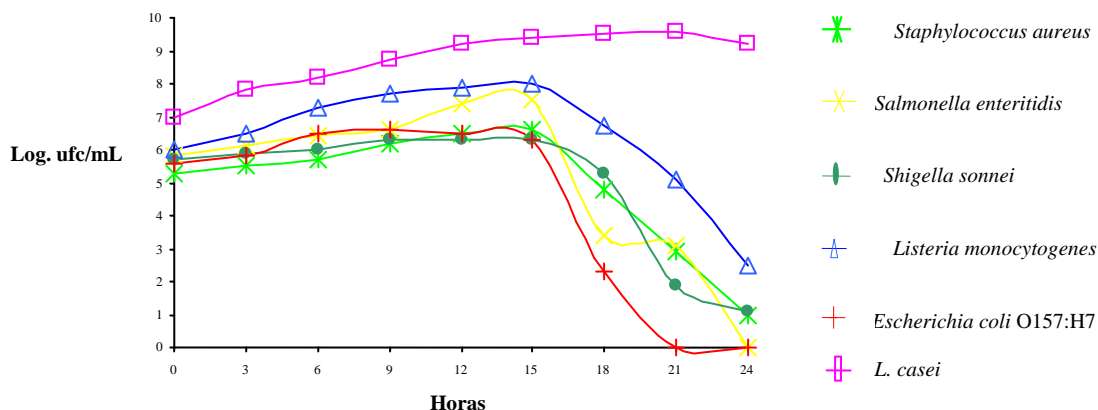


Figura 2. Efecto antagónico de *L. casei* sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos



**Conclusiones:** En este estudio la leche mostró ser un vehículo que brinda protección a las BAL ante los constituyentes del jugo gástrico. Además las bacterias probióticas probadas, ejercieron efecto antagónico sobre bacterias patógenas transmitidas por alimentos, aun después de haber sido sometidas al efecto del HCL y sales biliares.

#### Referencias Bibliográficas:

1. CODEX STAN 243-2003 1. Norma del CODEX para leches fermentadas (CODEX norm for fermented milks. [www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS\\_243s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243s.pdf) (Accessed September 13, 2007).
2. Chou, L. S. & B. Weimer. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science. 82: 23–31.
3. Dunne, C., L. Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, G. Sullivan, F. Shanahan, & F. Collins. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. American Journal of Clinical Nutrition 73 (suppl): 386S-392S.
4. Fayol-Messaoudi, D., C. N. Berger, M. H. Coconnier-Polter, V. Lievin-Le Moal, & A. L. Servin. 2005. pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology 71 (10): 6008-6013.
5. Guyton, A. C., & J. E. Hall. 1999. Funciones secretoras del aparato digestivo, pp. 888-901. In Tratado de Fisiología Médica (Secretors functions of the digestive tract, pp. 888-901. In Medical Physiology), 9<sup>th</sup> ed. Interam-MacGraw Hill Press, Mexico.
6. Hudault, S., V. Lievin, M. Bernet-Camard, & A. L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. Applied and Environmental Microbiology 63 (2): 513-518.
7. Millette, M., F. M. Luquet, & M. Lacroix. 2007. *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. Letters in Applied Microbiology 44 (3):314-319.

## ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE EXTRACTOS DE PARED CELULAR DE LEVADURAS TEQUILERAS

***Aguilar-Uscanga B.R*<sup>1</sup>, *Solís-Pacheco J.R*<sup>1</sup>, *Núñez M.L*<sup>1</sup>, *González V*<sup>1</sup> y *Viveros J.M*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. M. García Barragán 1451, Guadalajara, Jalisco, México. [agublanca@gmail.com](mailto:agublanca@gmail.com)

### **Introducción y objetivo**

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, es un orgánulo dinámico que cambia su composición y estructura de acuerdo a su edad, medio de cultivo utilizado, estrés y modificaciones genéticas (1,9). Sus componentes principales son polisacáridos estructurados de  $\beta$ -glucanos, manno proteínas y quitina (4). Los  $\beta$ -glucanos son responsables de mantener la forma y rigidez de la célula. Las manno proteínas dan la porosidad a la pared, juegan un papel de filtro selectivo y protección contra los ataques químicos y enzimáticos (9). La quitina unida a los  $\beta$ -glucanos tiene la función de formar cicatriz durante la gemación (3). Reportes sobre polisacáridos obtenidos de algas, hongos, levaduras y plantas superiores han mostrado que estimulan el sistema inmunológico, se consideran agentes antitumorales, debido a la secreción de factores citotóxicos por los macrófagos, que se ven reflejados después de que han sido activados por los  $\beta$ -glucanos (10, 6). Se ha reportado que los  $\beta$ -glucanos y mannanos han sido utilizados como componentes inmunoestimulantes, debido a que aumentan la resistencia y la protección contra varias infecciones bacterianas, virales, micóticas y parasitarias (8). Considerando la importancia que ofrecen los  $\beta$ -glucanos y mannanos como compuestos bioactivos, el objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la composición de los polisacáridos de la pared celular de levaduras aisladas del proceso de tequila y estudiar la actividad inmunológica de los extractos de pared celular, aprovechando que en Jalisco (México), contamos con una variedad de cepas nativas de *Saccharomyces*, que en estudios recientes (2, 7), han mostrado que tienen características fermentativas y morfológicas diferente a las cepas vinícolas y de panificación, siendo estas levaduras una fuente rica en  $\beta$ -glucanos y mannanos de importancia industrial.

### **Material y Métodos**

Las cepas AR5 y MG, se aislaron del proceso de elaboración de tequila tradicional y la L013 de panadería comercial. Las cinéticas de crecimiento se efectuaron por duplicado en matraz de 1L con 350 mL de medio líquido YPD (2 g/L extracto de levadura, 2 g/L peptona de caseína y 30 g/L glucosa), pH 5.5, incubación a 30°C y agitación a 250 rpm. El crecimiento de las cepas, se monitoreo tomando 5 mL de medio cada 2 horas y midiendo DO a 600 nm. Las células fueron recolectadas en fase exponencial y estacionaria, tomando 50 mL de medio de cultivo y centrifugando a 3500 rpm/5 min. El precipitado se lavó con agua destilada y finalmente con buffer Tris-HCl 10 mM a pH 8.5. La extracción de la pared celular se llevó a cabo mediante el método descrito por Dallies y col. (1998). El contenido en  $\beta$ -glucanos y mannanos fue analizado por cromatografía HPLC. Finalmente, la determinación de la respuesta inmune, se determinó con 20 ratones, inyectando vía peritoneal extractos de pared celular de las cepas Ar5, MG y L013, mediante el método descrito por Akmaev y Grinevich (2001).

### **Resultados y Discusión**

Observamos de acuerdo a los resultados por HPLC (fig.1), una variación en el contenido de  $\beta$ -glucanos y mannanos según la cepa y su fase de crecimiento. La MG muestra mayor contenido en  $\beta$ -glucanos y mannanos en fase exponencial que en fase estacionaria, la Ar5 no presenta variación en el contenido de  $\beta$ -glucanos respecto a las dos fases de crecimiento, sin embargo si notamos una disminución en mannanos en fase estacionaria de 15 %. La L013 muestra un 45% más del contenido en mannanos en fase estacionaria, mientras que los  $\beta$ -glucanos no muestran variación. Por otro lado, constatamos que los ratones a los que se les suministró extracto de pared celular de la cepa Ar5, en fase estacionaria (fig. 2), producen mayor cantidad de intermediarios nitrogenados (NO), mostrando mayor respuesta inmune que los ratones a los que se les suministró LPS (lipo-polisacárido). Suponemos que el incremento a la respuesta inmune en los ratones, se debe probablemente al contenido en  $\beta$ -glucanos de la pared celular de la Ar5, haciendo que los macrófagos se activen y aumenten la producción de óxido nítrico (NO). Los extractos de pared de MG y L013, expresan menor actividad inmunológica, posiblemente por contener menor proporción en  $\beta$ -glucanos, siendo los componentes mayoritarios en su pared celular los mannanos.

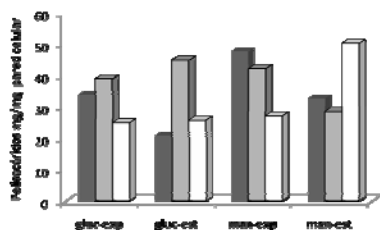


Figura 1. Análisis  $\beta$ -glucan y mannan por HPLC en fase exponencial y estacionaria de MG (■), Ar5 (▒) y L013 (□).

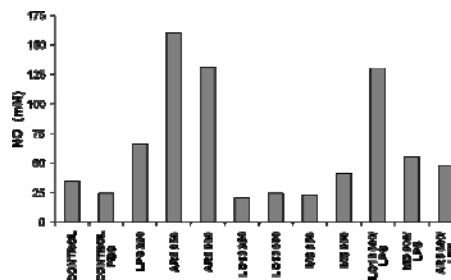


Figura 2. Concentración de intermediarios nitrogenados en plasma de ratones.

### Conclusiones

El contenido en  $\beta$ -glucanos y mananos en la pared celular de las levaduras AR5, MG y L013, varía de acuerdo a la edad o fase de crecimiento. Los extractos de pared celular de la cepa Ar5 mostraron mayor respuesta inmune en los ratones de prueba, probablemente al contenido mayoritario de  $\beta$ -glucanos en su pared celular, los cuales son responsables directos de la estimulación y el aumento de la producción de NO.

### Referencias Bibliográficas

1. Aguilar-Uscanga B. and Francios J.M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letter in Applied Microbiology*. 37 (3): 268-274.
2. Aguilar-Uscanga, B. Arrizón, J. Ramírez, J. and Solís-Pacheco, J. (2007). Effect of *Agave tequilana* juice on cell wall polysaccharide of three *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origin. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 91:151-157.
3. Cabib E., Roh D.H., Schmidt M., Crotti L.B and Varma A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 276:19679-19682.
4. Cid, V.J., Duran, A., Del Rey, F., Zinder, M.P., Nombela, C., y Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial. Rev.* 59: 345-386.
5. Dallies, N., Francois, J. and Paquet, V. (1998). A new method for quantitative determination of polysaccharides in yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1297-1306.
6. Di Luzio, N. (1983). Immunopharmacology of glucan:a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. *Trends in Pharma. Sciences* 4: 344-347.
7. Fiore C., Arrizon J., Gschaedler A., Flores J., Romano P. 2005. Comparison between wine and agave yeast strains for traits of technological interest. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21(6-7): 1141-1147.
8. Habijani, J., Berovi, M., Wraber, B., Hodzar, D. and Boh, B.(2001). Immunostimulatory Effects of Fungal Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* *Food Technol. Biotechnol.* 39 (4) 327-331.
9. Klis, F. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10: 851-869.
10. Kogan, G. (2000). (1-3,1-6)-  $\beta$ -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. 107-142.
11. Akmaev JG and Grinevich VV (2001) From Neuroendocrinology to Neuroimmunoendocrinology. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1:15-23.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y TECNOLÓGICA DE AISLADOS DE *LEUCONOSTOC* DE QUESO DE DENOMINACIÓN DE ORIGEN “MANCHEGO”

Nieto-Arribas P.<sup>1</sup>, Seseña S.<sup>2</sup>, Poveda J.M.<sup>1</sup>, Palop M. L.I.<sup>2</sup> y Cabezas L.<sup>3</sup>

Dpto. de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Universidad de Castilla-La Mancha. <sup>1</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Avda. Camilo José Cela s/n, Ciudad Real [pedro david.nieto@uclm.es](mailto:pedro david.nieto@uclm.es) <sup>2</sup>Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Avda. Carlos III s/n, 45071 Toledo. <sup>3</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba.

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Es bien sabido que los leuconostocs contribuyen de una manera importante en el proceso de maduración de los quesos, tanto por la producción de CO<sub>2</sub>, como por la formación de compuestos aromáticos, como el diacetilo y la acetoina que intensifican el desarrollo del aroma y sabor, y de dextrano que influye en la textura de los mismos. Por ello, en algunos cultivos iniciadores mixtos para la fabricación de queso, se han incluido cepas de *Leuconostoc* (Sánchez et al., 2005).

Los criterios frecuentemente utilizados en la selección de cepas de *Leuconostoc* que vayan a ser incluidas como cultivos mixtos responden a estas propiedades y son 1) el estudio de las actividades proteolíticas, lipolíticas y aminopeptidásicas (Macedo y Macalta, 1997), 2) la producción de dextrano y 3) la capacidad aminobiogénica, propiedad esta última no exclusiva del grupo de los *Leuconostoc*, pero de gran importancia para las bacterias que vayan a ser utilizadas en la elaboración de alimentos, por su carácter tóxico cuando se ingieren en elevadas cantidades.

Son objetivos de este estudio la caracterización genética y tecnológica de 23 aislados de *Leuconostoc* procedentes de quesos de D.O. Manchego, para la selección de aquellos que presenten las mejores propiedades para ser utilizados en cultivos starters mixtos en la elaboración de estos quesos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los 23 aislados analizados en este estudio procedían de muestras de queso artesanal de D.O. Manchego y habían sido asignados a este género atendiendo a diferentes pruebas fenotípicas (Sánchez et al. 2006).

La caracterización genética se ha realizado utilizando la técnica RAPD-PCR según el procedimiento descrito por Sánchez et al. (2006), utilizando los cebadores de secuencia arbitraria OPL-05 (5'-ACGCAGGCAC-3') y Lp1 (5'-ACGCGCCCT-3'). Los perfiles obtenidos fueron analizados numéricamente utilizando el programa GelCompar 4.0., mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson("r") con un análisis cluster UPGMA que permitió la construcción de los correspondientes dendrogramas de similitud. El valor de "r" se expresó en el dendrograma como % de similitud (r×100). La identificación posterior de las cepas se realizó mediante PCR-específicas (Moschetti et al., 2000) y tiras API 50 CHL.

Para la caracterización tecnológica se han analizado: la actividad proteolítica según el método descrito por Church et al. (1983), la actividad aminopeptidásica con dos sustratos, la L-lisina *p*-nitroanilida (Lys-PNA) y L-leucina *p*-nitroanilida (Leu-PNA), utilizando el método de Arizcun et al. (1997), la producción de dextrano a partir de sacarosa utilizando el medio de Mayeaux y la producción de aminas biogénicas (Bover-Cid y Holzapfel, 1999), utilizando como sustratos L-tirosina, L-histidina, L-ornitina y L-lisina.

### RESULTADOS

El análisis clusters de los perfiles RAPD-PCR correspondientes a los 23 aislados permitió su agrupamiento en 5 genotipos (Figura 1) a un valor r≥86%, que tras su identificación por PCR específicas y por tiras API fueron asignados a las especies indicadas en la figura.

El estudio de caracterización tecnológica puso de manifiesto que ninguno de los aislados producía tiramina, histamina, putrescina o cadaverina. Por el contrario, todos los pertenecientes a la subespecie *Ln. mesenteroides subsp. dextranicum*, presentaron crecimiento mucoso, destacando los aislados CA4ML5, CLL1, CA1ML1, CA2ML3 y NA4ML2, que mostraron una gran producción de exopolisacáridos.

Las Figuras 2 y 3 muestran los resultados de las actividades proteolítica y aminopeptidásicas pudiendo observarse que si bien no existe relación entre ambas, si existe entre las dos actividades aminopeptidásicas analizadas, aunque los valores obtenidos utilizando la L-lisina *p*-nitroanilida (Lys-PNA) como sustrato fueron, en todos los casos, superiores a los obtenidos con L-leucina *p*-nitroanilida (Leu-PNA).

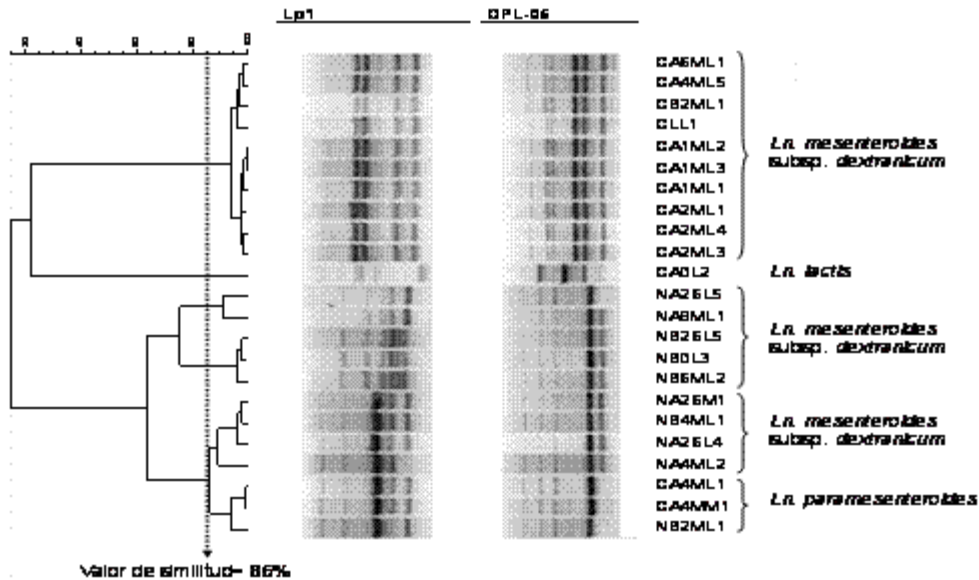


Figura 1. Dendrograma de similitud genética en el análisis cluster combinado de los perfiles de amplificación (RAPD-PCR) obtenidos con los cebadores OPL-05 y Lp-1

El aislado CA0L2 fue el que presentó mayor actividad proteolítica seguido de los aislados CA6MSL1 y CA2ML4, mientras que los aislados CA4MM1 y CA4ML1 fueron los que presentaron valores más elevados para las actividades aminopeptidásicas con ambos sustratos.

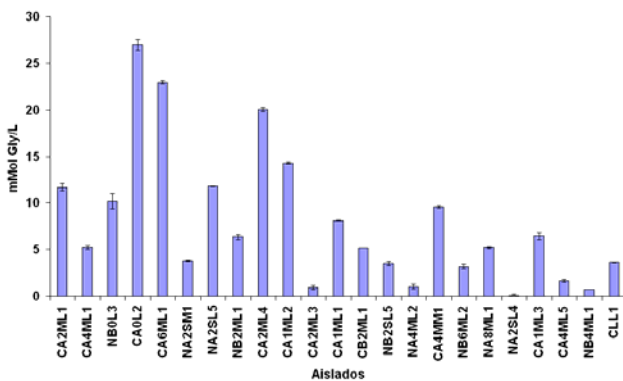


Figura 2. Actividad proteolítica

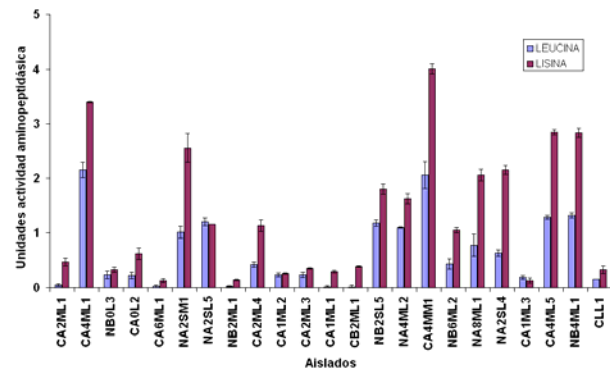


Figura 3. Actividad aminopeptidásica

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* fue la subespecie predominante (82,6%), habiéndose encontrado que, si bien no hubo un aislado que destacara en todos los parámetros analizados, alguno de ellos, como el CA4ML5 mostraba características idóneas para ser utilizados en cultivos starters mixtos, del mismo modo que han descrito otros autores para quesos de otras D.O. (Sánchez et al., 2005).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arizcun, C., Barcina, Y., & Torre, P. (1997). *Le Lait* 77, 729-736.  
 Bover-Cid, S., & Holzapfel, W.H. (1999). *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33-41.  
 Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., & Catignani, G.L. (1983). *J. Dairy Science* 66, 1219-1227.  
 Macedo, A.C. & Macalita, F.X. (1997). *Lebens. Unters Forsch.* 205, 25-30.  
 Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F. & Coppola S. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 422-424.  
 Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J. M, Cabezas, L. & Palop, M. LL. (2006). *Int. J. Food Microbiol.* 107, 265-273.  
 Sánchez, J.I., Martínez, B. & Rodríguez, A. (2005). *Int. J. Food Microbiol.* 105, 377- 387.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y MOLECULAR DE CEPAS DE SALMONELLA AISLADAS DE CARNE DE POLLO DE TÁNGER

**Benazzouz J.<sup>1</sup>, Maadoudi M.<sup>2</sup>, Soto Esteras T.<sup>3</sup>, Echeita A.<sup>4</sup> y Barrijal S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Equipe de Recherche sur la Valorisation Biotechnologique des Microorganismes, Faculté des Sciences et Techniques de Tánger, Université Abdelmalek Essaâdi, B.P. 416, 90000 Tanger, Maroc, benazzouzjihane@yahoo.fr*

<sup>2</sup>*Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches Vétérinaires de Tanger, B.P. 3, 90000 Tanger, Maroc,*

<sup>3</sup>*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, España,*

<sup>4</sup>*Laboratorio Nacional de Referencia de Salmonella y Shigella, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda - Pozuelo Km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España,*

### **Introducción y Objetivos**

La avicultura industrial está actualmente en pleno desarrollo en el mundo. En 2005, la producción mundial de la carne de aves se evaluaba en 81 millones de toneladas (1,2). En Marruecos, la producción de la carne de aves pasó de 29.000 toneladas en 1970 a 370.000 toneladas en 2007. En paralelo, el consumo de esta carne por habitante y al año evolucionó de 2,3 kg en 1970 a 13,4kg en 2007. Actualmente, la carne de aves representa más de un 54% del consumo total de todas las carnes producidas (2,3).

En efecto, el precio así como la calidad nutricional de la carne de aves hacen de ésta un producto atractivo para el consumidor.

Sin embargo, la carne de pollo se reveló como una de las causas principales de toxiinfecciones alimentarias colectivas notificadas en Marruecos (4). Esto se debe a que las aves constituyen el depósito principal del germen *Salmonella* que es patógeno para el hombre.

Según nuestros conocimientos, ningún estudio epidemiológico se ha realizado en Tánger sobre el germen *Salmonella* susceptible de contaminar la carne de pollo. Con este fin, nuestro estudio consistió en identificar las cepas de *Salmonella* aisladas de muestras de la carne de pollo tomadas de distintos lugares de venta de Tánger, serotipar las cepas aisladas, fagotipar las cepas de los serotipos *Enteritidis* y *Hadar* para discriminar entre las cepas que pertenecen al mismo serotipo, evaluar la resistencia de las *Salmonellas* aisladas a distintos antibióticos y hacer la caracterización molecular de estas cepas por la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE).

### **Material y Métodos**

Para evaluar la calidad de la carne de pollo vendida en Tánger, 260 muestras se tomaron de distintos lugares de venta y se sometieron a un análisis microbiológico del germen *Salmonella* según la norma AFNOR V08-052 (5).

La serotipificación de las cepas de *Salmonella* aisladas se realizó por aglutinación en porta con sueros polivalentes y monoespecíficos para antígenos somáticos y flagelares (Laboratorios de BioRad, S.A., Madrid, España) (6). Después de la obtención de la estructura antigénica de las cepas, se refiere al esquema de Kauffmann-White para determinar el serotipo (7).

Tras la serotipificación, se llevó a cabo la fagotipificación de las cepas de *Salmonella* de los serotipos *Enteritidis* (8) y *Hadar* (9), siguiendo los esquemas internacionalmente reconocidos para estos serotipos, con los bacteriófagos suministrados por la Agencia para la Protección de la Salud (HPA) (Colindale, Londres, Reino Unido).

La resistencia a antibióticos se determinó por la técnica de difusión en agar, siguiendo los criterios y los puntos de corte de la NCCLS (10) frente a 17 antibióticos que pertenecen a distintas familias. Los antibióticos usados fueron suministrados por Oxoid (Basingstoke, Reino Unido).

La caracterización molecular de las cepas por la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) se hizo utilizando la enzima de restricción XbaI (Roche, España) y siguiendo el protocolo de Salm-gene (11).

### **Resultados y Discusión**

Sobre las muestras tomadas, 186 muestras mostraron una contaminación por el germen patógeno *Salmonella*, lo que representan un 72% de las muestras analizadas. Estas muestras mostraron una contaminación por 8 serotipos diferentes con un predominio del serotipo *Enteritidis* de 44%. La fagotipificación nos permitió subdividir las cepas del serotipo *Enteritidis* en 3 fagotipos (PT1, PT14b y PT4) y las cepas del serotipo *Hadar* en 2 fagotipos (PT4 y PT17) y un tipo RDNC (= Reaction Does Not Conform o "Patrón No Reconocido").

La resistencia a antibióticos de las cepas de *Salmonella* aisladas nos permitió colocar el ácido nalidíxico, la estreptomycin y la tetraciclina a la cabeza de los antibióticos menos activos, seguidos de la furazolidona, la kanamicina, la ampicilina y la amoxicilina/ácido clavulánico. La multiresistencia se observó en un 11% de las cepas analizadas.

La Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) de las cepas de *Salmonella enteritidis* PT1, *S. enteritidis* PT14b, *S. hadar* RDNC, *S. bredeney* y *S. blockley* nos permitió estudiar la diversidad genética de estas cepas. Se reveló una estrecha relación genética entre las cepas que pertenecen al mismo serotipo con un porcentaje de similitud superior a 90%. Esto permite sugerir que las cepas del mismo serotipo pertenecen al mismo clon.

### **Conclusiones**

Este estudio nos permitió deducir que la mayoría de la carne de pollo ofrecida a los consumidores de la ciudad de Tánger no responde a las normas de higiene. De ahí, un control estricto por las autoridades locales se exige así que una vigilancia y un control de la calidad sobre toda la cadena de la producción avícola.

### **Referencias Bibliográficas**

1. Magdelaine, P. (2006). Quelles sont aujourd'hui les perspectives de marché pour la volaille ?. 6ème Journée Productions Porcines et Avicoles. [http://www.cra.wallonie.be/pubtech/jppv2006/doc/JPPV2006\\_magdelaine.pdf](http://www.cra.wallonie.be/pubtech/jppv2006/doc/JPPV2006_magdelaine.pdf)
2. El Fahli, S. & Tahiri, M. (2006). Secteur Avicole. Etude sectorielle. BMCE BANK. Capital Humain et Technologies, Direction des Affaires Générales, Département des Etudes et de la Documentation. [http://www.bmcebank.ma/UploadFiles/publications/298/Mars\\_2006\\_Secteur%20avicole.pdf.V1.aspx](http://www.bmcebank.ma/UploadFiles/publications/298/Mars_2006_Secteur%20avicole.pdf.V1.aspx)
3. FISA (Fédération Interprofessionnel du Secteur Avicole). Secteur Avicole en Chiffres 2007. [http://www.fisa.org.ma/presse/documentation/Secteur\\_Avicole\\_En\\_Chiffres\\_2007.pdf](http://www.fisa.org.ma/presse/documentation/Secteur_Avicole_En_Chiffres_2007.pdf)
4. Benkaddour, K. (2002). Situation épidémiologique des toxi-infections alimentaires collectives au Maroc, 1992-2001. Rapport du Séminaire national sur l'application du système HACCP dans le domaine de l'hygiène alimentaire. Ministère de la santé, Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte Contre les Maladies, Division de l'Hygiène du Milieu, Rabat. [http://www.sante.gov.ma/Departements/delm/Seminaire\\_Formation/Documents/Seminaire%20nationa%20HACCP%202002.pdf](http://www.sante.gov.ma/Departements/delm/Seminaire_Formation/Documents/Seminaire%20nationa%20HACCP%202002.pdf)
5. AFNOR V08-052. Méthode de routine pour la recherche des *Salmonella*, Mai 1997.
6. Echeita, M. A., Aladueña, A., Díez, R., Arroyo, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R., de la Fuente, M., González-Sanz, R., Herrera-León, S. & Usera, M. A. (2005). Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **23**(3), 127-134.
7. Popoff, M.Y. (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur.
8. Ward, L.R., De Sa, J.D.H. & Rowe, B. (1987). A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiology and Infection* **99**, 291-294.
9. De Sa, J.D.H., Ward, L.R., & Rowe, B. (1980). A scheme for the phage typing of *Salmonella Hadar*. *FEMS Microbiology Letters* **9**(3), 175-177.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
11. Peters, T.M., Maguire, C., Threlfall, E.J., Fisher, I.S.T., Gill, N. & Gatto, A.J. (2003). The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Eurosurveillance* **8**(2), 46-50.

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CUATRO ACEITES ESENCIALES Y SUS ÓLEO-RESINAS DE USO COMERCIAL

**J. M. Rodríguez-Calleja<sup>1</sup>, M. Cruz-Romero<sup>2</sup>, M. L. García-López<sup>1</sup>, J.P. Kerry<sup>2</sup>**

<sup>(1)</sup>Área de Nutrición y Bromatología, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, España

<sup>(2)</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, Ireland

### - Introducción y Objetivos

Los aceites esenciales o volátiles y sus extractos son productos naturales obtenidos de plantas y presentan multitud de propiedades y aplicaciones. Entre otras, es de especial interés su potencial aplicación a la conservación de alimentos frescos y procesados, como aditivos de los mismos o formando parte de sistemas de envasado activo (Kerry y col., 2006).

Desde el punto de vista de su actividad biológica, son numerosos los trabajos que han estudiado el efecto de aceites esenciales por reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes de los alimentos y de bacterias patógenas de transmisión alimentaria (Burt, 2004). Por otra parte, son escasos los trabajos que han comparado la acción biológica de los aceites esenciales con sus óleo-resinas sobre la inactivación de microorganismos de interés alimentario (Deans y Ritchie, 1987; Tepe y col., 2005).

Los objetivos de este trabajo fueron: (a) estudiar la actividad antibacteriana de cuatro aceites esenciales y sus óleo-resinas frente a *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* y *P. fluorescens*; (b) comparar la acción inhibitoria de los aceites esenciales y sus óleo-resinas frente a estas bacterias.

### - Material y Métodos

Cuatro aceites esenciales (*Origanum vulgare*, orégano; *Thymus vulgaris*, tomillo; *Salvia officinalis*, salvia; *Rosmarinus officinalis*, romero) y sus óleo-resinas fueron adquiridos a la compañía National Food Ingredients LTD (Limerick, Ireland).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus respectivas óleo-resinas se utilizó el método modificado de dilución en caldo siguiendo las indicaciones del NCCLS (1999). Los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) en las cepas de *Staphylococcus aureus* NCIMB 13062, *Bacillus cereus* NCIMB 9373, *Escherichia coli* NCIMB 9132, *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 9046 fueron determinados del siguiente modo: los cultivos bacterianos se obtuvieron en caldo de Mueller-Hinton (MH; Merck, Darmstadt, Germany) después de 24 h de incubación a 37 °C (*S. aureus* y *E. coli*) y a 30 °C (*P. fluorescens* y *B. cereus*) en constante agitación (200 rpm). Alícuotas de estos cultivos en fase estacionaria fueron transferidas a nuevos tubos conteniendo caldo MH hasta obtener una concentración entre  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  ufc/ml. En micro-tubos con 0,9 ml del anterior caldo bacteriano diluido se añadieron 0,1 ml de emulsiones con diferentes concentraciones de los aceites esenciales o sus óleo-resinas. Estas emulsiones fueron apropiadamente formadas en una solución de dimetil sulfóxido 10% (v/v) (DMSO) y tween-20 0,5% (w/v; Sigma Aldrich Ireland Ltd, Dublín, Irlanda) utilizando un equipo "Ultra Turrax Tube Disperser" (IKA, Staufen, Alemania), para obtener concentraciones comprendidas en el rango 0,25-25 mg/ml. Los micro-tubos inoculados con *S. aureus* y *E. coli* se incubaron a 37 °C y los de *B. cereus* y *P. fluorescens* a 30 °C durante 24 h. En paralelo se llevó a cabo un control de crecimiento (sin aceite esencial u óleo-resina) y un control de esterilidad (sin caldo de cultivo). El valor de MIC obtenido fue aquel correspondiente al menor valor de concentración de aceite esencial u óleo-resina para el que no se observó crecimiento microbiano indicado por la presencia de un precipitado blanquecino en el fondo del micro-tubo.

La capacidad inhibitoria de los aceites esenciales y óleo-resinas frente a las cuatro cepas estudiadas también fueron valoradas mediante el método de difusión en disco, siguiendo las recomendaciones establecidas por el NCCLS (1999). Para ello, placas petri conteniendo agar MH fueron sembradas uniformemente con hisopos estériles (Sarstedt, Germany) a partir de los caldos de cultivo diluidos hasta la concentración de  $10^7$  ufc/ml. Tras ello, discos estériles de 6 mm de diámetro (Whatman International Ltd, Maidstone, UK) fueron asépticamente impregnados con 15 µl de cada aceite esencial u óleo-resina, y transferidos a la superficie del agar previamente sembrada. Después de almacenarse durante 2 h a 4 °C, las placas de *S. aureus* y *E. coli* se incubaron a 37 °C mientras que las inoculadas con *P. fluorescens* y *B. cereus* se incubaron a 30 °C. Después de 18 h de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición con un calibre digital. En las zonas de

inhibición se determinó si el efecto producido por los aceites esenciales o las óleo-resinas fue bactericida o bacteriostático. Para ello, se tomó aseptícamente 6 mm del agar MH en la zona de inhibición y se transfirió a tubos con caldo Tripton-Soja (Merck) enriquecido con 0,5% (w/v) de extracto de levadura (Merck). La ausencia de turbidez en los tubos después de 5 días de incubación a 37 o 30 °C fue considerado como efecto bactericida.

Todos los experimentos se repitieron tres veces y cada observación se realizó por duplicado. A partir de los datos obtenidos se calcularon los estadísticos descriptivos básicos (medias y desviaciones estándar) y se determinó la significatividad de las diferencias entre las medias ("t de Student") usando el software "Statistica for Windows Release 6.0" (StatSoft, Inc., [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

#### **- Resultados y Discusión**

De los valores de MIC obtenidos para las cuatro bacterias, el aceite esencial de tomillo presentó el mayor potencial antimicrobiano entre los aceites esenciales estudiados. Así, tanto *S. aureus* como *B. cereus* fueron inhibidos a concentraciones mínimas de  $5,0 \pm 0,1$  y  $0,4 \pm 0,1$  mg/ml respectivamente, mientras que la MIC en *E. coli* y *P. fluorescens* fue de  $8,7 \pm 2,3$  y  $3,1 \pm 1,3$  mg/ml respectivamente, valores estos últimos que no difirieron significativamente ( $p > 0,05$ ) de los obtenidos frente a estas mismas bacterias Gram negativas cuando se expusieron al aceite esencial de orégano ( $8,8 \pm 2,5$  y  $3,8 \pm 1,4$  mg/ml respectivamente). Asimismo, la inhibición de las bacterias estudiadas mediante el método de difusión en disco fue mayor cuando se expusieron al aceite esencial de tomillo, observándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diámetros determinados para las bacterias de reacción positiva a la tinción de Gram (*S. aureus*,  $49,58 \pm 0,85$  mm, y *B. cereus*,  $53,03 \pm 0,16$  mm) y los observados en las placas cultivadas con *E. coli* ( $27,37 \pm 4,49$  mm) y *P. Fluorescens* ( $15,56 \pm 1,39$  mm).

El potencial antibacteriano observado en la óleo-resina de orégano frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. fluorescens* fue el mayor (menores valores de MIC;  $4,4 \pm 1,3$ ,  $12,5 \pm 2,9$  y  $5,8 \pm 3,8$  mg/ml respectivamente) de entre las óleo-resinas evaluadas. Sin embargo, frente a *B. cereus* la óleo-resina de romero presentó mayor efecto antibacteriano (MIC de  $1,8 \pm 0,9$  mg/ml) que el observado para las óleo-resinas de orégano, salvia y tomillo. En contraste, según los resultados obtenidos a partir del método de difusión en disco, *P. fluorescens* no fue susceptible a la acción de ninguna de las óleo-resinas evaluadas al no observarse zona de inhibición alrededor de los discos.

Comparando los valores de MIC obtenidos en los aceites esenciales y sus correspondientes óleo-resinas, sólo el de aceite esencial de tomillo presentó significativamente ( $p < 0,05$ ) menores valores de MIC respecto a su óleo-resina para las cuatro cepas microbianas estudiadas. En general, los diámetros de los halos de inhibición formados por las óleo-resinas fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que los obtenidos a partir de sus respectivos aceites esenciales.

#### **- Conclusiones**

\* En general y entre las diferentes sustancias evaluadas, los aceites esenciales de tomillo y orégano presentaron la mayor acción antibacteriana frente a las cepas de *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* y *P. fluorescens*, cuyo efecto fue además bactericida. Entre los microorganismos evaluados, *B. cereus* fue el más sensible a ambos aceites (MIC de  $0,4 \pm 0,1$  y  $0,8 \pm 0,3$  mg/ml respectivamente).

\* Comparando los resultados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales con los de sus óleo-resinas según los valores de MIC determinados, sólo el aceite esencial de tomillo presentó mayor actividad que su correspondiente óleo-resina frente a las cuatro bacterias estudiadas.

#### **- Referencias Bibliográficas**

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253.

Deans, S. G., y G. Ritchie. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2):165-180.

Kerry, J. P., M. N. O'Grady, y S. A. Hogan. 2006. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74:113-130.

Tepe, B., D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen, M. Polissiou. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90:333-340.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 9<sup>th</sup> International Supplement. M100-S9. Wayne, PA.

**BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS EN PASTAS Y ORUJOS DE ACEITUNAS: ACTIVIDADES  
ENZIMÁTICAS DE INTERÉS**

***Romo S., Arévalo-Villena M., Úbeda J. y Briones A.***

*Dpto. de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Universidad de Castilla La Mancha. Campus de Ciudad Real, 13071, Ciudad Real, sheila.romo@hotmail.com*

**Introducción y Objetivos**

En la elaboración de numerosos productos alimentarios se emplean enzimas, normalmente de origen microbiano, que aportan beneficios organolépticos y / o tecnológicos durante el proceso y en el producto final.

Dicha tecnología está muy extendida en algunos sectores como la Enología, en cambio en otros ámbitos, como es el caso de la aceitunas, existe un escaso desarrollo de las aplicaciones enzimáticas (Ranalli *et al.*, 2005), y por lo tanto se abre un amplio campo para el uso de enzimas durante el procesado y en la mejora de la calidad del aceite de oliva. En el caso concreto de la elaboración de aceite de oliva virgen, el uso de enzimas no está permitido por la vigente normativa, aunque su estudio se considera necesario para posibles aplicaciones futuras. Además, la presente investigación también está dirigida hacia otros productos derivados de la oliva, como son los aceites de segunda centrifugación, y su principal subproducto, el orujo, sin olvidar la elaboración de otros derivados enriquecidos en componentes minoritarios con aplicaciones nutricionales o como simples condimentos.

El tratamiento enzimático para la elaboración del aceite de oliva ofrecería claros beneficios (Ranalli *et al.*, 2005) en cuanto al aumento del rendimiento y en la mejora de la calidad del aceite (olor y gusto intenso, aroma fragante y la presencia de antioxidantes naturales). Sin embargo existen pocos preparados enzimáticos comerciales con características bien establecidas, que los hagan apropiados para su aplicación al aceite de oliva.

Por tanto, los objetivos del presente trabajo son: (i) aislamiento de levaduras procedentes del fruto, pasta y orujos, (ii) identificación de los aislados por técnicas de biología molecular, (iii) estudio de las actividades enzimáticas más interesantes desde el punto de vista organoléptico y / o sensorial.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

*Recogida de muestras*

Durante la campaña, se muestrearon distintas almazaras de Castilla La-Mancha, Mora (Toledo), Malagón (Ciudad Real), y Ciudad Real. En ellas se recogieron frutos, pastas y orujos de aceituna de la variedad Cornicabra

*Aislamiento de levaduras*

De todas las muestras se obtuvo una suspensión para su posterior análisis microbiológico. Tres aceitunas se pusieron en contacto con solución salina (0,9%) y Tween 80 (0,01%), mientras que para pastas y orujos se emplearon 10 g de cada uno en contacto con 90 ml de solución salina (0,9%) y Tween 80 (0,01%). Todas las mezclas se mantuvieron durante 5 minutos en agitación y posteriormente, 200 uL de cada suspensión se sembraron en placas de YPD que se incubaron a 28 °C durante 24 / 48 horas.

Las colonias con distinta morfología se resebraron para obtener cultivos puros que se conservaron en glicerol al 15 % a -70 grados hasta su posterior utilización.

*Identificación de aislados*

Se procedió a la identificación de los aislados mediante PCR- RFLP utilizando las enzimas de restricción *Hinf* I, *Hae* III y *Cfo* I.

#### **Estudio de las actividades enzimáticas de interés**

Las actividades enzimáticas se evaluaron cualitativamente por crecimiento en agares específicos. Para ello se obtuvo un cultivo joven mediante precultivo en caldo YPD durante 24 horas a 28 °C y se procedió al agotamiento de los azúcares internos en YNB usando un inóculo de 10<sup>6</sup> células/mL. Tras 6 horas en agitación, se sembraron 5 uL de cada levadura en las placas con distinta composición.

En el caso de la actividad lipolítica se utilizó agar Tween 80. Para las actividades glicolíticas (beta glucosidasa y celulasa), se usaron agares YP-Celobiosa e YP-Carboximetil celulosa respectivamente (Arévalo Villena *et al.*, 2005) La detección de un halo de hidrólisis alrededor de las colonias puso de manifiesto la actividad poligalacturonásica y amilolítica en las placas con ácido poligalacturónico y almidón respectivamente (Fernández González *et al.*, 2005).

### **Resultados y Discusión**

En los frutos apenas se aislaron levaduras, en cambio en las pastas y orujos se detectó una mayor variabilidad. Así las levaduras predominantes, encontradas en la mayoría de las muestras han sido *Kluyveromyces waltii* y *Candida wickerhamii* y en menor proporción, *Cryptococcus laurentii*, *Candida beeckii* /*Candida terebra*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Cryptococcus gastricus* y *Debaryomyces hansenii*.

Entre las actividades enzimáticas estudiadas, destaca la actividad glucosidásica y celulásica que está presente en casi todos los aislados, en menor medida estas levaduras poseen lipasas y poligalacturonasas y apenas se ha encontrado la actividad amilolítica.

### **Conclusiones**

Existen pocas referencias en la bibliografía acerca de la biodiversidad microbiana en los frutos, pastas y orujos de aceitunas, este estudio refleja que estos sustratos presentan una microflora epifítica interesante con posibles aplicaciones biotecnológicas

### **Bibliografía**

Arévalo Villena, M., Úbeda Irazo, J.F., Cordero Otero, R.R., and Briones Pérez, A.I. Optimisation of a rapid method for studying the cellular location of  $\beta$ -glucosidase activity in wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 99, 2005, 558-564.

Fernández-González, M., Úbeda J. F., Vasudevan T.G., Cordero Otero R.R, and Briones A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 2004, 261-266.

Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S., and Sotiriou, E. (2005). Effects of processing techniques on the natural colourings and the other functional constituents in virgin olive oil. *Food Res. Int.* 38, 873-878

SESIÓN IV. 16/09/08. HORA: 18.00-19.30 H.

**ENOLOGÍA**

**COMPORTAMIENTO DE LEVADURAS COMERCIALES Y ESPONTÁNEAS EN CO -  
FERMENTACIONES. (PAG 117)**

N. BARRAJÓN; S. ALONSO INFANTE; M. ARÉVALO-VILLENA. J. ÚBEDA.

**SELECCIÓN DE CEPAS INICIADORAS PARA LA FERMENTACIÓN DE VINOS DE JEREZ.**

M.J.R. PALERO; A. CODÓN; T. BENÍTEZ; M.J. VALCÁRCEL. (PAG119)

**MEJORA DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL VINO MEDIANTE LA OBTENCIÓN  
DE CEPAS FERMENTATIVAS MEJORADAS. (PAG 121)**

J. FIERRO RISCO; A. CARABALLO CODÓN; A.M. RINCÓN ROMERO; T. BENÍTEZ FERNÁNDEZ.

**ANÁLISIS DE GENES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE IMPLICADOS EN  
TERMOTOLERANCIA DURANTE FERMENTACIONES VÍNICAS A BAJAS TEMPERATURAS.**

R. CHIVA TOMÁS; J.M. GUILLAMÓN NAVARRO. (PAG 123)

**ESTUDIO DE IMPLANTACIÓN DE CEPAS DE OENOCOCCUS OENI AISLADAS DE LA  
FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA DE VINOS CENCIBEL. (PAG 125)**

S. SESEÑA PRIETO; P. RUIZ PÉREZ; P.M. IZQUIERDO CAÑAS; M. LLANOS PALOP HERREROS.

**ECOLOGÍA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DURANTE LA VINIFICACIÓN EN UNA BODEGA DE  
LA D.O. Ca. RIOJA. (PAG 127)**

C. TENORIO RODRÍGUEZ; I. LÓPEZ ALFARO; A. MANGADO RUIZ; R. LÓPEZ MARTÍN; P. GARIJO  
JIMÉNEZ; P. SANTAMARÍA AQUILUÉ.

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES BACTERIANAS ASOCIADAS A LA  
VINIFICACIÓN: AISLAMIENTO DE ESPECIES NO DESCRITAS PREVIAMENTE. (PAG 129)**

MAÑES-LÁZARO, R.; PARDO, I.; FERRER, S.

## COMPORTAMIENTO DE LEVADURAS COMERCIALES Y ESPONTÁNEAS EN CO - FERMENTACIONES

***Barrajo N., Alonso S. Arévalo-Villena M. y Úbeda J.***

*Dpto. de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de CC. Químicas, Universidad de Castilla La Mancha. Avda. Camilo José Cela, 10. 13071 Ciudad Real. Nuria.Barrajo@uclm.es*

### - **Introducción y Objetivos**

Desde hace más de una década, el uso de cultivos iniciadores para llevar a cabo las fermentaciones vínicas se ha hecho extensivo a todo el sector vinícola dadas las importantes ventajas que presentan. Sin embargo, en estudios previos se observó que, en ocasiones, la levadura comercial convivía o era desplazada por las levaduras indígenas presentes en el mosto (Barrajo *et al.* 2008; Lopes *et al.*, 2007; Valero *et al.*, 2005). Para comprobar que no se trataba de situaciones aisladas y fortuitas, se decidió enfrentar en co-fermentaciones a nivel de laboratorio, a las levaduras comerciales y a las espontáneas que las habían desplazado para verificar los resultados anteriores. Además, se estudiaron las velocidades de fermentación y tolerancia a elevadas concentraciones de azúcares reductores de las levaduras empleadas.

### - **Material y Métodos**

De los depósitos inoculados en las bodegas, se aislaron las levaduras autóctonas predominantes y se enfrentaron a las cepas comerciales empleadas como cultivo iniciador. Se emplearon un total de 18 cepas autóctonas y 14 cepas comerciales, realizándose un total de 18 micro-vinificaciones.

El sustrato fue un mosto comercial corregido en cuanto a su contenido en azúcar e inoculado con la misma población de levadura seco-activa y autóctona ( $10^6$  ufc/mL). La fermentación se realizó en anaerobiosis a 28°C, hasta agotar los azúcares del mosto. El muestreo se llevó a cabo en dos momentos del proceso: en la etapa exponencial, cuando la fermentación era tumultuosa, y hacia el final de la fase estacionaria. Las muestras se sembraron empleando agar YEPD como medio de cultivo, la temperatura de incubación fue de 28 °C y el tiempo 48 horas. Se aisló un 10% de las colonias obtenidas caracterizándose a nivel de cepa mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial (Querol *et al.*, 1992).

Por otra parte, a cada una de las cepas de levaduras se les estudió la velocidad y cinética de fermentación, así como su tolerancia a altas concentraciones de azúcar.

### - **Resultados y Discusión**

Mediante el análisis genético se obtuvieron los perfiles de 360 aislados, lo que permitió conocer el % de implantación de cada uno. Estos porcentajes junto con el que se encontró en la bodega, se recogen en la Tabla 1.

En ella se muestra que un porcentaje importante de las levaduras autóctonas que en bodega habían desplazado a las comerciales, mostraron un idéntico comportamiento en las co-fermentaciones de laboratorio. Otras espontáneas mejoraron notablemente su grado de implantación en las microvinificaciones. En cambio tres de ellas se comportaron de modo similar tanto en bodega como en el laboratorio, mostrando un ligero predominio en las micro-vinificaciones. Tan sólo una de las levaduras autóctonas redujo su presencia en la co-fermentación con respecto a lo observado en el depósito. Por otra parte, en alguna bodega una misma levadura comercial mostró un carácter recesivo frente a más de una cepa autóctona.

Tabla 1. Comparación de los porcentajes de implantación de las levaduras autóctonas en fermentaciones realizadas en bodega y en el laboratorio.

LEV. AUTÓC.	LSA	% IMP. TANQUE	% IMP. COFERM.	LEV. AUTÓC.	LSA	% IMP. TANQUE	% IMP. COFERM.
3	23	100	100	8	7	40	100
29	17	100	100	38	6	40	100
37	5	80	100	39	6	30	40
35	13	80	100	14	2	30	100
7	7	50	100	19	4	40	100
28	17	55	100	5	23	40	100
36	6	60	100	31	29	44	50
34	8	60	90	32	31	30	100
40	15	55	0	33	30	30	50

Respecto a la cinética de fermentación, el 56 % de las cepas autóctonas presentaban una velocidad de fermentación mayor que las levaduras comerciales con las que co-fermentaron, y tan sólo un 5 % fermentaba más lentamente que la levadura seleccionada. Además, 3 de las 14 levaduras comerciales no crecían a elevadas concentraciones de azúcar. Esto podría explicar, en la mayoría de los casos, el hecho de que algunas levaduras autóctonas mejor adaptadas a su entorno ecológico desplacen a las levaduras comerciales en los tanques de fermentación

#### - Conclusiones

Los resultados de este estudio corroboran los de un trabajo anterior, indicando que las levaduras seco-activas no siempre dominan los procesos de fermentación, y son desplazadas por levaduras autóctonas mucho mejor adaptadas al medio, como demuestra el hecho de que en la mayoría de los casos presenten cinéticas mejores a las de las levaduras seleccionadas.

Estos resultados vuelven a incidir en la necesidad de comprobar el grado de implantación en de los cultivos iniciadores empleados a nivel industrial, para asegurar que el proceso fermentativo se lleva a cabo por la cepa deseada.

#### - Referencias Bibliográficas

1. Barraón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L.J., Briones, A. 2008. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from la mancha region. Enviado.
2. Lopes, C. A.; Rodriguez, M. E.; Sangorrin, M.; Querol, A.; Caballero, A. C. 2007. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2), 139-149.
3. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T.; Ramón, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* 58 (9), 2948-2953
4. Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., Dequin, S. 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5 (10), 959-969.

SELECCIÓN DE CEPAS INICIADORAS PARA LA FERMENTACIÓN DE VINOS DE JEREZ

**Palero MJR.<sup>1</sup>, Codón AC.<sup>1</sup>, Benítez T.<sup>1</sup> y Valcárcel MJ.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avd. Reina Mercedes s/n, 41012, Sevilla. machupi@us.es

<sup>2</sup>Beam Global España S.A. c/ San Ildefonso nº3, 11403. Jerez de la Frontera. Cádiz. manuel.j.valcarcel@beamglobal.com

**- Introducción y Objetivos**

El empleo de cultivos iniciadores, o pie de cuba, en vinificación es una práctica habitual. Estos iniciadores deben cumplir una serie de propiedades como: alto poder fermentativo, tolerancia a alcohol etílico, baja producción de acidez volátil, buena cinética fermentativa y ausencia de defectos olfativos, entre otras. El empleo de nuevas tecnologías, como la recolección de uva mecánicamente, que implica mayor rotura de granos que en la recolección manual, la adición de metabisulfito y ascórbico para impedir oxidaciones, la utilización de fermentadores de acero inoxidable, y un largo etc. hacen deseable la selección de nuevos cultivos iniciadores mejor adaptados a estas condiciones. En este trabajo se presenta el proceso de aislamiento y selección de cepas de *Saccharomyces* autóctonas del marco de Jerez que cumplen todos estos criterios.

**- Material y Métodos**

El mosto empleado fue mosto de uva palomino, 100 mg/l de sulfuroso. Para los ensayos de laboratorio el mosto empleado fue esterilizado mediante filtración. Las medidas de azúcares y acidez volátil se realizaron en un autoanalizador de flujo fragmentado. La graduación alcohólica se determinó en un equipo de Infrarrojo Medio con Transformada de Fourier. Las cepas utilizadas como control fueron cepas fermentativas empleadas normalmente en vinificación. La cepa C1 fue utilizada como control de acidez volátil alta y la cepa C2 como control de acidez volátil baja. El fenotipo killer se determinó en medio sólido YPD tamponado a pH 4,5. Como controles se utilizaron la cepa K1 (productora de toxina k1), la cepa K2 (productora de toxina k2) y la cepa Ksens, sensible a ambas toxinas. Las condiciones de separación de cromosomas son las que se describen en Codón AC. *et al.* (Appl Microbiol Biotechnol. 1998).

**- Resultados y Discusión**

En la vendimia del 2007 se realizaron fermentaciones espontáneas en fermentadores de acero inoxidable de 30 m<sup>3</sup>, en los que no se reguló la temperatura, en bodegas de Jerez. Se tomaron muestras en esterilidad en el inicio, durante y tras la fase tumultuosa. Estas se transportaron

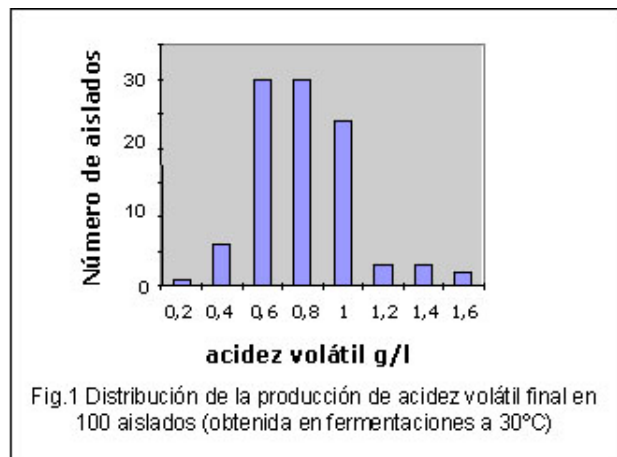


Fig.1 Distribución de la producción de acidez volátil final en 100 aislados (obtenida en fermentaciones a 30°C)

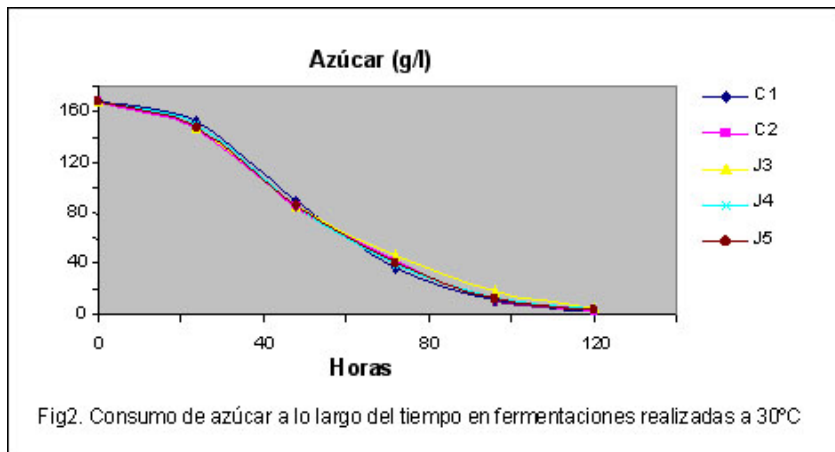


Fig2. Consumo de azúcar a lo largo del tiempo en fermentaciones realizadas a 30°C

al laboratorio para su dilución y siembra. A partir de las muestras del final de la fermentación, se obtuvieron 100 aislados de levaduras *Saccharomyces* capaces de fermentar vigorosamente a 20 y a 30°C. Se midió el contenido en azúcares residuales y acidez volátil a 30°C. En la fig.1 se muestra la distribución de acidez volátil obtenida para los 100 aislados.

A partir de estos 100 aislados se seleccionaron aquellos de la población que producían menor acidez volátil (acidez igual o menor a 0,4 g/l), agotaban prácticamente el azúcar, tenían alto poder alcoholígeno y poseían una correcta cinética de fermentación. En la fig.2 se muestra la cinética de fermentación a 30°C, expresada como consumo de azúcar frente al tiempo, para tres aislados (J3, J4 y J5) y los controles (C1, C2)

Se seleccionaron finalmente 5 aislados denominados J1, J2, J3, J4 y J5.

Se determinó el patrón cromosómico de cada una de las cepas. Se comprobó que eran distintos entre sí y distintos a las cepas control como se ilustra en la fig. 3.

Se llevaron acabo microvinificaciones de 1l con todos las cepas seleccionadas y con las cepas control C1 y C2. Se comprobó de nuevo la correcta cinética fermentativa y la reproducibilidad de los parámetros de interés (azúcar residual, grado y acidez volátil). Se comprobó también que los 5 aislados eran floculantes, dejando, al final de la fermentación, un mosto claro, limpio y brillante.

Todas las microvinificaciones fueron sometidas a pruebas de cata, por al menos 5 catadores, para descartar posibles defectos olfativos.

Se determinó el fenotipo de sensibilidad/resistencia a killer de los 5 aislados. Todos resultaron ser resistentes a la toxina k2 (la mas relevante en vinificación). Además, se determinó la capacidad productora de toxina. Los aislados J2, J3, J4 y J5 resultaron productores de toxina tipo k2. El aislado J1 resultó ser no productor.

C1 J3 J4 J5 J1 J2 C2

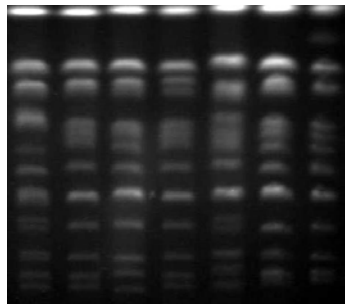


Fig. 3. Patrón cromosómico de las cepas seleccionadas y de las cepas control

### Conclusiones

Se han seleccionado 5 cepas (J1, J2, J3, J4 y J5) de *Saccharomyces* a partir de mostos en fermentación espontánea de uva palomino en bodegas del marco de Jerez. Estas cepas, aisladas al final de la fermentación tumultuosa, cumplen los criterios tecnológicos deseables en la zona para una cepa iniciadora de fermentación:

Tienen alto poder alcoholígeno y alta tolerancia al alcohol etílico.

Desarrollan una correcta cinética fermentativa.

Dan lugar a mostos fermentados con baja acidez volátil.

Son resistentes al sulfuroso empleado en vinificación.

Aunque en vinificación la temperatura se regula a 25°C, estos aislados poseen alta capacidad fermentativa, al menos, hasta 30°C.

Tienen carácter floculante y carecen de defectos organolépticos.

Son resistentes a la toxina K2 y algunos de ellos son productores de la misma.

Además se ha determinado el patrón cromosómico de las cepas seleccionadas, lo que permitiría su seguimiento en fermentación de mostos no estériles en una posible implantación en bodega.

## MEJORA DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL VINO MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE CEPAS FERMENTATIVAS MEJORADAS.

**Fierro J.<sup>1</sup>, Codón A. C.<sup>1</sup> Rincón AM<sup>1</sup>. y Benítez T.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Dpto de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Campus de Reina Mercedes, 41012, Sevilla, [jfierro@us.es](mailto:jfierro@us.es).

### 1.- Introducción y Objetivos:

Las levaduras de fermentación son las responsables de metabolizar los azúcares presentes en el mosto para su conversión a etanol y CO<sub>2</sub> (Querol 2003), además el metabolismo de estas levaduras contribuye de manera importante en las características organolépticas del producto final. El empleo de cultivos iniciadores, o pie de cuba, en vinificación es una práctica habitual en nuestros días. Con objeto de obtener vinos jóvenes más aromáticos, en este trabajo se han seleccionados mutantes espontáneos superproductores de fenilalanina a partir de una cepa comercial (PDC) utilizada como pie de cuba en las bodegas de Jerez.

Tanto la fenilalanina, como el triptófano y la tirosina tienen el mismo intermediario común. El catabolismo de estos aminoácidos termina dando alcoholes secundarios y terciarios que contribuyen al aroma final, por ejemplo el fenetilalcohol, triptofol, isopropanol, e isobutanol (Fukuda 1991, Dickinson 2003).

Por otro lado se han obtenido derivados de la cepa PDC que sobreexpresan los genes ATF1 y/o ATF2. Estas enzimas son responsables de la formación de la mayoría de los ésteres de acetatos volátiles producidos durante la fase fermentativa, algunos de los más importantes y de los que confieren mayor aroma afrutado al vino son el acetato de fenil etilo, acetato de isoamilol o el fenil-2 etanol (Verstrepen 2004). Sobreexpresando estos genes esperamos obtener vinos con mayores niveles de estos compuestos.

### 2.- Materiales y Métodos:

Las cepas 2.1, 2.6, 6.1 y 8.1 son mutantes espontáneos seleccionados por resistencia a p-fluoro-fenilalanina, un análogo tóxico de fenilalanina, a partir de la cepa PDC.

PDCΔLEU es un derivado auxótrofo de leucina obtenido por delección sucesiva de todos los genes LEU2 presentes en la cepa PDC.

PDC::ATF1 y PDC::ATF2 son el resultado de la transformación de PDCΔLEU con una construcción integrativa que consta de un promotor de fuerte expresión en mosto, el gen de interés y el gen LEU2 como marcador de selección. La utilización de marcadores de auxotrofia en vez de marcadores de resistencia bacterianos facilitaría el uso industrial de las cepas obtenidas.

El contenido en aminoácidos se determinó mediante HPLC. Los ensayos de microvinificación se realizaron en mosto de uva palomino con un contenido en azúcar del 20% y mimetizando las condiciones de bodega. Para la determinación de azúcares se utilizó el método desarrollado por Somogyi (1952) y Nelson (1957). Las medidas de metabolitos, alcoholes y ésteres aromáticos se realizaron mediante cromatografía de gases.

### 3.- Resultados y Discusión:

Los mutantes resistentes al análogo tóxico descritos anteriormente y la cepa silvestre se cultivaron en medio mínimo sintético (SD) y se sometieron a ensayos de microvinificación. Se determinó el contenido interno de fenilalanina en estas condiciones, observándose un aumento en los mutantes del orden de 3 a 8 veces en SD (Fig. 1A) y de 2-3 veces en mosto de uva (Fig. 1B y 1C)

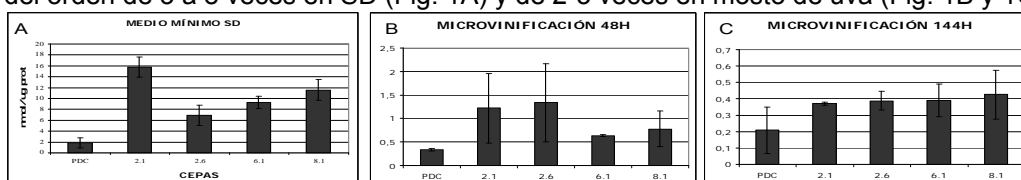


Figura 1.- Contenido interno de fenilalanina del pie de cuba silvestre y de los mutantes resistentes a para-fluoro- fenilalanina

Además, aunque el consumo de azúcar es similar en los mutantes y en la cepa silvestre en los ensayos de microvinificación (Fig. 2A), la velocidad de crecimiento es ligeramente superior en todos los mutantes (Fig. 2B). El cariotipo electroforético muestra pequeñas diferencias entre los mutantes y la cepa silvestre (Fig. 3).

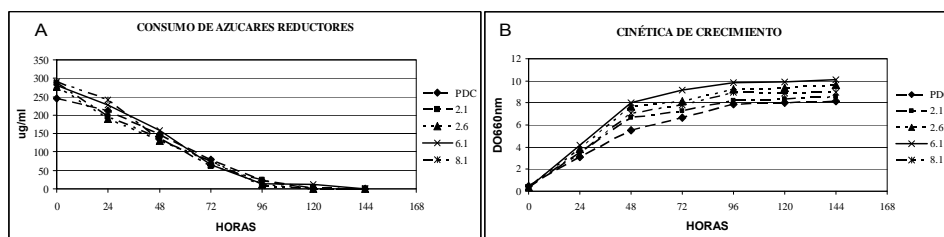


Figura 2.- Consumo de azúcares reductores (A) y cinética de crecimiento (B) de los mutantes y del pie de cuba silvestre.

Este resultado parece indicar que se han producido pequeñas reorganizaciones cromosómicas durante el proceso de selección.

Una vez realizada la microvinificación se llevaron a cabo los análisis de metabolitos, alcoholes superiores y ésteres aromáticos del vino obtenido. Los resultados muestran aumentos en algunos compuestos aromáticos en los vinos producidos por los mutantes, por ejemplo fenil etanol (Tablas 1 y 2). Se han llevado a cabo catas olfativas realizadas por expertos, los cuales destacan en estos vinos un marcado aroma herbáceo y floral.

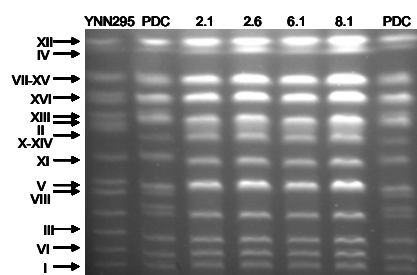


Figura 3.- Cariotipo electroforético de los mutantes y pie de cuba silvestre

Actualmente se están caracterizando molecular y fisiológicamente las cepas PDC::ATF1 y PDC::ATF2 para realizar ensayos de microvinificación y posterior análisis organoléptico del vino resultante.

#### 4.- Conclusiones:

Las fermentaciones realizadas con los mutantes superproductores dan como resultados vinos más aromáticos. Además las características del producto final obtenido difieren con cada mutante y por tanto el aroma, lo que permite realizar fermentaciones dirigidas inoculando con un pie de cuba específico según queramos obtener un tipo u otro de vino. Por otro lado el comportamiento durante la fermentación de los mutantes es similar al de la cepa silvestre, siendo incluso mejor en algunos parámetros como por ejemplo la cinética de crecimiento, lo que podría suponer una disminución del periodo de fermentación.

**Alcoholes Superiores**  
Concentración (mg/L)

**Tablas 1 y 2**

**ÉSTERES**  
Concentración (mg/L)

	185	185.2.1	185.2.6	185.6.1	185.8.1		185	185.2.1	185.2.6	185.6.1	185.8.1
acetaldehído	81,4 (100%)	65,5(80%)	66,1(81%)	70,5(87%)	71,1(87%)	C6 etilo	0,3 (100%)	0,4 (133%)	0,3(100%)	0,2(66%)	0,3(100%)
metanol	56 (100%)	59,7(106%)	54,6(97%)	56,6(101%)	54,2(97%)	lactato etilo	18,8(100%)	19,5(104%)	21,7(115%)	20,6(110%)	18,5(98%)
N-propanol	32,2 (100%)	30,4(94%)	29,1(91%)	22,2(69%)	24,5(76%)	hexanol	0,4(100%)	0,5(125%)	0,5(125%)	0,4(100%)	0,5(125%)
acetato de etilo	20,6 (100%)	20,1(97%)	24,1(117%)	21(102%)	18,6(90%)	C8 etilo	0,3(100%)	0,1(33%)	0,1(33%)	0,3(100%)	0,4(133%)
I- butanol	85,5 (100%)	151,7(177%)	156,6(183%)	131,1(153%)	139,1(163%)	C10 etilo	0,7(100%)	0,9(128%)	0,9(128%)	0,7(100%)	1,1(157%)
N- butanol	0,4 (100%)	0,3(75%)	0,2(50%)	0,1(25%)	0,3(75%)	C12 etilo	0,2(100%)	0,3(150%)	0,3(150%)	0,3(150%)	0,3(150%)
acetoina	3,9 (100%)	2,1(54%)	1,6(41%)	1,5(38%)	2,2(56%)	2-Fenil Etanol	12,3(100%)	285,5(2300%)	322(2600%)	321,5(2600%)	341,8(2800%)
2-me-1 butanol	16,9 (100%)	24,8(147%)	29,3(173%)	26,3(156%)	27,3(162%)						
3-metil-1 butanol	72,5 (100%)	103,1(142%)	117,8(162%)	104,3(144%)	119(164%)						
dietil acetal	5 (100%)	7,1(142%)	6,68(132%)	10,1(202%)	6,9(138%)						

#### 5.- Bibliografía:

- 1.- Querol A, Fernández Espinar MT, del Olmo M, Barrio E. "Adaptive evolution of wine yeast" Int Food Microbiol Sep 1 86 (1-2) (2003) p.3-10. Review.
- 2.- Dickinson JR, Salgado LEJ, Hewlins MJE. "The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*" JBC 278 (2003) p.8028-8034.
- 3.- Fukuda K, Watanabe M, Asano K, Ouchi K, Takasawa S. "Isolation and genetic study of p-Fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants overproducing  $\square$ -phenetyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*". Current Genetics 20 (1991) p.449-452.
- 4.- Kevin j. Verstrepen, Stijn D.M. Van Laere, Bart M.P. Vanderhaegen, Guy Derdelinckx, Jean-Pierre Dufour, Isak S. Pretorius, Joris Winderickx, Johan M. Thevelein, Freddy R. Delvaux. "Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes ATF1, Lg-ATF1 and ATF2 Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters". Appl. Env. Microbiol. Sep (2003) p. 5228-5237.
- 5.- Nelson NJ. Colorimetric analysis of sugars. Methods. Enzymol. 1957 3: 85-86.
- 6.- Somogyi M. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 1952 195: 19-23

**ANÁLISIS DE GENES DE *Saccharomyces cerevisiae* IMPLICADOS EN TERMOTOLERANCIA DURANTE FERMENTACIONES VÍNICAS A BAJAS TEMPERATURAS**

**Chiva R<sup>1,2</sup>, Guillamon J.M<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Biotecnología Enológica. Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Enologia, Universitat Rovira i Virgili. Marcel·li Domingo s/n, 43007, Tarragona, España.*

<sup>2</sup>*Departamento de Biotecnología de los alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), P.O. Box 73, E-46100 Burjassot, Valencia, España*

**Introducción y Objetivos**

En nuestro grupo hemos comprobado que fermentaciones vínicas realizadas a bajas temperaturas (10-15°C) mejoran significativamente los aromas del vino, tanto por mayor retención de aromas varietales (terpenos) como por mayor producción por parte de la levadura de aromas secundarios como ésteres (1). Sin embargo, la implementación en bodega de estas fermentaciones en frío es complicada. La ralentización del crecimiento de la levadura y la disminución de su capacidad fermentativa produce fermentaciones muy largas, pudiéndose incluso producir problemas de paradas de la fermentación (2).

Nuestro objetivo es conocer mejor los mecanismos moleculares de tolerancia a la baja temperatura y, así, poder en un futuro seleccionar o mejorar cepas vínicas más aptas para las fermentaciones en frío. Una de las estrategias seguidas ha sido el estudio de la función de diferentes genes ya descritos por su implicación en la tolerancia al frío (3). Para ello, y con la finalidad de ver el efecto de diferentes tasas transcripcionales, hemos obtenido mutantes y sobre-expresantes en un total de diez genes (*CSF1*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP104*, *LTE1*, *LOT2*, *NSR1*, *TCP1*, *TIP1* y *TIR2*) y en el fondo genético de una levadura vínica comercial. Hemos analizado el efecto de estos genes sobre el crecimiento de la levadura y sobre su capacidad fermentativa tanto a temperatura óptima como a baja temperatura.

**Material y Métodos**

A partir de la levadura vínica comercial de *Saccharomyces cerevisiae* QA23 (Lallemand Inc. Canadá) obtuvimos cepas heterotéticas y haploides mediante la estrategia de eliminar el gen *HO* de la cepa salvaje. Entre estas cepas vínicas haploides se seleccionó una que presentaba las mismas características de crecimiento y fermentación que la levadura vínica original. Esta cepa haploide (*ho-1*) simplificaba la tarea de obtener mutantes de una levadura vínica en los genes mencionados puesto que únicamente era necesaria suprimir una copia. Para la obtención de los diferentes mutantes se utilizaba el método descrito por Guldener (4), que consiste en sustituir el gen en cuestión por recombinación homóloga con un "casete de delección" que codifica para una resistencia a genética. Para la construcción de los sobre-expresantes, se utilizó una cepa derivada de la *ho-1* auxótrofa para la leucina. Los diferentes genes fueron integrados en el plásmido YEplac181 con sus propios promotores y terminadores.

Las diferentes cepas se crecieron durante toda la noche, se diluyeron hasta OD 0,05 (600 nm) y se inocularon en medio mínimo. Estos cultivos se incubaron a 13 y 25°C. El tiempo de duplicación se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm durante el crecimiento exponencial. Para determinar la capacidad fermentativa se realizó el seguimiento de consumo de azúcares a lo largo de las fermentaciones con mosto sintético en el laboratorio a ambas temperaturas,

**Resultados y Conclusiones**

Se obtuvieron todos los mutantes a partir del haploide de la cepa vínica, a excepción del mutante para *TCP1* que se ha descrito como no viable. En el caso de los sobre-expresantes no se han construido todos todavía, como es el caso de *CSF1*, *LOT2*, *LTE1* y *HSP104*, de forma que no disponemos de datos en este momento.

Los datos obtenidos en el tiempo de duplicación (Tabla 1) muestran que los mutantes más afectados son *NSR1* y *HSP12*. El tiempo necesitado para duplicar la población es significativamente mayor que el mostrado por la cepa control (*ho-1*). Aunque este aumento del tiempo de duplicación no solo ocurre a baja temperatura (13°C) sino que también lo observamos a temperatura óptima (25°C). Sin embargo, los genes *HSP26* y *HSP104* solo ven afectado su tiempo de duplicación a baja

temperatura. Con respecto al efecto de aumentar la tasa de transcripción, La sobre-expresión de los genes *HSP12* y *TIR2* produce una disminución del tiempo de duplicación a baja temperatura.

Tabla 1. Tiempo de duplicación entre los diferentes mutantes y sobre-expresantes con la cepa control *ho-1*. Cantidad de azúcares residuales de las fermentaciones a baja temperatura de mutantes y sobre-expresantes tras 35 y 15 días respectivamente de duración.

Genes	Tiempo de duplicación (horas)				Fermentación 13°C (g/L azúcares)	
	25°C		13°C		Mutante (35 días)	Sobre- expresante (15 días)
	Mutante	Sobre- expresante	Mutante	Sobre- expresante		
<i>NSR1</i>	8,8	4,23	27,2	21,94	25,64	4,08
<i>TCP1</i>	-	4,68	-	20,15	-	1,59
<i>LOT2</i>	4,4	-	15,9	-	25,64	-
<i>TIP1</i>	4,4	5,92	16,4	21,87	30,73	1,01
<i>TIR2</i>	3,6	3,81	19,4	18,24	19,67	3,4
<i>CSF1</i>	7,6	-	18,9	-	29,05	-
<i>LTE1</i>	5,7	-	17,2	-	21,73	-
<i>HSP26</i>	3,9	5,47	19,9	20,15	20,69	0,96
<i>HSP104</i>	4,3	-	19,7	-	52,27	-
<i>HSP12</i>	6,9	4,27	25,6	18,1	10,21	1,69
<b>Cepa <i>ho-1</i></b>	4,1	4,89	16,9	20,88	1,32	3,9

En cuanto al análisis de las fermentaciones se observó, que en el caso de los mutantes, cuando la cepa haploide terminó la fermentación (menos de 2 g/L de azúcares en el medio) a los mutantes les quedaban todavía una cantidad elevada de azúcares, destacando el caso de *HSP104*. Sin embargo, en los sobre-expresantes, hemos observado una mayor velocidad en la cinética fermentativa. La sobre-expresión de los genes *HSP26*, *NSR1*, *TIR2* y *TIP1* produjo un inicio de fermentación más rápido y una mayor tasa fermentativa. Estas cepas son las primeras en acabar la fermentación, incluso antes que la cepa control *ho-1* (Tabla 1).

En conclusión, este trabajo nos ha permitido ver que genes pueden ser importantes para el crecimiento y la capacidad fermentativa a baja temperatura. Destacar la importancia de los genes HSP, descritos como de respuesta a las altas temperatura pero, que por nuestros resultados, también parecen estar implicados en la tolerancia a la baja temperatura. Los genes *TIR2* y *TIP1* son proteínas de pared, también previamente relacionados con choques térmicos, cuya expresión mejora sustancialmente la capacidad fermentativa de la levadura. Por último, el gen *NSR1*, implicado en el procesamiento del RNA ribosomal y en la biogénesis de los ribosomas, también parece crucial tanto en el crecimiento como en la actividad fermentativa. Toda esta información puede orientar tanto la selección de nuevas cepas, basado en criterios moleculares, como la mejora genética de las ya existentes que permitan implementar las fermentaciones a baja temperatura en las bodegas.

### Bibliografía

- 1) Torija, M.J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamon, J.M.; Mas, A.; Rozes, N.. Int.J.Food Microbiol. 2003, 85, 127-136.
- (2) Bisson, L.F.. Amer. J. of Enol. and Viticult. 1999, 50, 107-119.
- (3) Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokals., Labourdette, D., Guillamon, J.M., Mas, A., François, J. and Rozes, N.. FEMS Yeast. Res. 2006, 6 (8), 1167-1183.
- (4) Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H.. Nucleic. Acids. Res. 1999, 24, 2519-2524.

## ESTUDIO DE IMPLANTACIÓN DE CEPAS DE *OENOCOCCUS OENI* AISLADAS DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA DE VINOS CENCIBEL

Seseña S.<sup>1</sup>, Ruiz P.<sup>1</sup>, Izquierdo P.<sup>2</sup> y Palop M.LI.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Area de Tecnología de los Alimentos, Dpto. de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla-La Mancha. Avda. Carlos III s/n. 45071, Toledo, Susana.SPrieto@uclm.es

<sup>2</sup>Instituto de la Vid y del Vino de Castilla-La Mancha. Crta. Toledo-Albacete s/n. 13700, Tomelloso (Ciudad Real).

### Introducción y Objetivos

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso clave para la obtención de vinos tintos de calidad, en especial aquellos que se destinan a crianza y sufren un envejecimiento posterior en botella. Actualmente, y para un mejor control del proceso, es cada vez mas frecuente la utilización de cultivos iniciadores constituidos por cepas de *Oenococcus oeni* seleccionadas. No obstante, y al objeto de mantener las características de identidad de los vinos, parece aconsejable la utilización de cepas autóctonas con adecuadas propiedades tecnológicas.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la capacidad de implantación de 8 cepas de *Oenococcus oeni* autóctonas, que fueron previamente caracterizadas y seleccionadas de entre 682 aislados obtenidos de la FML de vinos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha.

### Material y Métodos

Muestras de 100 mL de vino tinto Cencibel en el que había finalizado la fermentación alcohólica fueron inoculadas al 1% con un cultivo de noche de cada una de las 8 cepas de *Oenococcus oeni* (C1-C8). Los matraces fueron incubados en aerobiosis a 22°C hasta que se completó la FML. Cada cepa fue ensayada por duplicado (V1 y V2), utilizándose como control un vino sin inocular.

De cada uno de los cultivos se tomaron 4 muestras, una tras inocular (T0) y las otras tres en distintas etapas de la FML (T1, T2 y T3), determinadas en función de la concentración de ácido L-málico que contenían los vinos. Las muestras fueron sembradas en placas de agar MLO suplementado con 50 mg/mL de azida sódica y 100 mg/mL de cicloheximida y con un 10% (v/v) de jugo de tomate, que se incubaron a 30°C en anaerobiosis durante 5 días. Tras la incubación se realizaron los recuentos que se expresaron como ufc (unidades formadoras de colonias)/mL de muestra. De las placas utilizadas para los recuentos se tomaron un número de colonias, representantes de todas las morfologías observadas, que fueron resembradas en el mismo medio hasta su purificación. Los cultivos puros fueron conservados a -80°C con glicerol (20% v/v) como crioprotector.

Los aislados fueron analizados mediante RAPD-PCR según el procedimiento descrito por Sánchez et al. (2004), utilizándose el cebador M-13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), y los perfiles obtenidos fueron comparados con aquellos de las cepas inoculadas.

Para la conversión, normalización y análisis de los perfiles de polimorfismo de ADN se utilizó el programa informático GelCompar versión 4.0 (Applied Maths). La comparación de los perfiles se realizó mediante el cálculo del coeficiente Dice, utilizándose un análisis cluster mediante el método de Single linkage, que permitió la construcción de los correspondientes dendrogramas de similitud. El valor de *r* (coeficiente Dice) se expresó en el dendrograma como % de similitud ( $r \times 100$ ).

### Resultados y Discusión

En todos los casos la duración de la FML fue de 10 días. Los recuentos de las muestras tomadas inmediatamente después de la inoculación (T0), alcanzaron valores comprendidos entre  $10^5$  y  $10^8$  ufc/mL, que pasaron a ser de  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL al final de la FML. En el vino sin inocular, los recuentos

iniciales fueron algo inferiores ( $10^4$  - $10^5$  ufc/mL) si bien al final de la FML los valores fueron muy similares a los de los vinos inoculados.

Se obtuvieron un total de 1260 aislados, 140 de cada uno de los ensayos (V1 + V2) efectuados para cada una de las cepas y 140 del control, de los que tras ser analizados mediante RAPD-PCR se obtuvieron perfiles de amplificación como los de la Figura 1.

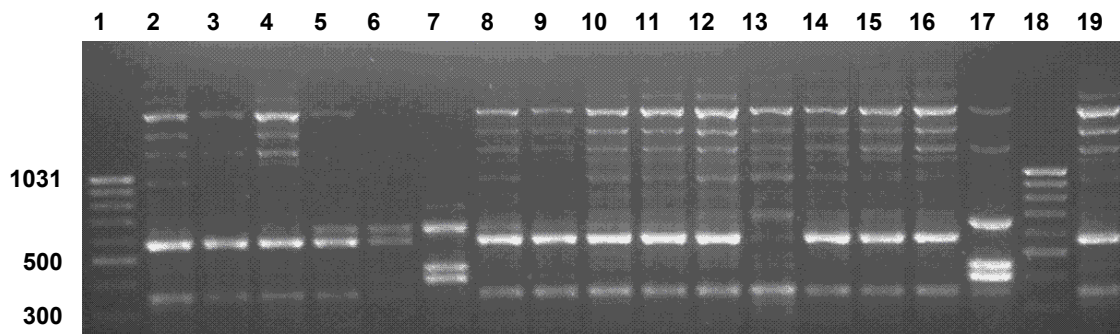


Figura 1. Perfiles RAPD-PCR obtenidos con el cebador M-13. Líneas 2-17: aislados procedentes de uno de los ensayos; Línea 19: cepa inoculada; Líneas 1 y 18: marcador de peso molecular.

El análisis cluster de los perfiles RAPD-PCR de los aislados procedentes de cada ensayo y de aquel de la cepa inoculada permitió la construcción de los correspondientes dendrogramas de similitud, a partir de los cuales y tras aplicar un valor para el coeficiente de similitud  $r = 65\%$ , se obtuvieron los porcentajes de implantación de las distintas cepas en cada uno de los ensayos (Figura 2).

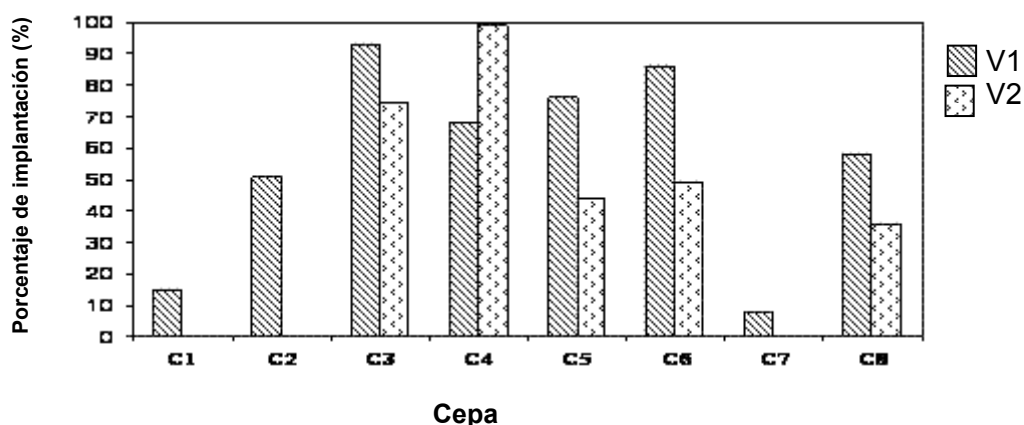


Figura 2. Porcentajes de implantación de las 8 cepas ensayadas

Las cepas C3 y C4 fueron las que mostraron un mejor comportamiento, ya que se implantaron en ambos ensayos alcanzándose valores medios para los porcentajes de implantación más elevados. Por el contrario las cepas C1 y C7 fueron las que mostraron un peor comportamiento.

### Conclusiones

En base a estos resultados y a los obtenidos en los anteriores ensayos de caracterización tecnológica, y aún a la espera de ser comprobado su comportamiento en bodegas de la región, puede concluirse que las cepas C3 y C4 de *O. oeni*, han demostrado tener características adecuadas para ser utilizadas como cultivos iniciadores.

### Referencias bibliográficas

Sánchez, I., Seseña, S., Palop, M.LL. (2004) Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with "Almagro" eggplants spontaneous fermentation based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis patterns. *Journal of Applied Microbiology* 97, 446-458.

**ECOLOGÍA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DURANTE LA VINIFICACIÓN EN UNA  
BODEGA DE D. O. Ca. Rioja.**

**Tenorio C.<sup>(1)</sup>, López I.,<sup>(1)</sup> Mangado A.,<sup>(1)</sup> López R.,<sup>(1)</sup> Garijo P.,<sup>(1)</sup> Santamaría P.<sup>(1)</sup>**

<sup>(1)</sup>Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario (CIDA). Ctra. Mendavia-Logroño,(NA-134) Km 88 Tf: 941-291383.ICVV (GOBIERNO DE LA RIOJA-CSIC-UNIVERSIDAD DE LA RIOJA) [microbiologia2.cida@larioja.org](mailto:microbiologia2.cida@larioja.org)

**Introducción y Objetivos**

La producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad, dependen del conocimiento y control de la microbiota presente. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos que se encuentran en ambientes naturales no pueden ser cultivados usando técnicas tradicionales. Para estudiar la diversidad de BL presentes durante todo el proceso de elaboración de un vino tinto, es necesario aplicar técnicas que nos permitan detectar los microorganismos viables y los no cultivables que constituyen la población de bacterias lácticas (BL) (Lonvaud-Funel 1999).

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la biodiversidad de BL a lo largo del proceso de elaboración de un vino tinto mediante técnicas basadas en microbiología clásica y Biología Molecular.

**Material y métodos.**

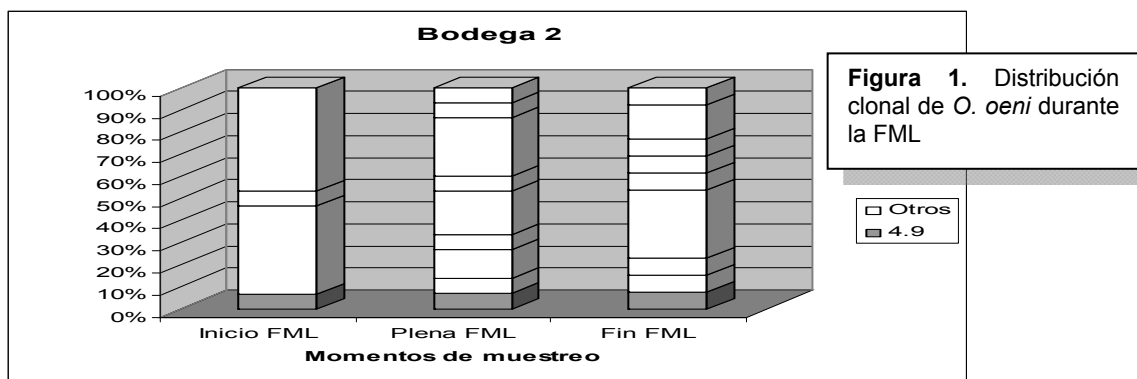
Este estudio se llevó a cabo durante la elaboración de un vino tinto de la variedad Tempranillo, en una bodega de Rioja Baja. Se seleccionó un depósito y se tomaron muestras en seis momentos a lo largo de todo el proceso de elaboración: mosto, Fermentación alcohólica (FA) en fase tumultuosa, fin de FA, inicio de Fermentación maloláctica (FML), FML tumultuosa (degradación del 60% de ácido málico) y fin de FML. El seguimiento de la FML se realizó mediante determinación del ácido málico mediante test enzimático. Las muestras recogidas en frascos estériles, fueron trasladadas al laboratorio y sembradas MRS agar modificado al que se le añadió pimaricina para inhibir el crecimiento de levaduras. Se incubaron a 30°C durante 10 días en condiciones de anaerobiosis. Se aislaron 15 colonias al azar, y posteriormente se llevó a cabo su identificación a nivel de especie y clon.

La identificación de las **bacterias viables** a nivel de especie se determinó mediante técnicas de microbiología clásica (Holt *et al.*, 2000), perfiles bioquímicos con API 50CHL (BioMeriux), y PCR específica de especie (Zapparoli *et al.*, 1998; Quere *et al.*, 1997, Beneduce *et al.*, 2004). La caracterización a nivel de clon se realizó mediante PFGE (Bert *et al.*, 1997) utilizando el enzima de restricción *Sfi*I y el sistema CHEF-DR III de BioRad.

Para el estudio de la población de **BL totales** (viables y cultivo independientes), se realizó la extracción del DNA directamente de todas las muestras (2 ml) utilizando el kit de extracción de Qiagen DNeasy plant y el equipo Fast-Pret. Una vez obtenido el DNA, se procedió al estudio de la diversidad de especies de BL mediante PCR-DGGE, utilizando los primers L1-HDA2 (Christiane B. Meroth *et al.*, 2003). Todas las bandas obtenidas en la DGGE, fueron cortadas y secuenciadas (Macrogen Inc, Korea).

**Resultados**

La población de **BL viables** en el vino varió entre  $1.40 \times 10^2$ (mosto) y en FML  $8.80 \times 10^7$  UFC/ml (fin FML). Las especies aisladas en FA fueron *O. oeni*, *L. brevis*, *L. malii*, *L. plantarum* y *Lactobacillus malii*. En los muestreos realizados en FML tumultuosa y al final de la misma, el 100% de los aislados pertenecieron a la especie *O. oeni* (Tabla 1). Entre las 61 colonias de *O. oeni* analizadas, se encontraron 20 perfiles de PFGE diferentes. En Inicio de FML se identificaron 4 clones, mientras que en las etapas de plena y fin de FML fueron 9 los perfiles obtenidos. Solo uno de ellos coincidió en todos los momentos del muestreo (AL 4.9) (Figura 1). Al final de la FML, la población de BL fue elevada ( $8.80 \times 10^7$  UFC/ml), lo que sugiere la necesidad de estabilización microbiológica del vino para evitar consecuencias desagradables por parte de las bacterias que ya han degradado el ácido málico y podrían degradar otros componentes del vino.



Al estudiar la población de **BL totales**, la diversidad de especies encontrada a lo largo del proceso de elaboración mediante PCR-DGGE fue mayor, diferenciando 6 especies de BL distintas: *Lactobacillus malii*, *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* sp, y *Weissella* sp (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies de BL identificadas mediante técnicas de microbiología clásicas y PCR-DGGE en las distintas etapas de elaboración de un vino tinto

Momentos estudiados	Microbiología clásica	Biología molecular (DGGE)
<b>Mosto</b>	<i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. malii</i> <i>O. oeni</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Weissella</i> sp.
<b>FA Tumultuosa</b>	<i>L. plantarum</i> <i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. malii</i>
<b>Fin FA</b>	<i>L. plantarum</i> <i>O. oeni</i>	<i>Weissella</i> sp. <i>L. plantarum</i> <i>Leu. mesenteroides</i>
<b>Inicio FML</b>	<i>O. oeni</i>	<i>L. plantarum</i> <i>O. oeni</i>
<b>FML Tumultuosa</b>	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>
<b>Fin FML</b>	<i>O. oeni</i>	<i>O. oeni</i>

### Conclusiones.

Al estudiar las **BL viables**, se detectaron *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. malii* y *O. oeni*, siendo esta última la única especie aislada durante la FML espontánea. Se ha encontrado una elevada diversidad clonal con 20 patrones de PFGE entre los aislados estudiados. Sólo uno de los clones aislados apareció durante toda la FML.

Al estudiar la población de **BL totales**, se obtuvo una mayor diversidad de especies de BL, detectando una alternancia de BL durante la etapa de FA, mientras que durante la FML las únicas especies detectadas fueron *O. oeni* y *L. plantarum*.

### **Bibliografía.**

- Beneduce, L., Spano, G., Vernile, A., Tarantino, D. and Massa, S.** (2004) Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *J. Basic Microbiol.* 44 (1): 10-16
- Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N.** (1997). Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Current Microbiology* 34: 226-229
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams.** (2000) Bergey's manual of determinative bacteriology. W. R. Hensyl (ed.), 9th ed., *Williams and Wilkins, Baltimore, Md.*
- Lonvaud-Funel 1999.** Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999 Jul-Nov;76(1-4):317-31. Review.
- Christiane B., Meroth, Jens Walter, Christian Hertel, Markus J. Brandt, and Walter P. Hammes.** (2003) MonitorinThe Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 475-482
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. and Dellaglio, F.** (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Let. Appl. Microbiol.* 27 (5): 243-246.

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES BACTERIANAS ASOCIADAS A LA VINIFICACIÓN: AISLAMIENTO DE ESPECIES NO DESCRITAS PREVIAMENTE**

***Mañes-Lázaro R.<sup>1</sup>, Pardo I.<sup>1</sup> y Ferrer S.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Enolab-Laboratorio de Microbiología Enológica, Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. 46100, Burjassot, Valencia, Rosario.Manyes@uv.es*

**- Introducción y Objetivos**

Las características del mosto y del proceso que lo transforma en vino hacen que este hábitat sea hostil para la mayor parte de los microorganismos: pH bajo, presencia de SO<sub>2</sub>, aumento del etanol, condiciones anaerobias durante la fermentación, pocos azúcares en el vino... Por estas razones, la biodiversidad no es elevada y sólo algunas bacterias acéticas, lácticas y levaduras forman parte de la microbiota asociada al proceso de vinificación. La identificación de estas especies y de su metabolismo, es de gran interés debido al importante papel que pueden tener sobre las características organolépticas de los vinos obtenidos. El objetivo fundamental de este trabajo fue la identificación de las bacterias acéticas y lácticas presentes en distintos momentos de la vinificación.

**- Material y Métodos**

**Origen y procesamiento de las muestras de vino**

Se tomaron ocho muestras de mostos y vinos de la D.O. Utiel-Requena en diferentes momentos de la vinificación, y se sembraron en placas de MRS con 0.5 g/L de L-cisteína y MLO (todas con natamicina para inhibir las levaduras). Se incubaron a 28 °C hasta obtener colonias aisladas que fueron clasificadas como bacterias lácticas (BAL) o bacterias acéticas (BA) según el carácter Gram, y la reacción a la prueba de la catalasa, que se analizaron según describen Rodas *et al.* (2003).

**Identificación a nivel de especie mediante 16S-ARDRA**

El gen 16S rRNA se amplificó por PCR directamente desde colonia según describieron Rodas *et al.* (2005) y se digirieron 500 ng del producto amplificado con 5 U de enzima de restricción: *MseI* para las bacterias lácticas y *AluI* y *HphI* para las acéticas, incubando 3 horas a 37 °C. Los fragmentos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 2% y los perfiles obtenidos fueron introducidos junto a las cepas de referencia en el programa BioNumerics 2.5. El análisis se llevó a cabo usando el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de correlación de Dice.

**Secuenciación del gen 16S y análisis filogenético**

El gen 16S rRNA se secuenció siguiendo el método descrito por Rodas *et al.* (2005). Posteriormente se llevó a cabo el análisis filogenético de los aislados aplicando varios métodos de reconstrucción filogenética, todo ello utilizando el programa BioNumerics 2.5.

**Pruebas fisiológicas**

Algunos aislados de bacterias acéticas se sometieron a análisis fenotípico: producción de ácido a partir de rafinosa (1%), formación de polisacáridos a partir de glucosa, fructosa y sacarosa (2.5%) (Lisdiyanti *et al.*, 2002) y crecimiento en agitación en MLO pH 3.0 a 28 °C y en MLO pH 4.8 a 30 °C.

**Hibridación DNA-DNA**

Se realizó la extracción de DNA genómico a partir de los cultivos puros siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* (1989) pero añadiendo CTAB. El DNA se cuantificó a 260 nm y se ajustó a una concentración final de 300 ng µl<sup>-1</sup> en agua Mili Q.

Los experimentos de hibridación DNA-DNA se realizaron a 63.2 °C y los experimentos se llevaron a cabo en duplicado tal como describen Ziemke *et al.* (1998).

**- Resultados y Discusión**

De las 98 colonias de bacterias aisladas, 31 resultaron ser BAL, 48 BA y 19 fueron descartadas por tratarse de contaminaciones ambientales no pertenecientes a estos grupos. Tras el análisis del 16S-ARDRA con *MseI*, 21 de las BAL se identificaron como *Oenococcus oeni*, 6 como *Lactobacillus mali*, 2 como *L. plantarum/pentosus* y una como *Pediococcus pentosaceus*. La digestión del gen 16S de las BA con *AluI*, permitió la identificación de 16 aislados como *Gluconobacter oxydans*, de 19 como *Acetobacter pasteurianus/pomorum*, de 7 como *A. aceti* y de 1 aislado como *Gluconacetobacter hansenii*.

Cinco aislados (Bo1, Bo3, Bs10, M11 y Mo 7) obtenidos de mosto Bobal y Macabeo, y clasificados como bacterias acéticas, no se correspondían con ninguna de las especies de BA descritas en vino, por lo que se secuenció el gen 16S rRNA de todos ellos. El análisis filogenético demostró que los aislados Bo1 y M11 mostraban 100 % de similitud de secuencia con *Acetobacter ghanensis* 430A<sup>T</sup>, y los aislados Bo3 y Bs10 mostraban 99.7 % de similitud de secuencia con *Acetobacter syzygii* 9H-2<sup>T</sup>. El aislado Mo7 mostró 100 % de similitud de secuencia con *Kozakia baliensis* Yo-3<sup>T</sup>.

El análisis 16S-ARDRA de los aislados Bo1, Bo3, Bs10 y M11 con *HphI*, confirmó que los aislados Bo1 y M11 pertenecían a la especie *A. ghanensis* y los aislados Bo3 y Bs10, a *A. syzygii*.

El aislado Mo7 dio crecimiento positivo a pH 3.0 y 30 °C, además de producir gran cantidad de polisacárido a partir de glucosa, fructosa y sacarosa, y de producir ácido a partir de rafinosa, características diferenciales del género *Kozakia* respecto al resto de géneros de bacterias acéticas.

Una cepa de BAL aislada de mosto Bobal (cepa 71), tampoco se correspondía con ninguna de las cepas de referencia aisladas de vino, por lo que se secuenció el gen 16S rRNA. El análisis filogenético reveló que la especie filogenéticamente más cercana era *Lactobacillus satsumensis* DSM 16230<sup>T</sup> con un 99.9 % de similitud de secuencia. Tras digerir el gen 16S de dicha cepa de referencia con *MseI*, se comprobó que el perfil de restricción coincidía con el del aislado de mosto. Para averiguar si realmente se trataba de la misma especie, se llevó a cabo la hibridación DNA-DNA entre el aislado 71 y *L. satsumensis* DSM 16230<sup>T</sup> y el resultado, expresado como valor medio de dos experimentos independientes, fue 98.2 %, and 99 % para la hibridación recíproca, revelando que la cepa 71 y *L. satsumensis* DSM 16230<sup>T</sup> pertenecen a la misma especie.

#### **- Conclusiones**

Por primera vez, en este trabajo se ha demostrado además de la presencia de especies bacterianas normalmente descritas en vino, la de especies de bacterias acéticas no asociadas previamente a este hábitat: *Acetobacter ghanensis* (aislada de semillas de cacao), *Acetobacter syzygii* (aislada de flores y frutos tropicales) y *Kozakia baliensis* (género no descrito antes en vino y aislado exclusivamente de azúcar de palma). También se describe por vez primera en vino la bacteria láctica *Lactobacillus satsumensis*, aislada anteriormente de shoshu.

#### **- Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RM2007-00007-00-00.

#### **- Referencias Bibliográficas**

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., *et al.* 2002. *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 813-818.

Rodas, A. M., Ferrer, S., Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 412-422.

Rodas, A. M., Ferrer, S., Pardo, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 197-207.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Ziemke, F., Höfle, M. G., Lalucat, J. & Roselló-Mora, R. 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 179-186.

**COMUNICACIONES PÓSTER**

**SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE LISTERIA MONOCYTOGENES AISLADAS DE VEGETALES CONGELADOS. (PAG 136)**

I. BALLESTEROS; G. CUESTA; Y. MORENO; I. CAÑIGRAL; M.A. FERRÚS.

**ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA DE BACTERIOCINAS EN SALMÓN AHUMADO. (PAG 138)**

D. BRAVO VÁZQUEZ; R. MONTIEL MORENO; M. MEDINA FERNÁNDEZ-REGATILLO.

**HIGIENIZACIÓN DE LONCHAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS ENVASADAS A VACÍO MEDIANTE ELECTRONES ACELERADOS. (PAG 140)**

M.C. CABEZA; L. DE LA HOZ; I. CAMBERO; J.A. ORDÓÑEZ.

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA HARINA DE PESCADO. (PAG 142)**

M.A. CALVO TORRAS; C. ADELANTADO FAURA; M. RODRÍGUEZ GONZÁLEZ; L. AROSEMENA ANGULO, L. PÉREZ CAULLÁN, S.CENTENO.

**EFFECTO DEL PH Y DEL TIPO DE ACIDIFICANTE SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACILLUS CEREUS TRAS UN TRATAMIENTO TÉRMICO MODERADO (PAG 144)**

S. MARTÍNEZ; I. FRANCO; J. CARBALLO.

**ESTUDIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE ELABORACIÓN DE QUESOS ARTESANALES DE GRAN CANARIA QUE INFLUYEN EN SU CONTAMINACIÓN BIOTICA.**

P. SAAVEDRA; E. SANJUAN, E. PÉREZ; R. MILLÁN; C. CARRASCOSA. (PAG 146)

**ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE DETERMINADOS PRODUCTOS A BASE DE VEGETALES Y FRUTAS. (PAG 148)**

M<sup>a</sup>.B. DE PABLO BUSTO; M<sup>a</sup>.V. BRAVO VÁZQUEZ; D. COLL JORDÁ; C. ORIA ERASO; C. ZIGORRAGA ARRIEN.

**EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS VIDAS SET II Y TRANSIA PLATE SET PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EN QUESOS. (PAG 150)**

M. DE SIMON SERRA; S. SABATÉ CAMPS; A. LUQUE LORENZO; M.D. FERRER ESCOBAR.

**OBSERVACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS COMIDAS SERVIDAS EN LOS COMEDORES ESCOLARES DEL DISTRITO SANITARIO GUADALQUIVIR. (PAG 152)**

A. DEL CASTILLO CARACUEL; E. FUETNES-GUERRA CABALLERO; M.C. ACOSTA RODRÍGUEZ; R. MANCHA CALERO; F. ROJAS PÉREZ; R.C. ALONSO PORRAS.

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA PCR A TIEMPO REAL Y EL SISTEMA MINI-VIDAS SLM PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. EN ALIMENTOS. (PAG 154)**

P. ELIZAQUÍVEL BÂRCENAS; J.A. GABALDÓN HERNÁNDE; R. AZNAR NOVELLA.

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL POLEN APIÓCOLA. ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA SU CONTROL Y CONSERVACIÓN. (PAG 156)**

I. FERNÁNDEZ MONISTROL; M.L. ORTIZ MARTÍNEZ; A.M. PEDREGOSA PÉREZ. A. QUINTANA-EDESA; F. QUIÑONES; J.A. HIGUERA; V. LEÓN; A. GONZÁLEZ.

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS DE LA CARNE DE AVESTRUZ ENVASADA AL VACÍO. (PAG 158)**

A. PINO; J. FERNÁNDEZ-SALGUERO; E. GALÁN; F. PRADOS.

**BIOCONTROL DE OCRATOXINA A EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA POLLOS DE ENGORDE PRODUCIDOS EN VENEZUELA. (PAG 160)**

S. FIGUEROA; S. CENTENO; C. ADELANTADO; M.A. CALVO.

**APLICACION DE MODELOS PREDICTIVOS DISPONIBLES PARA LA ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN COMEDORES COLECTIVOS. (PAG 162)**

R.M. GARCÍA-GIMENO; A. CARACUEL; A. VALERO; F. PÉREZ; E. CARRASCO; G. ZURERA.

**DISEÑO DE UN MODELO DE VALORACIÓN DEL RIESGO DE LISTERIOSIS POR CONSUMO DE SALMÓN AHUMADO. (PAG 164)**

V. GARRIDO GONZÁLEZ; I. GARCÍA JALÓN DE LA LAMA; A.I. VITAS PEMÁN; M. SANAA.

**DETECCIÓN ESPECÍFICA DE ASPERGILLUS ELEGANS MEDIANTE PCR. (PAG 166)**

J. GIL SERNA; A. GONZÁLEZ SALGADO; C. VÁZQUEZ ESTÉVEZ; M.T. GONZÁLEZ JAÉN; B. PATIÑO ÁLVAREZ.

- DETECCIÓN DE CEPAS TOXIGÉNICAS DE ASPERGILLUS Y FUSARIUM EN CEREALES ESPAÑOLES.** (PAG 168)  
A. GONZÁLEZ SALGADO; P. MARÍN GARCÍA; M. ESTÉBAN TORRES; C. FERNÁNDEZ HEVIA; B. PATIÑO ÁLVAREZ; J. GIL SERNA; C. VÁZQUEZ ESTÉBEZ; M.T. GONZÁLEZ JAÉN.
- CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MANIPULADORES DEL BANCO DE LECHE HUMANA DE BLUMENAU – SANTA CATARINA (BRASIL).** (PAG 170)  
M.G. REITER; S. PETZOLD; T.L. ARCOVERDE, R. JORDANO.
- PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y ANALISIS SALMONELLA DENTRO DEL SISTEMA DE AUTOCONTROL DE UN MATADERO DE PORCINO.** (PAG 172)  
M.M. IBÁÑEZ FERNÁNDEZ; J. MIRAS MALDONADO; J. MARTÍNEZ MORENO; J.M. MANZANO REYES; J.M. CARRILLO ALBALADEJO; A. CAYUELA PÉREZ.
- PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y RECuento DE COLONIAS AEROBIAS DE NTRO DEL SISTEMA DE AUTOCONTROL DE UN MATADERO DE PORCINO.** (PAG 174)  
M.A. MARTÍN LINARES; J.M. MANZANO REYES; A. CAYUELA PÉREZ; M.M. IBÁÑEZ FERNÁNDEZ; M.J. MIRAS MALDONADO; M. MARTÍNEZ MORENO.
- EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO EN LA CONSERVACIÓN DE “LECHAZO ASADO” ENVASADO A VACÍO.** (PAG 176)  
B. MARTÍNEZ; B. RUBIO; M.D. GARCÍA-CACHÁN.
- COMPARACIÓN MÉTODO AUTOMATIZADO TEMPO STA FRENTE A LO MÉTODOS DE RECuento EN PLACA SEGÚN ISO 6888-2 Y PETRIFILM STX.** (PAG 178)  
J. MUÑIZ; M. ÁLVAREZ; M. ALVES; T. RUBIO; A.I. MATA.
- DETECCIÓN DE CEPAS MICOTOXIGENICAS EN TRIGOS ESPAÑOLES.** (PAG 180)  
N. SARDIÑAS DÍAZ; I. MÉNDEZ RODRÍGUEZ; M. ESTEBAN TORRES; B. PATIÑO ÁLVAREZ; M.T. GONZÁLEZ JAÉN; C. VÁZQUEZ ESTÉBEZ.
- CALIDAD HIGIÉNICA DE COMIDAS PREPARADAS DE ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA.** (PAG 182)  
P. PESO ECHARRI; D. PÉREZ CONESA; C. LLAMAS BOTÍA; J. FLORES RUIZ; C. MARTÍNEZ GRACÍA; G. ROS BERRUEZO.
- EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS DE LAS FUENTES QUE NO MANAN DE LA RED DE LA PROVINCIA DE VALENCIA.** (PAG 184)  
F. QUILES MUÑOZ; P. MARTÍ REQUENA; S. MORMENEO BERNAT; M<sup>a</sup>.L. CAMARÓ SALA; T. SACRISTÁN VENDRELL; M<sup>a</sup>. IRANZO RÓDENAS.
- EFFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PATULINA POR PENICILLIUM EXPANSUM DE DIFERENTES VARIEDADES DE MANZANAS Y PERAS.** (PAG 186)  
A.J. RAMOS; H. MORALES; G. BARROS; S. MARÍN; V. SANCHIS.
- VERIFICACIÓN DE S. aureus EN LECHE MATERNA PROCEDENTE DEL BANCO DE LECHE HUMANA DE BLUMENAU, SANTA CATARINA, BRASIL.** (PAG 188)  
C.M. SCHÜLER; R. IMIANOVSKY; R. JORDANO; M.G.R. REITER.
- MODELIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE Staphylococcus aureus EN LECHE MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE BACTERÍOFAGOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL.** (PAG 190)  
J. OBESO; B. MARTÍNEZ; F.N. ARROYO-LÓPEZ; A. GARRIDO-FERNÁNDEZ; P. GARCÍA; A. RODRÍGUEZ.
- DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN ENSALADAS Y PREPARADOS CÁRNICOS LISTOS PARA SU CONSUMO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EXTREMADURA.** (PAG 192)  
M. RODRÍGUEZ JOVITA; E.M. CASADO SÁNCHEZ; B. SÁNCHEZ NAVARRO; M.J. ANDRADE GRACIA; R. GORDILLO DURÁN; J.J. CÓRDOBA RAMOS.
- SECUENCIACIÓN AMINOACÍDICA E IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA RP42C DE UNA CEPA DE PENICILLIUM CHRYSOGENUM.** (PAG 194)  
A. RODRÍGUEZ MARTÍN; M.A. ASENSIO PÉREZ; F. NÚÑEZ BREÑA.
- VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN DEL ENTEROCOCCUS FAECALIS MEDIANTE ACIDIFICACIÓN.** (PAG 196)  
M.R. RODRÍGUEZ VARGAS; J.S. AGUIRRE GARCÍA; G.D. GARCÍA DE FERNANDO MINGUILLÓN.
- PELIGROS EN LA FABRICACION Y ENVASADO DE ZUMO DE NARANJA.** (PAG 198)  
M.V. ROMERO LÓPEZ ARIZA.
- CARACTERIZACIÓN DE UN MICROORGANISMO ADECUADO PARA LA VALIDACIÓN DE PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN DE ALIMENTOS INFANTILES.** (PAG 200)  
M. ROS-CHUMILLAS; V. ANTOLINOS; F. ROMERO; P. ABELLÁN; P.M. PERIAGO.
- ESTUDIO DE LAS CONDICIONES HIGIENICO SANITARIAS COMO FACTOR DE RIESGO MICROBIOLÓGICO EN INDUSTRIAS DEL SECTOR HARINAS Y DERIVADOS.** (PAG 202)  
M.J. SÁNCHEZ ARIZA; M.V. ROMERO LÓPEZ.

**PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN CANALES DE PORCINO Y AVE DE UN DISTRITO SANITARIO. (PAG 204)**

J.A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ; F.M. VINUESA RUIZ; C. CASTELL NOFUENTES; P. GUIJOSA CAMPOS; A. RAYA HIDALGO; A. LÓPEZ LUQUE; M.A. MARTÍNEZ MOYA; B. LINDEZ LINDEZ; V.I. COLLADO ESCOBAR; A. RODRÍGUEZ LÓPEZ.

**PREDICCIÓN DEL CRECIMIENTO DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS EN EXTRACTO DE PIMENTÓN EN FUNCIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE AGUA. (PAG 206)**

S. MARÍN SILLUÉ; C. COLOM ESPADA; V. SANCHIS ALMENAR; A.J. RAMOS GIRONA.

**OCRATOXINA A EN PLASMA DE DONANTES DE SANGRE DE LA PROVINCIA DE LLEIDA.**

V. SANCHIS ALMENAR; M.B. CORONEL; J. PERIS VICENTE; A.J. RAMOS GIRONA; S. MARÍN SILLUÉ. (PAG 208)

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CRIBADO MULTIMATRIZ PARA LA DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS. (PAG 210)**

L. MATA; D. SANZ; P. RAZQUIN.

**ESTUDIO DE CAMPYLOBACTER EN CARNE Y PREPARADOS DE CARNE DE AVE A LO LARGO DE LA CADENA ALIMENTARIA EN LA COMUNIDAD DE MADRID. (PAG 212)**

C. OTERO; S. GARCÍA; M. ALONSO; A. JIMÉNEZ.

**PREVALENCIA DE SALMONELLA ENTERICA EN HUEVOS FRESCOS PRODUCIDOS Y COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID. PERIODO 2005-2007. (PAG 214)**

A. JIMÉNEZ; S. IÑIGO; P. ESTRADA; J. CASTRO.

**PREVALENCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN ALIMENTOS ELABORADOS Y COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID. PERIODO 2005-2007. (PAG 216)**

M. FERNÁNDEZ; C. FERNÁNDEZ; P. CARBONERO; A. JIMÉNEZ.

**ENTEROBACTERIAS EN PRODUCTOS DE CUARTA GAMA: AISLAMIENTO Y RESISTENCIA A ANTIMICTROBIANOS. (PAG 218)**

H. RICO; C. SEBASTIÁ; G. SANTOS; J.M. SORIANO.

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS COMIDAS ELABORADAS EN DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS ALIMENTARIOS. (PAG 220)**

SERRANO, S.; SÁNCHEZ, J.A.; MARFIL, R.; JODRAL, M.L.

**METODOLOGÍA**

**RECUESTO AUTOMATIZADO DE MICROORGANISMOS MEDIANTE TRATAMIENTO DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS DIGITALES. (PAG 222)**

S. CALLEJÓN; S. FERRER; I. PARDO.

**WHOLE-CELL BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF BACTERIOPHAGES BY ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY. (PAG 224)**

C. GARCÍA-ALJARO; X. MUÑOZ-BERBEL; F.X. MUÑOZ.

**CONFIRMACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN AGUAS MEDIANTE PCR CONVENCIONAL. (PAG 226)**

G. MARTÍNEZ REINA; A.M. SÁNCHEZ CÁNOVAS; F. NAVARRO DE HARO; M.J. BARNÉS CAMPOS; M.D. VILELLA MARTÍNEZ; A. RUÍZ HERNÁNDEZ.

**ALTERNATIVE METHODS FOR MICROBIOLOGICAL CONTROL IN POULTRY SLAUGHTERHOUSES: COMPARATIVE STUDY (PAG 228)**

M.G.R. REITER; M.C. LÓPEZ; R. JORDANO; L.M. MEDINA.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CONSERVACIÓN Y RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS: SALMONELLA Y ENTEROCOCCUS. (PAG 230)**

A.M. SÁNCHEZ CÁNOVAS; G. MARTÍNEZ REINA; F. NAVARRO DE HARO; M.D. VILELLA MARTÍNEZ; M.J. BARNES CAMPS; A.M. VIVAS GIL; F. PACHECO MARTINEZ.

**VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ANALISIS MICROBIOLÓGICOS DE ALIMENTOS MEDIANTE LOS ENSAYOS INTERCOMPARATIVOS SEI ALIMENTOS. (PAG 232)**

J. SANCHIS.

**DETECCIÓN DE ESCHERICHIA COLI O157:H7 EN ALIMENTOS POR MÉTODOS CULTURALES, MÉTODOS INMUNOLÓGICOS Y PCR. (PAG 234)**

I. SOLÍS; A. ARNAU; R. AZNAR; P. ELIZAQUIVEL.

**ESTUDIO EVOLUTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA ENTERICA SEROTIPO [4,5,12:i:-] MEDIANTE DIVERSAS TÉCNICAS DE PCR. (PAG 236)**

J. GARAZAR; L. LAORDEN; L. KROMIDAS; J. BIKANDI; S. HERRERA; A. ECEHITA; A. REMENTERÍA

**DETECCIÓN DE SALMONELLA MEDIANTE DOS MÉTODOS DE PCR A TIEMPO REAL.**

I. SANTAOLALLA; F. PÉREZ; I. MARTÍNEZ-BALLESTEROS; F. LOPITZ; J. BIKANDI; A. REMENTERIA; J. GARAIZAR.

**(PAG 238)**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE ASPERGILLUS TUBINGENSIS PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A EN VINO.**

**(PAG 240)**

LÓPEZ-MENDOZA, MC.; MARTÍNEZ-NAVALÓN, B.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V.

## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* AISLADAS DE VEGETALES CONGELADOS

L. Ballesteros, G. Cuesta, Y. Moreno, I. Cañigral, M.A. Ferrús

### INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* está presente en muy diversos ambientes. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la producción, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección. (1). Siendo tolerante a condiciones ambientales hostiles, puede alcanzar y permanecer largos tiempos en una gran variedad de alimentos (pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, etc), incluyendo los congelados, así como en las superficies de los equipos.

La contaminación de los vegetales con *L. monocytogenes* se produce en el campo. El almacenamiento prolongado en frío de los vegetales y la ausencia del cocinado de los mismos origina su ingestión y la colonización del tracto gastrointestinal de las personas más susceptibles. El proceso de congelación industrial no elimina al microorganismo, y en numerosas ocasiones, los vegetales pueden contaminarse en la misma industria durante la producción. (2).

*Listeria monocytogenes* presenta una enorme variabilidad intraespecie. De los 14 serovares conocidos, sólo 3 (1/2a, 1/2b y 4b) producen el 95% de los casos. Esto ha llevado a numerosos investigadores a plantear la necesidad de disponer de métodos que permitan detectar específicamente la presencia de estas cepas más virulentas en los alimentos, y de poder realizar un seguimiento epidemiológico de las cepas involucradas en la aparición de brotes (3)

Recientes estudios sobre la virulencia de *Listeria monocytogenes* han sugerido, además, que cepas de *L. monocytogenes* virulentas pueden poseer genes que no están presentes en aislados avirulentos, lo que podría servir para una evaluación mediante PCR de la virulencia de este patógeno (4).

### OBJETIVO

Aunque en varias ocasiones el consumo de vegetales ha estado ligado a brotes de listeriosis, son pocos los estudios realizados para investigar la presencia de cepas especialmente virulentas esta bacteria en alimentos vegetales congelados (5). Por otra parte, la gravedad de la enfermedad hace muy interesante el disponer de métodos de detección más rápidos y eficaces.

El objetivo del presente estudio, por tanto, fue caracterizar cepas de *L. monocytogenes* procedentes de vegetales pre-cocinados y posteriormente pre-congelados mediante su perfil bioquímico, serotipo y presencia de genes de virulencia.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Durante un periodo de 3 meses se procesaron muestras procedentes de productos vegetales congelados. El aislamiento de *L. monocytogenes* se llevó a cabo mediante el protocolo estipulado por la norma ISO 11290-1:1996 (6). Las colonias sospechosas en medio PALCAM (color verde oscuro con halo negro por degradación de la esculina) se subcultivaron en Agar Sangre, y a las que presentaban hemólisis se les realizó tinción Gram y prueba de la catalasa.

Los perfiles bioquímicos se obtuvieron con el sistema API *Listeria*. Se realizó el serotipado de todas las cepas aisladas con el kit *Listeria* antisera set (Denka Seiken.Co, Ltd.)

La identificación bioquímica de las cepas de *L. monocytogenes* se confirmó mediante PCR múltiple, amplificando genes tanto de género como de especie. Para la PCR se emplearon cuatro cebadores: L1 (5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'), U1 (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'), LF (5'-CAAACGTTAACAACGCAGTA-3') y LR (5'-TCCAGAGTGATCGATGTTAA-3'). Los cebadores L1 y U1 amplifican una banda de 938 pb correspondiente a un fragmento del ADNr 16S del género *Listeria*, mientras que LF y LR amplifican una banda del gen *hlyA* de 750pb específica de *L. monocytogenes* (3).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 30µl con tampón de PCR 1X, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada dNTP, 20pmol de cada cebador, 2U de Taq y 3µl de ADN. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 95°C-1min, 40 ciclos de amplificación (94°C-30 s, 51°C-20 s, 74°C-30s) y 74°C-8min de extensión final.

La PCR para el gen de virulencia *lmo2821*, se realizó mediante el uso de los cebadores Lmo2821 (5'-TGTAACCCCGCTTACACAGTT-3') y Lmo2821 (5'-TTACGGCTGGATTGTCTGTG-3'), que amplifican una banda de 611pb. Las condiciones de esta reacción fueron: 25µl de volumen total (0,5U Taq DNA polimerasa, 50 µM dNTPs, 25 pmol de cada cebador y 10 ng DNA), 94°C-2 min, 25 ciclos (94°C-20 s,60°C-20 s y 72°C-45 s) y 72°C-2 min. (7)

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se analizaron 61 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de vegetales congelados. Se obtuvieron tres perfiles bioquímicos distintos, API6510 y API6550 (*L. monocytogenes*) y API6110 (*L. monocytogenes/inocua*). Esto parece indicar que existe más de un biotipo patógeno que puede hallarse en estos vegetales pre-cocinados.

La PCR para identificación de género y especie fue positiva para *L. monocytogenes* en 54 de las 61 cepas identificadas como tales por API Listeria, mientras que las 4 restantes dieron negativas, tanto para genero como para especie. Los 54 aislados que dieron positivos por PCR fueron serotipados, obteniéndose 53 aislados con el serotipo 1/2a y sólo uno de ellos con el serotipo 4b. El serotipo 1/2a es uno de los más comúnmente aislados en los casos de listeriosis en humanos por ingestión de alimentos. También el serotipo 4b está considerado especialmente patógeno.

Todas las cepas, excepto una, fueron positivas para la amplificación del gen *lmo2821*, lo que confirma su virulencia.

## **CONCLUSIONES**

El estudio de los diferentes perfiles bioquímicos y su posterior identificación mediante PCR y el conocimiento del serotipo de *Listeria monocytogenes* aislados de estos vegetales permiten constatar la problemática de la aparición de cepas virulentas de esta bacteria en productos vegetales congelados.

## **REFERENCIAS**

- (1) Rouquette, C. and Berche P. 1996. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. Microbiol. SEM 12: 245-258.
- (2) Wilks SA, et al., 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. Int J Food Microbiol. 11(2):93-8
- (3) Liu. D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. Med Microbiol 55: 645-659
- (4) International Journal of Food Microbiology 90 (2004) 341– 347. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA.
- (5) Torres, K. 2004. Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. MVZ-Cordoba 9:(2),414-427.
- (6) Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. (ISO 11290-1:1996).
- (7) Liu. D. 2003. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. Journal of Medical Microbiology 52: 1065 – 1070.

## ACTIVIDAD ANTI-LISTERIA DE BACTERIOCINAS EN SALMÓN AHUMADO

***Bravo D., Montiel R. y Medina M.***

Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. de La Coruña km 7, 28040 Madrid, [dbravo@inia.es](mailto:dbravo@inia.es)

### Introducción y Objetivos

El salmón ahumado es un alimento RTE (ready-to-eat) susceptible de contaminación con *Listeria monocytogenes*. En el proceso de ahumado se emplean temperaturas inferiores a 30° C, por lo que no se consigue su eliminación. *L. monocytogenes* puede multiplicarse durante el almacenamiento del salmón ahumado a temperatura de refrigeración y aumentar considerablemente en situaciones de abuso de temperatura. La biopreservación, basada en la utilización de bacterias lácticas o sus metabolitos para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables, es una de las estrategias propuestas frente al desarrollo de *L. monocytogenes* en salmón ahumado (Brillet *et al.* 2004). Algunas bacterias lácticas poseen capacidad de inhibir bacterias patógenas y alterantes de alimentos gracias a la producción de bacteriocinas, moléculas de naturaleza proteica, sintetizadas ribosómicamente y con actividad antimicrobiana. Suelen ser efectivas frente a un pequeño espectro de bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora y/o que compiten por un mismo nutriente (Deegan *et al.* 2006).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de distintas bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, aplicando los sobrenadantes o los cultivos productores, frente a *L. monocytogenes* en salmón ahumado.

### Material y Métodos

#### Microorganismos utilizados

Se ensayaron los siguientes cultivos bacteriocinogénicos procedentes de la Colección de Cultivos del Dpto. de Tecnología de Alimentos del INIA: *Lactococcus lactis* TAB 23 productor de lacticina 481, *L. lactis* TAB 26 de nisina Z, *L. lactis* TAB 75 de nisina A, *L. lactis* INIA 415 de nisina Z + lacticina 481, *Lactobacillus plantarum* TAB 84 de plantaricina no caracterizada, *Enterococcus faecium* TAB 7 de enterocina no caracterizada, *E. faecalis* TAB 52 de enterocina I, *E. faecalis* TAB 70 de enterocina AS-48, y *Pediococcus acidilactici* 347 (cedida por el Dr. J.M. Rodríguez de la Universidad Complutense de Madrid) de pediocina PA-1. Como indicadores se emplearon *L. lactis* HP, *Lb. buchneri* St2A, *Lb. plantarum* CECT 4645, *L. innocua* BL86/26, *L. monocytogenes* EGD, Ohio y Scott A y cinco cepas de *L. monocytogenes*, P2, P3, P4, P5 y P9, aisladas de la industria. Las bacterias lácticas se cultivaron en caldo MRS incubado 18 h a 30 ó 37°C. Los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación a 10000 g durante 15 min a 4°C se neutralizaron a pH 6.5 con NaOH 1 N, se filtraron y se congelaron a -30°C hasta su uso.

#### Determinación de la actividad bacteriocina en placa

Se realizó un test de difusión en pocillo frente a los microorganismos indicadores señalados. Se prepararon placas de MRSA o TSYEA con doble capa de agar, la segunda con un 0.75% de agar inoculado con el indicador al 0.1%. Se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro y se depositaron 25 µL del sobrenadante neutralizado. Las placas se incubaron a 30 ó 37°C durante 24 h.

#### Actividad anti-Listeria de los sobrenadantes y los cultivos bacteriocinogénicos en salmón ahumado

Se prepararon muestras de 20 g de salmón ahumado y se contaminaron con 100 µL de un cultivo de 18 h de *L. monocytogenes* P3. Las muestras se mantuvieron 24 h a 4 °C para facilitar la adhesión del patógeno al producto. Se añadieron 200 µL de los sobrenadantes o los cultivos bacteriocinogénicos que se distribuyeron por la superficie del salmón. Las muestras se envasaron a vacío y se mantuvieron 24 h a temperatura ambiente (22°C). Se analizaron en muestras duplicadas los niveles de *Listeria* a las 0 h y 24 h en agar PALCAM tras su incubación durante 48 h a 37°C. El ensayo se realizó por triplicado.

### Resultados y Discusión

Todos los sobrenadantes mostraron actividad inhibitoria frente a las tres bacterias lácticas utilizadas como indicadores. Los mayores halos se detectaron con las nisinas A y Z y frente a *Lb. buchneri* St2A, que también resultó más sensible a las enterocinas ensayadas. Sin embargo, las 9 cepas de *Listeria* investigadas resultaron mucho más resistentes a la mayoría de las bacteriocinas evaluadas. La pediocina fue la bacteriocina más activa, inhibió a *L. innocua* y a las 8 cepas de *L. monocytogenes* ensayadas y dio lugar a halos de inhibición de 14 a 18 mm de diámetro. La

enterocina AS-48 también inhibió a todas las cepas de *Listeria*, con halos entre 7 y 12 mm, seguida de la enterocina I y la enterocina 7 que inhibieron a 6 de las 9 cepas, con halos entre 8 y 13 mm. Los sobrenadantes de las cepas productoras de nisina no mostraron actividad anti-*Listeria*.

En salmón ahumado control sin bacteriocina los niveles de *L. monocytogenes* P3 aumentaron aproximadamente una unidad logarítmica en 24 h a temperatura ambiente. La adición de sobrenadantes de los cultivos bacteriocinogénicos inhibió significativamente ( $P<0.05$ ) el desarrollo del patógeno (Tabla 1). Las bacteriocinas más activas, enterocina AS-48 y la combinación de nisina Z y lacticina 481 presentes en los sobrenadantes de *E. faecalis* TAB 70 y de *L. lactis* INIA 415, respectivamente, mostraron actividad bacteriostática durante las 24 h del ensayo. La bacteriocina PA-1, que había inhibido en placa a todas las cepas de *Listeria* estudiadas, no mostró ningún efecto sobre *L. monocytogenes* P3 en salmón ahumado.

Cuando se inocularon los cultivos bacteriocinogénicos en el salmón ahumado, también se registró un efecto significativo ( $P<0.05$ ) en la inhibición de *L. monocytogenes* (Tabla 1). Mediante la inoculación de *E. faecalis* TAB 70 productor de enterocina AS-48 y *P. acidilactici* 347 productor de pediocina PA-1, se consiguieron los mejores resultados, con recuentos del patógeno 1.8 y 1.4 unidades logarítmicas inferiores a los detectados en salmón ahumado control, respectivamente.

Se comprobó actividad bacteriocina en algunas muestras situando pequeñas porciones de salmón ahumado con sobrenadante o cultivo productor sobre una placa de agar inoculada con un indicador.

**Tabla 1.** Niveles de *L. monocytogenes* (log cfu/g) en salmón ahumado en presencia de sobrenadantes y de cultivos bacteriocinogénicos tras 24 a temperatura ambiente (22°C)

Bacteria láctica	Bacteriocina	<i>L. monocytogenes</i> con sobrenadante	<i>L. monocytogenes</i> con cultivo
Control	-	7.8 <sup>d</sup>	8.3 <sup>b</sup>
<i>L. lactis</i> TAB 23	Lacticina 481	7.3 <sup>c</sup>	8.3 <sup>b</sup>
<i>L. lactis</i> TAB 26	Nisina Z	7.7 <sup>d</sup>	7.8 <sup>b</sup>
<i>L. lactis</i> TAB 75	Nisina A	7.3 <sup>c</sup>	NE
<i>L. lactis</i> INIA 415	Nisina Z+lacticina 481	6.9 <sup>a</sup>	NE
<i>Lb. plantarum</i> TAB 84	Plantaricina	7.3 <sup>c</sup>	NE
<i>E. faecium</i> TAB 7	Enterocina	7.3 <sup>c</sup>	NE
<i>E. faecalis</i> TAB 52	Enterocina I	7.1 <sup>b</sup>	8.3 <sup>b</sup>
<i>E. faecalis</i> TAB 70	Enterocina AS-48	6.8 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>
<i>P. acidilactici</i> 347	Pediocina PA-1	7.8 <sup>d</sup>	6.9 <sup>a</sup>

El recuento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado control a las 0 h fue de 6.9 log cfu/g (con sobrenadantes) y 6.8 log cfu/g (con cultivos)

NE: no ensayado

<sup>a,b,c,d</sup>: medias con distinto superíndice difieren significativamente

El empleo de cepas productoras de bacteriocinas o de bacteriocinas para controlar el desarrollo de *L. monocytogenes* en salmón ahumado ha sido investigado en un número reducido de trabajos, con diferentes grados de eficacia. La adición de nisina a salmón ahumado inoculado con *L. monocytogenes* y refrigerado a 5°C retrasó el crecimiento del patógeno (Nilsson *et al.* 1997). También se consiguió prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado con cepas de *Carnobacterium* y las bacteriocinas asociadas, piscicocinas y divercina, a temperaturas de refrigeración (Duffes *et al.*, 1999; Katla *et al.*, 2001).

## Conclusiones

Mediante la adición de sobrenadantes de cultivos bacteriocinogénicos o de los cultivos productores se ha conseguido inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* inoculada en salmón ahumado. Asimismo, se ha detectado actividad bacteriocina en el producto. Estos resultados necesitan confirmarse a temperaturas de refrigeración con el fin de desarrollar sistemas de protección frente al crecimiento del patógeno en alimentos RTE.

## Referencias Bibliográficas

- Brillet *et al.*, (2004). J. Appl. Microbiol. 97: 1029-1037.  
 Deegan *et al.*, (2006). Int. Dairy J. 16: 1058-1071.  
 Duffes *et al.*, (1999). J. Food Prot. 62: 1394-1403.  
 Katla *et al.* (2001). Food Microbiol. 18: 431-439.  
 Nilsson *et al.*, (1997). Int. J. Food Microbiol. 38: 217-227.

## HIGIENIZACIÓN DE LONCHAS DE EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS ENVASADAS A VACÍO MEDIANTE ELECTRONES ACELERADOS

Cabeza, M.C.<sup>1</sup>, de la Hoz, L.<sup>1</sup>, Cambero, I.<sup>1</sup> y Ordóñez, J. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. 28040. Madrid, [ccabezab@vet.ucm.es](mailto:ccabezab@vet.ucm.es)

### Introducción y Objetivos

*Listeria monocytogenes* es una bacteria ubicua en la industria alimentaria; se acantona en sitios recónditos de los equipos (válvulas, recodos, juntas, etc) formando biofilms donde puede prevalecer durante tiempos muy largos, pudiendo ocasionalmente llegar a los alimentos en ciertas operaciones del proceso de elaboración. El presente trabajo describe un estudio destinado a optimizar el tratamiento de lonchas de embutidos (salchichón y chorizo) listas para su consumo (RTE) con electrones acelerados (radiaciones beta) para destruir *Listeria spp.* hasta niveles seguros para el consumidor, es decir, cumplir el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) según los criterios de la UE y USDA. En este estudio se ha utilizado *L. innocua* como modelo dado que en investigaciones previas utilizando diversas matrices, entre ellas jamón curado, se ha comprobado consistentemente que es más radiorresistente que *L. monocytogenes*.

### Material y Métodos

La bacteria se inoculó en la superficie de lonchas de salchichón (pH = 4,9;  $a_w$  = 0,880) y chorizo (pH = 4,7;  $a_w$  = 0,801). Estas se envasaron a vacío y se irradiaron en el acelerador de electrones de la empresa ION-MED (Tarancón) que opera a 10 MeV. Las dosis absorbidas por las muestras (entre 1 y 4 kGy) se determinaron midiendo la absorbancia de dosímetros de triacetato de celulosa irradiados simultáneamente con los productos cárnicos (Cabeza y col., 2007).

### Resultados y Discusión

Las gráficas de supervivencia rindieron rectas con  $R^2 > 0,98$ . El valor D (radiación absorbida que ocasiona una reducción decimal) de *L. innocua* fue de 0,47 kGy en salchichón y 0,53 kGy en chorizo (Figura 1).

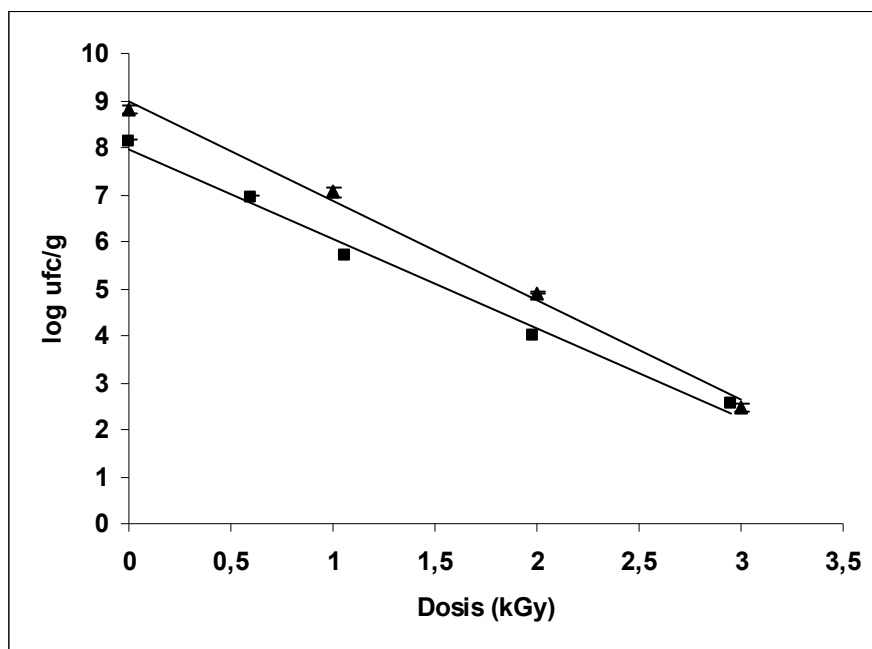


Figura 1. Curvas de radiorresistencia de *L. innocua* en salchichón (▲) y chorizo (■).

El USDA (Zhu y col., 2005) establece un criterio microbiológico para *L. monocytogenes* en productos cárnicos de ausencia en 25 g ( $\log 0,04 = -1,39$ ) pero la SCVPH (2005) de la EC es más tolerante y fija el valor de  $10^2$  ufc/g, aunque se ajusta al criterio del USDA (tolerancia cero) para alimentos infantiles y de uso médico. El Comité Científico de la AESA (2005), haciendo suya la opinión de la ICMSF, estimó que si potencialmente se contaminaran los productos cárnicos durante su transformación en RTE (loncheado y envasado), el número de células que llegaría al producto sería, en el peor de los casos, de 10 ufc/g. *L. monocytogenes*, aunque es una bacteria psicrotrofa no puede crecer en los embutidos madurados porque su  $a_w$  es  $< 0,90$ . Por ende, no es necesario ningún tratamiento tecnológico para estos productos destinados al mercado de la UE, ya que cumple el FSO ( $< 100$  ufc/g) pero hay que reducir la tasa de listerias hasta 0,04 en el caso de la USDA y para alimentos infantiles y de uso médico en la UE, es decir, el tratamiento por radiaciones beta ha de disminuir la carga en 2,39 D, lo que se conseguiría con dosis de 1,1 kGy, tomando como modelo la radiorresistencia de *L. innocua*.

Este tratamiento no afectó a las propiedades sensoriales de los embutidos, ya que hasta dosis de 2 kGy no se observaron, ni en el salchichón ni en el chorizo, cambios en el olor, sabor y apariencia. A dosis superiores (3 y 4 kGy), el olor fue el atributo más afectado, detectándose matices extraños descritos como "a quemado" y "a rancio".

### **Conclusiones**

La aplicación de radiaciones beta es una estrategia eficaz para higienizar embutidos crudos curados RTE.

El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2007-65235-CO2-02 y CARNISENUSA (CSD2007-00016), incluido en el CONSOLIDER-INGENIO 2010.

### **Referencias bibliográficas**

AESA. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. 2005. Aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. *Revista del Comité Científico de la AESA*, 2, 11-29.

CABEZA, M.C., CAMBERO, I., DE LA HOZ, L. y ORDÓÑEZ, J.A. 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 299-305.

SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 48, (L338), 1-26".

ZHU, M., DU, M., CORDRAY, J. y AHN, D.U. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 34-42.

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA HARINA DE PESCADO

**Calvo M.A.<sup>1</sup>, Adelantado C.<sup>1</sup>, Rodríguez M.<sup>1</sup>, Arosemena L.<sup>1</sup>, Pérez L.<sup>1</sup>, y Centeno, S.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Sanidad y de Anatomía Animales, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus Universitari de Bellaterra, 08193 Bellaterra, Barcelona. MariAngels.Calvo@uab.cat

<sup>2</sup>Dpto. de Tecnología de Alimentos, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Núcleo Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Boca del Río, Venezuela.

### - Introducción y Objetivos

La harina de pescado es un suplemento alimentario con un alto contenido en proteínas y destinado a alimentación animal. Es un producto deshidratado y desgrasado obtenido por cocción, prensado, secado y molienda de pescado o bien por partes de diferentes especies de pescado. Puede presentarse molida, en de polvo o comprimida en forma de *pellets*, y su calidad depende, entre otros factores, de la especie de pescado, el porcentaje de proteína, y el proceso tecnológico utilizado para su elaboración.

Por su origen, la harina de pescado, puede presentar una microbiota específica, así como, un contenido en *Salmonella*, hongos filamentosos y *Clostridium perfringens*. La legislación actual exige el cumplimiento de los siguientes límites microbiológicos: Ausencia de *Salmonella* spp. en 25g; ausencia de *Clostridium perfringens* en 1g; recuentos iguales o inferiores a 300 UFC de *Enterobacteriaceae* en 1g.

El objetivo de esta comunicación es evaluar la calidad microbiológica de muestras de harina de pescado de diferentes categorías obtenidas en fábricas de elaboración de piensos destinados a acuicultura.

### - Material y Métodos

Se han analizado un total de cuarenta y siete muestras, distribuidas según la calidad de la harina de pescado: Harina de pescado LT en cuyo proceso de desecado se realiza a temperaturas inferiores a 90°C y tiene una digestibilidad del orden de 92-94%, Harina estándar, que se obtiene por desecación a 90°C aproximadamente y que posee una digestibilidad del orden de 89-90%, Harina 70 (70% de proteína), Harina 65 (65% de proteína) y Harina 58 (58% de proteína).

El número de muestras analizadas se indican en la Tabla 1.

Tabla 1.- Muestras analizadas

Tipo de Harina de pescado	Muestras analizadas	Porcentaje del total de muestras
Harina de Pescado LT	9	19,15
Harina de Pescado Estándar	25	53,19
Harina de Pescado 70	4	8,51
Harina de Pescado 65	6	12,76
Harina de Pescado 58	3	6,39

A partir de las muestras se realizó el análisis microbiológico indicado en la legislación vigente en Europa, ampliado con otros parámetros de rutina en microbiología de los alimentos, con el fin de establecer aquellos que faciliten la detección de la calidad microbiológica del producto en estudio. Los parámetros evaluados han sido: Recuento de *Enterobacteriaceae* totales, recuento de coliformes totales, detección de *Escherichia coli*, detección de *Staphylococcus aureus*, detección de *Salmonella* spp., recuento de *Clostridium perfringens*, recuento e identificación de hongos miceliares y levaduras.

Los métodos aplicados para el análisis microbiológico son los especificados en las normativas correspondientes (Pascual, 2000).

### - Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se observan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2.- Promedio de log UFC/g de las muestras analizadas para los parámetros *Enterobacteriaceae* totales, coliformes totales, *Cl. perfringens*, hongos miceliares y levaduras.

Muestra	<i>Enterobacteriaceae</i> totales	Coliformes totales	<i>Clostridium perfringens</i>	Hongos miceliares	Levaduras
HP LT	<1	<1	1,556	<1	2,346
HP St	2,903	<1	1,394	<1	<1
HP 70	<1	<1	1,699	<1	<1
HP 65	<1	<1	1,893	<1	<1
HP 58	<1	<1	1,602	<1	<1

Tabla 3.- Porcentaje de muestras positivas a los parámetros *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* spp.

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.
HP LT	0	0	0
HP St	0	0	8
HP 70	0	0	0
HP 65	0	0	0
HP 57	0	0	0

### - Conclusiones

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la mayoría de las muestras de Harina de pescado estándar, no cumplen las exigencias que marca la legislación europea dado que se superan los límites establecidos para los tres parámetros microbiológicos de obligado control.

Por lo que respecta a las restantes categorías evaluadas, no se observan diferencias significativas entre los diferentes parámetros microbiológicos analizados. Cabe destacar asimismo que el parámetro para el que se observa recuentos con mayor frecuencia, es *Clostridium perfringens*. Este hecho es debido básicamente a que los procesos tecnológicos utilizados para la obtención de los diferentes tipos de harina destruyen la mayor parte de la microbiota pero permiten la persistencia de géneros esporulados, que poseen una mayor resistencia a altas temperaturas y a actividades de agua bajas. La mayoría de las muestras analizadas, no cumplen con la exigencia de la normativa que indica ausencia de *C. perfringens* por gramo de muestra.

A tenor de los resultados obtenidos, se puede proponer que la analítica microbiológica de muestras de harina de pescado, se centre fundamentalmente en el recuento de microorganismos esporulados (*C. perfringens*) así como detección de *Salmonella*, que puede contaminar al sustrato durante la etapa de almacenamiento y distribución del producto.

### - Referencias Bibliográficas

Pascual M.R. y Calderón V. (2000). Microbiología alimentaria. Editorial Díaz de Santos S.A., España. 441pp.

Directiva 90/667/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, por la que se establecen las normas veterinarias relativas a la eliminación y transformación de desperdicios animales, a su puesta en el mercado y a la protección de los agentes patógenos en los piensos de origen animal o a base de pescado, y por la que se modifica la Directiva 90/425/CEE

## EFFECTO DEL PH Y EL TIPO ACIDIFICANTE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *BACILLUS CEREUS* TRAS UN TRATAMIENTO TÉRMICO MODERADO

*Martínez S., Franco I. y Carballo J.*

Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. Campus de Ourense, 32004 Ourense, carbatec@uvigo.es

### Introducción y Objetivos

En las últimas décadas ha aumentado la demanda de alimentos mínimamente procesados, de apariencia natural, con valor nutritivo semejante al de los productos no procesados y/o conservados, sin aditivos químicos, microbiológicamente seguros y de elevada calidad. La seguridad de estos productos depende tanto de factores simultáneos al tratamiento térmico como de factores posteriores al mismo. Las condiciones post-tratamiento determinan, en gran medida, la capacidad de crecimiento y de recuperación de los microorganismos que todavía permanecen viables.

Se ha demostrado que existe un efecto sinérgico entre la acidificación y la refrigeración sobre el crecimiento de algunos microorganismos, entre ellos *B. cereus* (Valero y col., 2000) y, en la práctica, se han recomendado distintas temperaturas de almacenamiento en función del pH de los alimentos. Sin embargo, existen pocos datos sobre la influencia de la acidificación sobre la cinética de crecimiento microbiano tras el procesado térmico.

El objetivo de este trabajo fue comprobar el efecto que ejerce el pH y el tipo de acidificante sobre la cinética de crecimiento de *B. cereus* tras un tratamiento térmico moderado.

### Material y Métodos

Una suspensión de esporos de *B. cereus* ATCC 7004 fue sometida a un tratamiento térmico (90 °C-10 minutos) en caldo nutritivo. Tras este tratamiento, se sembraron alícuotas de 1 mL en caldo nutritivo ajustado a diferentes valores de pH, incubando posteriormente a 35°C el tiempo necesario para alcanzar el comienzo de la fase de autoesterilización. El pH se ajustó utilizando diferentes ácidos: cítrico, ascórbico, láctico y clorhídrico 1 N, de tal forma que tras la esterilización del medio se alcanzaron valores de 7,0; 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5 y 4,2. A intervalos predeterminados de tiempo se extrajeron las correspondientes alícuotas para realizar los recuentos, llevando a cabo diluciones en agua de peptona al 0,1% y sembrando, por duplicado, placas de agar nutritivo por homogeneización en masa, incubando posteriormente a 35°C durante 24 horas. El número de ufc/mL se estimó a partir de los valores medios de los recuentos obtenidos en dos placas correspondientes a cada dilución de dos diluciones decimales consecutivas.

### Resultados y Discusión

En todos los casos, los parámetros cinéticos de crecimiento se vieron afectados por el pH del medio de cultivo. Por otra parte, a un mismo valor de pH el crecimiento resultó diferente en función del tipo de agente acidificante utilizado.

El ácido láctico fue el agente acidificante más efectivo, no siendo posible el crecimiento de *B. cereus* a valores de pH inferiores a 5,5 al utilizar este ácido. Sin embargo, la utilización de ácido clorhídrico y ácido cítrico permitió el crecimiento de este microorganismo a valores de pH 4,2; 4,5 y 5,0.

La duración de la fase de latencia, a pH 4,2 y 4,5, se vio claramente incrementada, cuando el crecimiento tuvo lugar, reflejando de alguna manera el prolongado tiempo de adaptación de las células a estos pHs extremos. Por otra parte, a pH 4,2 la fase de latencia resultó superior al utilizar ácido clorhídrico que al utilizar ácido cítrico. De la misma manera, el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria en estas condiciones límites de crecimiento, fue superior al acidificar el medio con ácido clorhídrico.

Cuando el crecimiento tuvo lugar, la velocidad de crecimiento fue mínima a valores de pH de 4,2 y 4,5 y, consecuentemente, también aumentó el tiempo de generación en estas condiciones.

La máxima velocidad de crecimiento se observó en el medio sin acidificar y en el caldo nutritivo acidificado con ácido clorhídrico y láctico en el rango de pH de 6,0 a 7,4.

El tiempo de comienzo de la fase estacionaria fue similar a valores iniciales de pH superiores a 5,5 (23,04±2,76 horas), excepto cuando el agente acidificante fue el ácido cítrico, detectándose en este caso valores superiores (37,5±3,6 horas).

Con el fin de comprobar si el efecto de la acidificación podría estar relacionado con las modificaciones que experimenta el pH a lo largo del cultivo provocadas por el crecimiento de *B. cereus* o bien por los valores finales de pH que se alcanzan en el medio, se realizaron lecturas del pH a lo largo de todo el cultivo.

El cultivo de *B. cereus* en caldo nutritivo acidificado con ácido láctico a valores iniciales de pH de 5,0; 4,5 y 4,2 no modificó el pH del medio, coincidiendo con la ausencia de crecimiento. El mantenimiento de estos valores de pH extremos podría ser responsable del mayor efecto inhibitorio del ácido láctico, ya que parece existir una correlación entre la capacidad de *B. cereus* para modificar el pH del medio en determinadas condiciones y su crecimiento.

En todos los casos, en el rango de pHs entre 5,0 y 7,0, tuvo lugar un descenso progresivo del pH durante las primeras horas de cultivo. Este descenso fue más marcado a los valores de pH más altos, existiendo también diferencias en función del tipo de acidificante empleado. Así, a valores iniciales de pH de 7,0 se produjo un descenso de un 19% en el caso del ácido ascórbico y del ácido cítrico y de un 14% en el caso del ácido clorhídrico y láctico. Tras este descenso del pH, en el rango de valores entre 5,5 y 7,0 tuvo lugar un aumento del mismo, alcanzándose, independientemente del valor inicial, un pH similar (cerca de 7,2), que se mantuvo posteriormente más o menos estable a lo largo del cultivo. Este efecto, fue observado también por Mazas (1996) para esta misma cepa de *B. cereus* en agar nutritivo acidificado a distintos valores de pH (5,5; 6,2; 6,8 y 7,5).

La capacidad de *B. cereus* para aumentar el pH de un medio acidificado (pH 5,0) hasta un valor óptimo para su crecimiento y la producción de toxinas ya había sido señalado con anterioridad (García Arribas y Kramer, 1990). Este hecho podría explicar que a partir de un determinado valor de pH, el crecimiento de *B. cereus* no se vea sustancialmente afectado, independientemente del tipo de agente acidificante utilizado y del valor de pH inicial.

## **Conclusiones**

*Bacillus cereus* ATCC 7004 es capaz de sobrevivir a un tratamiento térmico de 90 °C durante 10 minutos y de recuperarse en diferentes condiciones post-tratamiento, pudiendo, por tanto, constituir un riesgo potencial en alimentos mínimamente procesados.

La acción inhibitoria de la acidificación dependió del agente acidificante empleado, resultando más efectivo el ácido láctico.

La eficacia de cada uno de los agentes acidificantes empleados estuvo condicionada por la capacidad de *B. cereus* para aumentar el pH del medio acidificado hasta un valor óptimo para su crecimiento, desapareciendo las diferencias entre los parámetros cinéticos de crecimiento cuando el factor que se tiene en cuenta es el pH final del medio.

## **Referencias Bibliográficas**

García-Arribas, M.L. y Kramer, J.M. (1990). The effect of glucose, starch and pH on growth, enterotoxin and haemolysin production by strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 21-34.

Mazas, M. (1996). Estudio de la influencia de diversos factores ambientales sobre la termorresistencia de *Bacillus cereus*. Tesis doctoral. Universidad de León.

Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Martínez, A. y Salmerón, M.C. (2000). Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30 °C. *Food Microbiol.* 17, 605-612.

## ESTUDIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE ELABORACIÓN DE QUESOS ARTESANALES DE GRAN CANARIA QUE INFLUYEN EN SU CONTAMINACIÓN BIOTICA

Carrascosa C.<sup>1</sup>, Sanjuán E.<sup>1</sup>, Saavedra P.<sup>2</sup>, Pérez E.<sup>1</sup> y Millán R.<sup>1</sup>

<sup>2</sup>Dpto. de Matemáticas; <sup>1</sup>Dpto. de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Trasmontaña S/N. Arucas. 35413. Las Palmas; ccarrascosa@dpat.ulpgc.es

### Introducción y Objetivo

En la isla de Gran Canaria (GC) existen unas 174 queserías de carácter artesanal que elaboran un tipo de queso semicurado, principalmente a base de leche de cabra. Este queso se comercializa en mercados locales e insulares. Los sistemas de autocontrol aplicados a lo largo de la cadena de elaboración de estos quesos, han evolucionado hacia un seguimiento de los puntos críticos, por lo que se han incluido para su total eficacia, los controles microbiológicos de la leche (materia prima) y del queso, como verificación de este sistema de vigilancia.

Existen diversos estudios sobre los peligros microbiológicos y químicos del queso, pero pocos sobre los factores relacionados con las fuentes de contaminación durante el proceso de elaboración. En este estudio se pretende identificar cuáles son los factores asociados al proceso de elaboración del queso que influyen en la contaminación biótica de muestras de leche cruda y quesos procedentes de queserías artesanales de GC.

### Material y Métodos

Se tomaron 258 muestras de leche cruda y 258 de quesos, procedentes de 20 queserías artesanales de GC con una producción continua a lo largo del año y en posesión de Registro Sanitario. Para los análisis microbiológicos, las muestras de leche (500 ml) fueron tomadas directamente del tanque de frío o de la cántara (si no se disponía de tanque de frío), y las de queso (400 g), directamente de las zonas de maduración. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C y procesadas dentro de las 24 h. siguientes a su recogida.

Los criterios microbiológicos aplicados fueron los citados en el Reglamento (CE) nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, y el Reglamento (CE) nº 853/2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, y en el que se fijan los criterios microbiológicos para la leche cruda.

Las determinaciones microbiológicas llevadas a cabo fueron: *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* (sistema VIDAS); *Escherichia coli*, siembra en VB (NMP) a 44°C; *Staphylococcus aureus*, siembra en BP a 37°C, y gérmenes aerobios mesófilos, en PCA a 30°C, (Pascual, 1992).

Se realizó una encuesta de producción en cada quesería, supervisándose el proceso de elaboración y obteniéndose datos sobre: ubicación, leche empleada y tratamiento, grado de manipulación y maduración del queso y ejecución de operaciones de limpieza y desinfección (LD) en las queserías. También se realizó un test sobre conocimientos de higiene a los queseros, y una encuesta de evaluación higiénico sanitaria de las queserías, HAS (Higiene Assessment System), para evaluar los requisitos exigidos por el sistema de autocontrol (puntuación máxima de 100 y mínima de 45, exigida para asegurar unas condiciones higiénicas mínimas para un correcto funcionamiento).

Para el análisis estadístico, los resultados microbiológicos de las muestras analizadas se clasificaron según si cumplían o no (negativo o positivo), los criterios de la legislación vigente. Todas las variables del estudio fueron categóricas. En cada grupo considerado, éstas se resumieron como frecuencias y porcentajes, los cuales se compararon mediante el test de la ji-cuadrado o test exacto de Fisher.

### Resultados y Discusión

Los resultados de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* no se consideraron para el análisis de los datos, al no resultar representativos (positivos en sólo una muestra de queso y una de leche, respectivamente).

En la Tabla se muestran las frecuencias (y porcentajes) de las muestras de leche y queso analizados con resultados negativos (cumplen los requisitos legales) y positivos (no cumplen), considerando

**XVI CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. CÓRDOBA2008**

	<i>Escherichia coli</i>		P	Aerobios		P	<i>Staphylococcus aureus</i>		P
	Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
n (%)	N = 501	N = 15		N = 77	N = 52		N = 496	N = 20	
<b>Ubicación</b>									
Costa	208 (41.5)	5 (33.3)		27 (35.1)	17 (32.7)		208 (41.9)	5 (25.0)	
Medianías	192 (38.3)	5 (33.3)		26 (33.8)	21 (40.4)		186 (37.5)	11 (55.0)	
Cumbre	46 (9.2)	0		15 (19.5)	4 (7.7)		44 (8.9)	2 (10.0)	
Moya	55 (11.0)	5 (33.3)	<b>0.047</b>	9 (11.7)	10 (19.2)	0.208	58 (11.7)	2 (10.0)	0.399
<b>Producción (Kg)</b>									
< 10	42 (8.4)	0		7 (9.1)	9 (17.3)		40 (8.1)	2 (10.0)	
10 – 50	215 (42.9)	7 (46.6)		29 (37.7)	24 (46.2)		214 (43.1)	8 (40.0)	
> 50	244 (48.7)	8 (53.3)	0.504	41 (53.2)	19 (36.5)	0.129	242 (48.8)	10 (50.0)	0.933
<b>Maduración</b>									
Fresco	113 (22.6)	1 (6.7)		18 (23.4)	10 (19.2)		110 (22.2)	4 (20.0)	
Tierno	32 (6.4)	0		4 (5.2)	3 (5.8)		30 (6.0)	2 (10.0)	
Semicurado	356 (71.1)	14 (93.3)	0.163	55 (71.4)	39 (75.0)	0.853	356 (71.8)	14 (70.0)	0.766
<b>Manipulación</b>									
Alta	123 (24.6)	9		20 (26.0)	15 (28.8)		118 (23.8)	5 (25.0)	
Media	288 (57.5)	15 (100)		51 (66.2)	25 (48.1)		289 (58.3)	14 (70.0)	
Mínima	90 (18.0)	0	<b>0.004</b>	6 (7.8)	12 (23.1)	<b>0.030</b>	89 (17.9)	1 (5.0)	0.315
<b>Producto</b>									
Leche	254 (50.7)	0		77 (100)	52 (98.1)		246 (49.6)	8 (40.0)	
Queso	247 (49.3)	15 (100)	<b>&lt; 0.001</b>	0	0		250 (50.4)	12 (60.0)	0.400
<b>Tratamiento lech</b>									
Cruda	454 (90.6)	14 (93.3)		73 (94.8)	50 (96.2)		449 (90.5)	19 (95.0)	
Pasteurizada	47 (9.4)	1 (6.7)	0.721	4 (5.2)	2 (3.8)	0.721	47 (9.5)	1 (5.0)	0.499
<b>Leche de oveja</b>	396 (79.0)	10 (66.7)	0.249	67 (87.0)	44 (84.6)	0.700	391 (78.8)	15 (75.0)	0.682
<b>Leche de vaca</b>	107 (21.4)	9 (60.0)	<b>&lt; 0.001</b>	12 (15.6)	16 (30.8)	<b>0.040</b>	111 (22.4)	5 (25.0)	0.783
<b>Conocimientos quesero: fallos</b>									
> 10	99 (19.8)	1 (6.7)		12 (15.6)	9 (17.3)		93 (18.8)	7 (35.0)	
7 – 10	148 (29.5)	9 (60.0)		25 (32.5)	15 (28.8)		151 (30.4)	6 (30.0)	
4 - 6	159 (31.7)	5 (33.3)		22 (28.6)	17 (32.7)		157 (31.3)	7 (35.0)	
0 - 3	95 (19.0)	0	<b>0.035</b>	18 (23.4)	11 (21.2)	0.934	95 (19.2)	0	0.089
<b>LD: (&gt; 2 fallos)</b>	197 (39.3)	5 (33.3)	0.640	25 (32.5)	19 (36.5)	0.632	191 (38.5)	11 (55.0)	0.138
<b>Puntuación quesería (HAS)</b>									
< 45	42 (8.4)	0		7 (9.1)	9 (17.3)		40 (8.1)	2 (10.0)	
45 – 65	385 (76.8)	10 (66.7)		63 (81.8)	38 (73.1)		380 (76.6)	15 (75.9)	
65 - 85	74 (14.8)	5 (33.3)	0.094	7 (9.1)	5 (9.6)	0.368	76 (15.3)	3 (15.0)	0.953

los diferentes factores estudiados como posibles influyentes en la calidad microbiológica de las muestras. Los números en negrita marcan los p-valores con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados muestran que la contaminación por *E. coli* está claramente ligada al empleo de leche de vaca, al grado de manipulación (media) del queso, y a los bajos conocimientos higiénicos del quesero, no actuando la leche (de cabra o mezcla) usada como materia prima como fuente de contaminación. De igual modo, la contaminación por gérmenes aerobios mesófilos, se relacionó con el empleo de leche de vaca y el grado de manipulación del queso.

**Conclusión:** A la vista de los resultados, podemos concluir que una correcta formación del quesero en cuanto a las buenas prácticas de elaboración y operaciones higiénicas, parece ser fundamental para la reducción de la presencia de los microorganismos indicadores.

**Referencias Bibliográficas**

Temelli, S. (2006). Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. Food Control, 17; 856-861.  
 Mauropoulos, A. (1999). Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. Food Control, 10; 213-219.

## ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE DETERMINADOS PRODUCTOS A BASE DE VEGETALES Y FRUTAS

De Pablo B.<sup>1</sup>, Bravo M<sup>a</sup>V.<sup>2</sup>, Coll D.<sup>3</sup>, García I.<sup>1</sup>, Oria C.<sup>4</sup> y Zigorruga C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Subdirección de Salud Pública y Laboratorio Normativo de Salud Pública Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, C/ M<sup>a</sup> Díaz de Haro, 58. 48010 Bilbao, [unvet3bi-san@ej-gv.es](mailto:unvet3bi-san@ej-gv.es), [labmicrobi-san@ej-gv.es](mailto:labmicrobi-san@ej-gv.es)

<sup>2</sup>Subdirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Santiago, 1. 01002 Vitoria-Gasteiz, [vbravo-san@ej-gv.es](mailto:vbravo-san@ej-gv.es)

<sup>3</sup>Dirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Donostia-San Sebastián, 1. 01010 Vitoria-Gasteiz, [dcoll@ej-gv.es](mailto:dcoll@ej-gv.es)

<sup>4</sup>Subdirección de Salud Pública, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Navarra, 4. 20013 Donostia-San Sebastián, [calimen3-san@ej-gv.es](mailto:calimen3-san@ej-gv.es), [labora1-san@ej-gv.es](mailto:labora1-san@ej-gv.es)

### - Introducción y Objetivos

Los productos vegetales crudos, lavados, troceados, envasados y listos para su consumo tipo Cuarta "Gama", aún siendo minoritarios, han experimentado una notable expansión y son cada vez más consumidos. Estos productos, consumidos habitualmente a modo de ensaladas pueden constituir un riesgo para la salud del consumidor si son incorrectamente manipulados dado que su elevada actividad de agua, pH, el no estar sometidos a tratamiento térmico para destruir o inactivar posibles gérmenes presentes y su mayor vida útil frente a los vegetales crudos sin lavar, trocear y envasar, facilitan el crecimiento de microorganismos patógenos.

Existen otro tipo de productos a base de hortalizas, como el gazpacho, considerados microbiológicamente más seguros que los anteriores, por el efecto combinado de su pH ácido y el tratamiento de pasterización al que es sometido, pero que sin embargo, temperaturas de conservación inadecuadas puede afectar a su calidad microbiana.

Diversos estudios epidemiológicos y científicos han evidenciado que cualquier zumo de frutas y vegetales puede estar contaminado y presentar riesgos microbiológicos, sobre todo aquellos que no han sido sometidos a ningún tratamiento térmico. La mayoría de los brotes registrados se han vinculado a patógenos tales como *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7.

Por los motivos anteriormente expuestos, la Recomendación de la Comisión de las Comunidades Europeas de 1 de marzo de 2005, relativa a un programa de control oficial de los productos alimenticios para el año 2005, instaba a los Estados miembros a realizar controles y análisis de muestras para evaluar la seguridad bacteriológica de las ensaladas mixtas que contienen hortalizas crudas con respecto a *Listeria monocytogenes*, a fin de promover un elevado nivel de protección de los consumidores y recoger información sobre la prevalencia de esta bacteria en estos productos. Asimismo, la Recomendación de la Comisión de las Comunidades Europeas de 25 de enero de 2002, aconsejaba examinar la presencia de *Salmonella spp.*, *E. coli* toxigénica (en particular, *E. coli* O157: H7) y *Listeria monocytogenes* en verduras crudas y zumos de frutas y verduras.

El objetivo del presente estudio ha sido determinar el grado de cumplimiento relativo a los criterios microbiológicos establecidos por la legislación vigente para los productos alimenticios a base de vegetales y frutas.

### - Material y Métodos

Se han analizado un total 283 muestras, de las cuales 113 correspondieron a preparados para ensaladas compuestos por uno o más tipos de vegetales crudos lavados, cortados, troceados y envasados en atmósferas modificadas listos para su consumo de Cuarta "Gama"; 85, a zumos de frutas y 85, a gazpachos (ambos tipos de muestras no sometidas a tratamiento UHT).

Algunas de las muestras fueron tomadas en establecimientos de elaboración si bien la mayoría se recogieron en establecimientos de comercialización de la C.A.P.V (Comunidad Autónoma del País Vasco).

Los parámetros analizados, límites de detección y criterios microbiológicos se recogen en la tabla siguiente:

Criterios microbiológicos y límites de detección.

Parámetro	Límite de detección	Vegetales listos para consumo	Gazpacho	Zumos de frutas
<i>Salmonella spp</i>	Presencia/Ausencia en 25 g ó ml	Aus. / 25 g	Aus. / 25 g	Aus. / 25 ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	Recuento en g ó ml	<100 u.f.c./g	<100 u.f.c./ml	<100 u.f.c./ ml
<i>E. coli</i>	Recuento/g; Presencia/Ausencia en 1 ml	<100 u.f.c./g	Aus./ ml	
<i>E. coli</i> O157H7	Presencia/Ausencia en 25 ml	Aus. /25 ml		Aus. / 25 ml
<i>S. aureus</i>	Recuento en 1 ml		<100 u.f.c./ml	

Las muestras fueron recogidas por Técnicos de Salud Pública de Bizkaia, Araba y Gipuzkoa y transportadas en sus propios envases dentro de neveras isotermas a las tres sedes (Vitoria, Bilbao y San Sebastian) del Laboratorio Normativo de Salud Pública de la C.A.P.V acreditado bajo norma ISO 17025. En las tres sedes se utilizaron técnicas comparables y la determinación de los microorganismos patógenos se realizó mediante un screening con enzimoimmunoensayo (MiniVIDAS); los positivos se confirmaron con cultivo basado en el standard ISO 6579.

#### **- Resultados y discusión**

Todas las muestras analizadas se ajustaron a la legislación vigente (R.D. 3484/2000 y Reglamento CE 2073/05), respecto a microorganismos patógenos y testigos de falta de higiene, a excepción de una muestra de ensalada (escarola) en la que se detectó *E. coli* O 157:H7; como resultado de este aislamiento se emitió una notificación al S.C.I.R.I (Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información).

#### **- Conclusiones**

En este estudio se ha puesto de manifiesto que, en los vegetales mínimamente procesados (seleccionados, lavados, enfiados, pelados, cortados, envasados en atmósferas modificadas, etiquetados y almacenados en refrigeración), al inhibirse la flora alterante y consecuentemente, aumentarse su vida útil, puede facilitarse la presencia de microorganismos patógenos, como ha sucedido en la muestra de escarola con presencia de *E. coli* O157:H7.

#### **- Referencias Bibliográficas**

1. - E. González-Fandos y A. Simón (2008). "Calidad y seguridad de frutas y hortalizas mínimamente procesadas". *Alimentaria*, nº 390, 112-116.
2. - Journal of Food Protection. 68 (12): 2541-2552. Diciembre. 2005
- 3.- Asociación Internacional de productores de Vegetales Frescos Cortados. Guía de Seguridad Alimentaria para la Industria de Productos Vegetales Frescos Cortados. Cuarta Edición. 2004.
- 4.- Recomendación de la Comisión de 25 de enero de 2002 relativa a un programa coordinado de control oficial de productos alimenticios para el año 2002. D.O.C.E de 30 de enero de 2002.
5. - Recomendación de la Comisión de 1 de marzo de 2005 relativa a un programa coordinado de control oficial de productos alimenticios para el año 2005.D.O.C.E de 5 de marzo de 2005.
- 6.- Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Reglamento (CE) nº 2075/2005, de 15 de noviembre de 2005. D.O.U.E, L 338/1-26, de 22 de diciembre de 2005.
- 7.- Normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas reguladas por el R.D. 3484/2000, B.O.E de 12/1/2001.

## **EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS VIDAS SET II Y TRANSIA PLATE SET PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EN QUESOS**

***De Simón M., Sabaté S., Luque A. y Ferrer MD.***

*Servicio de Microbiología, Laboratorio de la Agencia de Salud Pública de Barcelona. Avenida Drassanes 13, 08001, Barcelona, [mdsimon@aspb.cat](mailto:mdsimon@aspb.cat)*

### **- Introducción y Objetivos**

Las enterotoxinas estafilocócicas preformadas en los alimentos por cepas de estafilococos, principalmente *Staphylococcus aureus*, son uno de los agentes causales más frecuentes en brotes de intoxicación alimentaria. Actualmente se han identificado 17 enterotoxinas (A-P), pero solo siete de ellas pueden ser detectadas por los anticuerpos de los kits comerciales de inmunoensayo. La enterotoxina A es la implicada con mayor frecuencia en los brotes de intoxicación alimentaria por esta causa, en los países desarrollados (75%), seguida de las enterotoxinas D, C y B.

La dosis tóxica de enterotoxina estafilocócica en humanos no se conoce con exactitud. Estudios epidemiológicos recientes citan 80 ng como dosis tóxica mínima de toxina A para desencadenar los síntomas eméticos (Hennekinne et al. 2007).

El reglamento de la Comisión Europea nº 1441/2007 sobre criterios microbiológicos en alimentos, establece en su anexo I un criterio de Seguridad Alimentaria en el caso del queso, leche en polvo y suero en polvo, que contempla la detección de enterotoxinas estafilocócicas en 25g de muestra mediante el método analítico de referencia del Laboratorio de Referencia de la Comunidad Europea para Leche y Productos Lácticos (European screening method. Version 1,19 November 2007).

Este método consiste en dos etapas, una de extracción/concentración por diálisis y una posterior de detección inmunoenzimática mediante el kit comercial Transia Plate Set o bien mediante el sistema Vidas Staph enterotoxin II. El objetivo de este estudio ha sido evaluar ambos sistemas para la detección cualitativa de enterotoxinas estafilocócicas (A-E) en extractos concentrados de muestras de queso para su posterior utilización en nuestro laboratorio.

### **- Material y Métodos**

Se evaluaron las características operativas de sensibilidad, especificidad, eficiencia y límite de detección (LD) de los métodos Transia Plate (Diffchamb) y Vidas Set II (BioMérieux).

El kit Transia Plate (Diffchamb) es un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich que incluye tres etapas manuales: incubación de la muestra, incubación del conjugado y lectura colorimétrica. El tiempo total del ensayo es de 3 horas de duración. El Vidas SET II es un sistema cerrado automatizado que permite la detección de enterotoxinas mediante un ensayo inmunoenzimático fluorescente en el que los resultados se obtienen en una hora y media.

Se analizaron muestras de queso duro (Emmental) y semiduro (Gorgonzola): 30 muestras naturales no adicionadas y 90 contaminadas artificialmente con 0.1, 0.25, 0.5 y 1ng/g de enterotoxinas A, B, C, D y E (Toxin Technology, Sarasota FL., USA). La preparación de las concentraciones de toxina se realizó en tampón fosfato salino con suero de albúmina 0.1% y ázida sódica 0.05% y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Se analizaron en paralelo mediante los dos sistemas cinco réplicas de 25g de muestra por nivel y tipo de enterotoxina adicionados. En la etapa de extracción/concentración, las muestras se homogeneizaron con agua destilada, se ajustó el pH a 3.5 con el fin de precipitar la caseína, centrifugándose y ajustándose el sobrenadante a pH 7.3. La concentración se realizó mediante diálisis en membranas MWCO:6-8000 (Spectrum Laboratories, CA, USA) frente a una solución de polietilenglicol al 30% a 4°C, 18-20h.

### **- Resultados y Discusión**

Los resultados obtenidos en la detección de las enterotoxinas A-E en las réplicas de cada nivel y tipo de enterotoxina se muestran en las tablas 1 y 2. Los dos métodos presentaron las mismas

características operativas de sensibilidad y especificidad en la detección de las enterotoxinas A, B y C, con un LD de 0.1ng/g para las toxinas A y B, y de 0.25ng/g para la toxina C.

El LD de la toxina D obtenido por el método Vidas es más bajo (0.25ng/g) que el obtenido por el Transia (0.5ng/g). En el caso de la toxina E, únicamente se detectó por el método Vidas (LD=0.5ng/g) mientras que por el Transia Plate se obtuvieron resultados negativos incluso a la concentración de 1ng/g. La menor sensibilidad de los métodos ensayados en la detección de las toxinas D y E está descrita en estudios similares (Vernozy-Rozand et al 2004).

**Tabla 1. Resultados positivos obtenidos en la detección de enterotoxinas A-E en las 5 réplicas adicionadas con 0.1, 0.25, 0.5 y 1ng/g de toxina, analizadas por los métodos Vidas SET II y Transia Plate SET.**

Concentración	Toxina A		Toxina B		Toxina C		Toxina D		Toxina E	
	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE
0.1 ng/g	5	5	5	5	0	0	-	-	-	-
0.25 ng/g	5	5	5	5	5	5	4	2	0	0
0.5 ng/g	5	5	5	5	5	5	5	5	3	0
1 ng/g	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1

**Tabla 2. Características operativas de Vidas SET II y Transia Plate SET en la detección de las enterotoxinas estafilocócicas A-E.**

Características	Toxina A		Toxina B		Toxina C		Toxina D		Toxina E	
	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE	VIDAS SET II	TRANSIA PLATE
Límite detección (ng/g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	>1
Especificidad (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Sensibilidad (%)	100	100	100	100	100	100	80	100	60	-
Eficacia (%)	100	100	100	100	100	100	97	100	94	-

**- Conclusiones**

Los resultados obtenidos en la detección de las enterotoxinas A-D, que son las que con mayor frecuencia contaminan los productos lácticos, indican que los dos métodos estudiados son adecuados para el control analítico de estos alimentos. La toxina E a concentraciones inferiores a 1ng/g, solo ha sido detectada mediante el sistema Vidas. Respecto al tiempo de respuesta y facilidad de realización del ensayo, el sistema Vidas SET II presenta ventajas frente al Kit Transia.

**- Referencias Bibliográficas**

- Hennekinne J.A., Guillier F., Perelle S. De Buyser M.L., Dragacci S., Krysz S. and Lombard B. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16140 Standard of the VIDAS SET II detection Kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. J. of Appl. Microbiol. 2007;102:1261-1272.
- European screening method of the CRL "Coagulase positive staphylococci, including S. aureus" Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk and milk products. Version 1,19 November 2007.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy-Cruchaudet C., Babia C. and Richard Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. Letters in Applied Microbiology 2004, 39: 490-494.

**OBSERVACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS COMIDAS SERVIDAS EN LOS COMEDORES ESCOLARES DEL DISTRITO SANITARIO GUADALQUIVIR**

**A. Del Castillo Caracuel, E. Fuentes-Guerra Caballero, M.C. Acosta Rodríguez, R. Mancha Calero, F. J. Rojas Pérez, R. C. Alonso Porras**

*Distrito Sanitario Guadalquivir, Córdoba.*

**OBJETIVOS:**

Observar la calidad higiénico-sanitaria de las comidas elaboradas y/o servidas en los Comedores de los Colegios públicos y concertados, relacionando los distintos tipos de platos y el tratamiento térmico al que hayan sido sometidas. La finalidad es comentar si la calidad higiénico-sanitaria es adecuada o por el contrario su ingesta pueda representar un grave problema de salud para este colectivo de alto riesgo.

**INTRODUCCIÓN**

Actualmente un gran porcentaje de la población escolar realiza la comida principal en su centro de enseñanza, por lo que el control de los Comedores Escolares tiene una especial importancia desde el punto de vista de la Salud Pública.

En la actual reglamentación española, el Real Decreto 3484/2000 de 29 de diciembre establece las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de las comidas preparadas y las clasifica en 4 grupos, de los que interesa a los establecimientos objeto de estudio, nos centramos en 2 de ellos:

- Grupo A: comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico que lleven ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.
- Grupo B: Comidas preparadas con tratamiento térmico.

En ambos grupos establece como microorganismos indicadores a los aerobios mesófilos y *Enterobacteriaceae* lactosa positiva o coliformes y como testigos de falta de higiene a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además establece la obligatoriedad del análisis para la detección de los patógenos a *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

**MATERIAL y METODOS**

Se realiza un estudio transversal analizando los resultados de los análisis de muestras de alimentos procedentes de comedores escolares del Distrito Sanitario de Atención Primaria Guadalquivir durante el período comprendido entre los años 2004 y 2007. Del total de 46 colegios con cocina propia o servidos por catering se muestrearon sistemáticamente 24 de ellos. En total se analizaron 138 muestras: 21 del grupo A y 117 del grupo B.

El tamaño total de la muestra se fijó en torno a los 100 gramos. Las muestras se recogieron en envases estériles, en las mismas condiciones en que se sirven a los escolares, debidamente etiquetados y cerrados. El transporte al Laboratorio se realizó en condiciones de refrigeración (4 a 6 ° C).

Los parámetros estudiados han sido los recogidos en el Real Decreto 3484/2000 y las técnicas utilizadas son las recomendadas por Dña. M<sup>a</sup> del Rosario Pascual Andersen del Instituto Carlos III, en su libro "Microbiología Alimentaria": aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae* lactosa positiva, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

**RESULTADOS**

En ninguna de las muestras analizadas se aislaron patógenos *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

Los resultados de los recuentos obtenidos en el total de comidas analizadas, para los microorganismos indicadores y testigos de falta de higiene, se reflejan en la tabla 1

MICROORGANISMOS		GRUPO DE COMIDAS			
		A		B	
		Positivas	%	Positivas	%
INDICADORES	Mesófilos	2	9,52	0	0
	<i>Enterobacteriaceae</i>	1	4,76	1	0,85
TESTIGOS	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4,76	0	0

Los resultados a lo largo de los años estudiados se recogen en la Tabla 2.

AÑOS	Nº MUESTRAS
2004	1
2005	4
2006	0
2007	0

## CONCLUSIONES

1.- La calidad microbiológica de las comidas de los comedores escolares del Distrito Sanitario Guadalquivir es aceptable.

2.- La mayoría de comidas que superan los límites establecidos, son del grupo A, debido a que llevan ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.

El porcentaje de muestras positivas del grupo B no es significativo.

3.- Se observa que los porcentajes de muestras positivas ha disminuido paulatinamente a lo largo del período estudiado, creemos que por la implantación de los APPCC y una mejora de infraestructura.

4.- No obstante, al existir un porcentaje de alimentos (3,62 %) que superan los límites establecidos en microorganismos indicadores y testigos de falta de higiene y al ser los escolares un colectivo de alto riesgo, sería necesario la revisión mediante supervisiones (auditorías) del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) de los Comedores Escolares, recomendando como alcance la vigilancia de los mismos.

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA PCR A TIEMPO REAL Y EL SISTEMA MINI-VIDAS SLM PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP. EN ALIMENTOS

Elizaquível P.<sup>1</sup>, Gabaldón JA.<sup>2</sup> y Aznar R.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. Burjasot, 46100, Valencia, [paebar@iata.csic.es](mailto:paebar@iata.csic.es)

<sup>2</sup>CTC, Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación. Murcia

<sup>3</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Paterna, Valencia

### - Introducción y Objetivos

*Salmonella* spp. es uno de los patógenos alimentarios que constituye mayor amenaza para la salud pública. Su principal reservorio es el tracto intestinal de mamíferos y aves por lo que el consumo de huevos, carnes y productos derivados es la causa más frecuente de los brotes de salmonelosis. Sin embargo, el creciente interés de los consumidores por los productos preparados y más saludables, ha incrementado el número de casos asociados al consumo de productos listos para el consumo, frutas y verduras frescas (Anon. 2002). El método tradicional para la detección de *Salmonella* en alimentos requiere entre 5 y 7 días e incluye los pasos de enriquecimiento, aislamiento e identificación de colonias, y confirmación serológica. Como alternativa existen métodos inmunológicos como el Vitek Immunodiagnostic Assay (VIDAS<sup>®</sup>; Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), reconocido a nivel internacional y ampliamente utilizado en la industria alimentaria por su facilidad de manejo. Así mismo, entre las técnicas moleculares alternativas destaca la PCR y, más recientemente la PCR a tiempo real (RTi-PCR), que permiten la detección rápida, específica y automatizada de los microorganismos. La incorporación de la PCR en las normas ISO en los últimos años, favorecerá su aplicación en alimentos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de diagnóstico de un sistema de RTi-PCR para la detección directa de *Salmonella* spp. en alimentos, comparado con el sistema mini-VIDAS. El estudio se ha basado en el análisis de 141 muestras recogidas en un periodo de dos años y analizadas, simultáneamente, en un estudio colaborativo de dos laboratorios (Lab1 y Lab2).

### - Material y Métodos

**Procesado de las muestras.** Se analizaron 141 muestras recogidas de industrias alimentarias de la región de Murcia. Se homogenizaron 25 g en APT (1:10) y se tomaron alícuotas de 1 ml, que se congelaron para su posterior análisis por RTi-PCR, y de 10 ml para el enriquecimiento en medios selectivos (Muller-Kauffmann y Selenie Cystine). Tras el enriquecimiento, se tomaron alícuotas de 10 ml para el análisis por mini-VIDASy de 1 ml para PCR convencional.

**Detección por mini-VIDAS SLM.** Se realizó en el lab1, a partir de las muestras enriquecidas, siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Extracción de DNA.** Se utilizó el sistema comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos se partió de 1 ml y se eluyó el DNA en 100  $\mu$ l de agua ultra pura (SIGMA) y se utilizaron 5  $\mu$ l para el análisis por PCR y por RTi-PCR.

**Detección por PCR y RTi-PCR.** Se realizaron en ambos laboratorios, directamente a partir del homogeneizado por RTi-PCR y, tras enriquecimiento, por PCR convencional. Para las reacciones de PCR convencional se utilizaron los cebadores descritos por Hoorfar y cols 2000 dirigidos al gen *invA*. Para la RTi-PCR se utilizó además la sonda TaqMan descrita por los mismos autores utilizando TaqMan Core Reagents Kit (AppliedBiosystems) y el GeneAmp 5700 sequence detection system.

**Análisis estadístico.** Los resultados del análisis por PCR y RTi-PCR se analizaron estadísticamente mediante el test Kappa para establecer el grado de acuerdo entre ambos laboratorios. A continuación se valoró la capacidad predictiva de las técnicas en estudio (RTi-PCR y mini-VIDAS) tomando como "diagnóstico verdadero" el resultado obtenido por PCR convencional tras enriquecimiento.

## - Resultados y Discusión

De las 141 muestras analizadas mediante PCR convencional, 35 (24.8 %) mostraron el amplicón correspondiente de 119 pb en el Lab1 y 44 (31.2 %) en el Lab 2. El valor del índice Kappa para la comparación de los resultados de la PCR convencional en ambos laboratorios fue de 0.808 indicando un buen grado de acuerdo entre ellos, por lo que arbitrariamente fueron seleccionados los resultados obtenidos en el Lab1 como “diagnóstico verdadero”. Así mismo, el valor del índice Kappa para la comparación de los resultados obtenidos mediante RTi-PCR en ambos laboratorios (0.807) indicaba un buen grado de acuerdo entre ambos, confirmando la reproducibilidad de los resultados.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos por RTi-PCR y mini-VIDAS respecto a los de diagnóstico verdadero (PCR convencional) y se observa la discrepancia entre ambas técnicas que fue corroborada por los valores del índice Kappa, 0.065 y 0.112, obtenidos para el Lab1 y el Lab2, respectivamente.

Tabla 1. Resultados obtenidos para las 141 muestras por RTi-PCR en ambos laboratorios y por mini-VIDAS en el Lab1 en función del verdadero diagnóstico

Método de diagnóstico		Diagnóstico verdadero		Total
		Positivo	Negativo	
RTi-PCR (Lab1)	Positivo	28	0	28
	Negativo	7	106	113
	Total	35	106	141
RTi-PCR (Lab2)	Positivo	27	4	31
	Negativo	8	102	110
	Total	35	106	141
mini-VIDAS	Positivo	5	6	11
	Negativo	30	100	130
	Total	35	106	141

El análisis de la capacidad predictiva de la RTi-PCR reveló un valor predictivo positivo (VPP) del 100 % en el Lab1 y del 87.1 % en el Lab2, mientras que el VPP para mini-VIDAS fue del 45.45 %. El sistema mini-VIDAS presentó una elevada proporción de falsos negativos (55%).

## - Conclusiones

El sistema de RTi-PCR descrito por Hoorfar y cols. (2000) y evaluado en este trabajo, ha demostrado tener mayor valor predictivo que el sistema mini-VIDAS, por lo que constituye una técnica diagnóstica más sensible y específica. Además, permite completar el análisis en unas 5 horas en lugar de las 24-48 que requiere el mini-VIDAS. El criterio actual para *Salmonella* es “ausencia en 25 g de alimento” lo que no se puede garantizar realizando la detección directa por RTi-PCR, cuyo límite de detección está en  $10^3$  ufc/g. No obstante, la aplicación de la RTi-PCR directamente en las muestras, permitiría revelar los positivos en tan sólo 5 h, debiéndose confirmar los negativos por PCR, tras completar el enriquecimiento.

## - Referencias Bibliográficas

- Anon. (2002) Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Scientific Committee on Food. SCF/CS/FMH/SURF.
- Hoorfar, J., Ahrens, P., Radström, P. (2000) Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. J Clin Microbiol 38:3429-3435.
- Schuurman, T., de Boer, R., Patty, R., Kooistra-Smid, M., Zwet, A. (2007) Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for *Salmonella* Enterica 5'-nuclease assay. J Microbiol Meth 71:238-245.

## CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL POLEN APÍCOLA. ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA SU CONTROL Y CONSERVACIÓN

**Fernández Monistrol I.<sup>1</sup>, Ortiz M. L.<sup>1</sup>, Pedregosa A. M.<sup>1</sup>, Quintana-Edesa A.<sup>2</sup>, Quiñones F.<sup>2</sup>, Higuera J.A.<sup>2</sup>, León V.<sup>2</sup>, Gonzalez A.<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá. Ctra. Barcelona, km. 33, 28801, Alcalá de Henares. Madrid  
e-mail: [inmaculada.fernandez@uah.es](mailto:inmaculada.fernandez@uah.es)

<sup>2</sup>Centro Agrario de Marchamalo. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Camino de San Martín s/n. Marchamalo, 19180 Guadalajara.

### - Introducción y Objetivos

El polen de abeja es uno de los alimentos naturales conocidos con mayor poder nutritivo. Está compuesto por pequeños gránulos que forman las abejas amasando el polen de las flores y que depositan en cavidades de las patas traseras para su transporte hasta las colmenas. Estos granos de polen pueden ser recolectados por los apicultores mediante un sistema "atrapa-polen" a la entrada de la colmena y comercializados como alimento energético.

El polen se comercializa principalmente como un alimento deshidratado. Sin embargo, no existe una norma de calidad que determine (entre otros parámetros), la humedad que debe presentar el producto comercial. El apicultor suele aplicar una combinación tiempo/temperatura subjetiva, que en algunos casos puede alterar el valor nutritivo del producto o ser insuficiente para frenar el crecimiento microbiano. Debido a la baja humedad, el polen deshidratado no es un hábitat favorable para el crecimiento microbiano, siempre y cuando la deshidratación se realice de la manera correcta y el polen se mantenga deshidratado. Pero debido a su composición y a que su consumo se realiza en fresco, el polen es más susceptible de ser contaminado por microorganismos y por tanto presenta un mayor riesgo de transmitir enfermedades infecciosas que la miel.

Debido a falta de datos respecto a la microbiología del polen (fresco y deshidratado) y la efectividad del tratamiento térmico en el control de la flora microbiana del polen, en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- (i) Puesta a punto de métodos de análisis microbiológico del polen.
- (ii) Estudio de la acción de la temperatura y el tiempo de desecación sobre la flora microbiana del polen y su relación con la actividad del agua ( $a_w$ ).
- (ii) Comparación de la carga microbiana entre un polen fresco y diferentes pólenes comerciales de la región apícola de la Alcarria (Guadalajara).

### - Material y Métodos

Se estudió la carga microbiana del polen recolectado en el CAR de Marchamalo (Guadalajara) durante los meses de mayo y junio del 2006. Se usó un polen fresco (almacenado en refrigeración) y un polen tratado a 40 y 50 grados durante 24 horas. La  $a_w$  del polen fue valorada en la unidad de apoyo Tecnología de Alimentos de la UAH. Para el estudio comparativo de la carga microbiana se utilizó polen fresco producido en el CAR y diferentes pólenes comerciales de la región apícola de La Alcarria, Guadalajara. Para el análisis microbiológico, se prepararon suspensiones de polen en agua de triptona, y diluciones seriadas de la suspensión. Volúmenes conocidos de cada dilución se utilizaron para inocular diferentes medios de cultivo sólidos, bien en profundidad o por extensión en superficie. Los medios utilizados fueron: SPS para determinar Clostridios Sulfito Reductores; PCA para determinar Aerobios Mesófilos; R2 para valorar microorganismos Oligotrofos; McConkey para determinar Enterobacterias fermentadoras de lactosa; Agrar Tergitol para el recuento de Coliformes Totales; Manitol salado para el recuento de Estafilococos; Sabouraud para detectar Hongos y Levaduras y MYPGP para detectar Microaerófilos (*Paenibacillus larvae*).

### - Resultados y Discusión

En el polen fresco existe una flora microbiana formada por microorganismos aerobios mesófilos y oligotrofos, bacterias no fermentadoras de lactosa y levaduras. En raras ocasiones se han detectado

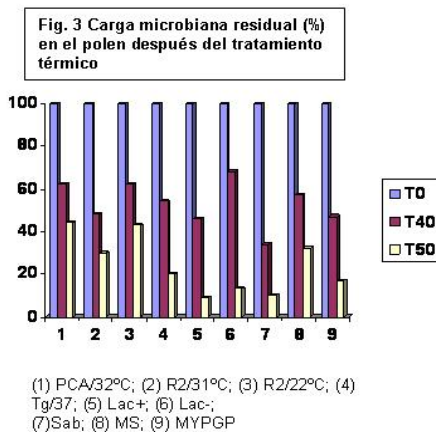
coliformes fermentadores de lactosa, estos pudieron provenir de una contaminación fecal. Los clostridios sulfito reductores están ausentes en el polen fresco, y sólo en una muestra se detectó contaminación de este tipo. El recuento de microorganismos en el medio Sabouraud se debe al crecimiento de bacterias y levaduras y en menor proporción de hongos (Fig. 1).

**Fig. 1 Carga microbiana en polen fresco**

	(UFC/g)
Aerobios mesófilos	3.4 10 <sup>3</sup>
Oligotrofos (31°)	66.0 10 <sup>3</sup>
Oligotrofos (22°)	64.0 10 <sup>3</sup>
Coliformes totales	40.0 10 <sup>3</sup>
Lac +	1.1 10 <sup>3</sup>
Lac -	40.0 10 <sup>3</sup>
Hongos y levaduras	76.3 10 <sup>3</sup>
Stafilococos	0.0
Microaerófilos	74.4 10 <sup>3</sup>
Clostridios sulfito reductores	0.1 10 <sup>3</sup>

**Fig. 2 Efecto de la temperatura en la a<sub>w</sub> y la carga microbiana**

(N° UFC/g)	Tratamiento térmico		
	Sin tratar	40°C	50°C
<b>Aerobios mesófilos</b>	3.4. 10 <sup>3</sup>	2.1. 10 <sup>3</sup>	1.5. 10 <sup>3</sup>
<b>Oligotrofos</b>	66.0. 10 <sup>3</sup>	31.2. 10 <sup>3</sup>	19.4. 10 <sup>3</sup>
<b>a<sub>w</sub></b>	0.473	0.115	0.065



**Fig. 4 Comparación de la carga microbiana en polen fresco y polen comercial**

NºUFC 103/g	Fres co	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Aerobios	3.4.	0.8.	0.4.	0.6.	1.8.	1.9.	4.0.
Oligotrofos (31°)	66.0	2.5.	1.0.	32.5.	2.5.	3.5.	8.0.
Lac +	1.1	0.5.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3.
Lac-	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hongos y levaduras	76.3	2.5.	1.3.	0.3.	1.5.	0.2.	7.0.
Etafilococos	5.6	0.0	0.5.	0.0	0.1.	0.0	0.1.
Clostridios sulfito reductores	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0.
Microaerófilos	74.4	0.2.	0.0	0.2.	1.0.	0.0	1.0.

Tras el tratamiento térmico, se redujo progresivamente la a<sub>w</sub> del polen y de forma paralela, la carga microbiana (Fig. 2). La reducción media de la carga microbiana después del tratamiento a 40°C fue de un 50%, alcanzándose una reducción media de un 25% después de calentar el polen a 50°C (Fig. 3). Como se puede observar, el tratamiento del polen a 50°C no elimina totalmente los microorganismos, sin embargo, tras comprobar la ausencia de coliformes fecales, clostridios sulfito reductores y estafilococos, se podría considerar que el polen es seguro. Teniendo en cuenta la posibilidad de pérdida nutritiva del alimento, consideramos que la temperatura de secado no debe de superar los 50°C.

Cuando se estudió la carga microbiana de diferentes pólenes comerciales de la región apícola de la Alcarria (Guadalajara), se detectó una baja carga de microorganismos aerobios mesófilos y oligotrofos, confirmándose la ausencia de coliformes, clostridios sulfito reductores y estafilococos. El tratamiento de secado de estos pólenes es adecuado para asegurar la calidad microbiológica del polen, pero a costa, quizás, de un tratamiento térmico excesivo que provoque la pérdida de su valor nutritivo. En este sentido, este trabajo se integra en un proyecto que pretende conseguir la optimización del proceso de secado del polen para producir un polen seguro microbiológicamente, que conserve todo su valor nutritivo (RTA2007-0072-C03-02 financiado por INIA)

### - Conclusiones

Teniendo en cuenta la posibilidad de pérdida nutritiva del polen consideramos que la temperatura de secado no debe de superar los 50°C.

### - Referencias Bibliográficas

Yook, H.S.; Lim, S. ; Byun, M. Journal of food protection 61, 217-220. 1988.  
 REAL DECRETO 2685/1976 de 16 de octubre  
 M.R. Pascual Anderson y V. Calderón y Pascual (2000) Microbiología Alimentaria 2ªEd. Ed. Díaz de Santos.

## CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS DE LA CARNE DE AVESTRUZ ENVASADA AL VACÍO

Pino, A., Fernández-Salguero, J., Galán, E. y Prados, F.

Departamento de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales. Edif. Darwin. 14071-Córdoba (España). Telef. y Fax: 957212010. E-mail: ao1fecaj@uco.es

### Introducción y objetivos

El avestruz (*Struthio camelus*) pertenecen al grupo de las ratites que se caracterizan por ser aves no voladoras. En la actualidad los avestruces solo se encuentran en estado salvaje en África, sin embargo el avestruz ha sido criado en granja desde la mitad del siglo XIX, primero en Sudáfrica y posteriormente se extendió a otros países. En España la cría del avestruz en granjas comenzó en la década de los 90, principalmente para la obtención de su carne. La producción de carne de avestruz en Europa se ha venido incrementado a razón de unas 750 t/año (FAO, 1999). La carne de avestruz ha visto incrementada su popularidad en la población occidental debido a su valor nutricional (Alonso-Calleja et al., 2002) que es muy similar en sabor y textura a la carne de ternera o vaca dependiendo de la edad a que son sacrificados y es una carne de alto porcentaje de proteína y bajo en grasa y colesterol. En España la producción de carne de avestruz se ha venido incrementando desde los 7.500 kg producidos en 1997 hasta los 187.000 kg producidos en 2004 (Anónimo, 2004). Actualmente se puede encontrar la carne fresca de avestruz en el mercado envasada al vacío o en atmósferas modificadas.

Puesto que aún existe poca información científica sobre estas carnes, el objetivo del presente trabajo fue determinar la composición química bruta de muestras de solomillo y de filete e investigar la evolución de la microbiota de estas dos presentaciones comerciales envasadas a vacío al principio de su puesta en el mercado y al final su periodo de vida útil. .

### Material y Métodos

Partiendo de ocho animales sacrificados en cuatro días diferentes, se analizaron por duplicado 16 muestras de carne de avestruz envasadas al vacío y distribuidas de la siguiente manera: 8 muestras al día siguiente de ser envasadas y diferenciando entre muestras correspondientes a la parte denominada como solomillo (4) y muestras de filete (4) y 8 muestras el día anterior al indicado en la fecha de caducidad, igualmente diferenciando entre muestras de solomillo (4) y filete (4). El recuento de *Bacterias aerobias mesófilas* (BAM), *Enterobacterias totales*, *Coliformes totales*, *Bacterias ácido lácticas* (BAL) y *Levaduras y Mohos* se realizó siguiendo el procedimiento establecidos por la APHA (1985). Para el recuento de *Estafilococos* se siguió el procedimiento establecido por Buttiaux (1972). Igualmente se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos: *pH*, mediante lectura directa con pH-metro y *humedad*, *cenizas*, *grasa* y *proteína* siguiendo los métodos establecidos por la AOAC (1995).

### Resultados y discusión

En general los recuentos obtenidos inicialmente en las muestras fueron elevados, si bien la alta desviación típica indica que los valores obtenidos varían con el día de sacrificio de los animales que a su vez depende de factores tales como la procedencia de éstos, faenado de las canales, manipulación durante el despiece y del mantenimiento de la cadena de frío. Los recuentos de BAM, Enterobacterias y BAL obtenidos al inicio fueron inferiores a los encontrados por Alonso-Calleja y Col. (2002) en análisis de carne de avestruz envasada al vacío de 3 a 7 días después del envasado.

Los recuentos de microorganismos encontrados no presentaron diferencias significativas respecto de la pieza cárnica analizada, aunque sí se observan recuentos algo superiores en las muestras analizadas de filete, probablemente debido a la mayor manipulación de cada pieza durante el procesado.

En general, los recuentos microbianos estudiados aumentaron de manera significativa ( $p < 0,05$ ) durante la vida útil de la carne de avestruz envasada al vacío, encontrándose valores de BAM

Enterobacterias y Coliformes totales en filete al final del periodo de vida útil de 7,46 6,39 y 6,48 log<sub>10</sub>ufc/g, respectivamente.

**Tabla 1.** Recuento de microorganismos (log<sub>10</sub>ufc/g) y valor de pH de carne de solomillo y filete de avestruz, al día siguiente de ser envasada al vacío (inicial) y al final de su vida útil.

	Inicial		Final	
	Solomillo	Filete	Solomillo	Filete
<b>pH</b>	5,83±0,24 <sup>ab</sup>	6,18±0,50 <sup>b</sup>	5,68±0,18 <sup>a</sup>	5,90±0,46 <sup>ab</sup>
<b>BAM</b>	5,29±1,82 <sup>a</sup>	5,33±1,70 <sup>a</sup>	6,89±0,78 <sup>b</sup>	7,46±0,70 <sup>b</sup>
<b>Enterobacterias</b>	4,35±2,21 <sup>a</sup>	4,29±2,15 <sup>a</sup>	5,79±1,60 <sup>b</sup>	6,39±1,41 <sup>b</sup>
<b>Coliformes Totales</b>	3,83±2,04 <sup>a</sup>	3,90±1,92 <sup>ab</sup>	5,59±1,55 <sup>bc</sup>	6,48±1,23 <sup>b</sup>
<b>Estafilococos</b>	4,34±1,71 <sup>a</sup>	4,41±1,70 <sup>a</sup>	5,48±1,04 <sup>ab</sup>	6,28±1,04 <sup>b</sup>
<b>BAL</b>	4,91±1,10 <sup>a</sup>	4,75±1,26 <sup>a</sup>	7,11±0,68 <sup>b</sup>	6,97±0,99 <sup>b</sup>
<b>Levaduras y mohos</b>	5,27±1,73 <sup>a</sup>	5,09±1,55 <sup>a</sup>	6,06±0,45 <sup>ab</sup>	6,70±0,80 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

No se observaron diferencias significativas entre la composición química entre las piezas cárnicas analizadas de solomillo y filete. La carne de avestruz presentó un alto contenido en proteína y bajo contenido en grasa.

**Tabla2.** Composición química bruta (g/100 g producto) de solomillo y filete de avestruz.

	Solomillo	Filete
<b>Humedad</b>	75,33±2,11	76,23±1,43
<b>Cenizas</b>	0,93±0,21	1,17±0,34
<b>Proteína</b>	20,83±1,02	20,63±2,10
<b>Grasa</b>	0,87±0,47	0,60±0,44

## Conclusión

Los altos recuentos de microorganismos encontrados en las muestras de solomillo y de filete de avestruz hacen necesario mejorar la higiene del procesado de forma que se consiga reducir los recuentos de microorganismos al ser envasada a vacío para evitar recuentos tan elevados al final de periodo de caducidad (10 días desde el envasado).

## Referencias Bibliográficas

- Anónimo. (2004). Estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España.
- Alonso-Calleja, C., Martínez-Fernández, B., Prieto, M., Capita, R. (2004). Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiology*, **21**, 241-246.
- AOAC (1995). Official Methods of Analyses. 13<sup>th</sup> edition. Washington D.C. USA.
- APHA (1985). Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. Washington. USA.
- Buttiaux, R. (1974). Manual de techniques bacteriologiques. 4<sup>a</sup> Ed. Ed. Flammarion Medicine Science. Paris. Francia.
- FAO (Food and Agriculture Organization), (1999). Ostrich production system. Report of the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Food and Agriculture Organization, Rome.

## BIOCONTROL DE OCRATOXINA A EN ALIMENTOS CONCENTRADOS PARA POLLOS DE ENGORDE PRODUCIDOS EN VENEZUELA

***Figueroa S.<sup>1</sup>, Centeno S.<sup>2</sup>, Adelantado C.<sup>3</sup> y Calvo M.A.<sup>3</sup>***

<sup>1</sup>Dpto. de Tecnología de Alimentos, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Núcleo Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Boca del Río, Venezuela, [sarafigueroa19@gmail.com](mailto:sarafigueroa19@gmail.com)

<sup>2</sup>Dpto. de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

<sup>3</sup>Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, España.

### **- Introducción y Objetivos.**

Las materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos para animales constituyen un sustrato ideal para el crecimiento de hongos toxigénicos y para la producción de micotoxinas, entre las que destaca la ocratoxina A. Este hecho ocasiona graves problemas que afectan a la productividad agropecuaria, a las empresas productoras de estos alimentos, y a la salud de animales y humanos. En vista de ello se hace necesario el desarrollo e implementación de métodos que permitan la prevención y la reducción o eliminación de la contaminación por estas toxinas con el fin de proteger la salud de animales y humanos [1,2].

Las estrategias destinadas al control de la contaminación por micotoxinas deben estar enfocadas en las etapas iniciales de la recolección de la materia prima, donde se establezcan Buenas Prácticas Agrícolas, y en las etapas de post-recolección, donde se deben tomar medidas preventivas relacionadas con el control de las condiciones de almacenamiento [2,3]. Sin embargo, cuando ya se ha producido la contaminación por micotoxinas es necesaria la aplicación de métodos que reduzcan o eliminen las toxinas del alimento, entre los que destaca el uso de productos naturales, como aceites esenciales y extractos naturales de plantas [1,3].

Diversos autores coinciden en que los extractos naturales, que en general son aceites esenciales, contienen componentes o principios activos elaborados y acumulados por las plantas que les permiten controlar procesos de etiología bacteriana, vírica o fúngica, de manera que juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas [4,5]. El mecanismo de acción de los extractos naturales y aceites esenciales sobre los microorganismos no se conoce en toda su extensión y resulta desconocido el modo de acción sobre las micotoxinas. Sin embargo, se sabe que poseen una elevada capacidad antioxidante y se ha sugerido que la acción antimicrobiana deriva de la ruptura de la membrana celular de los microorganismos, lo que incrementa la permeabilidad y el escape de vitales constituyentes intra y extracelulares, lo que resulta en un deterioro del sistema enzimático [4,5,6].

El objetivo general de este estudio fue evaluar la capacidad de extractos naturales de Rutáceas para el biocontrol de ocratoxina A en alimentos concentrados para pollos de engorde.

### **- Material y Métodos**

Se seleccionaron al azar 20 muestras de alimentos para pollos de engorde entre los que presentaron contaminación con OTA, se pesaron 5 g de cada una de ellas y se colocaron en tubos de ensayo estériles. Se agregaron 500 µl del extracto de *Citrus limonium*, (comercializado por productos DISQUIFAR, C.A., Venezuela) y se dejó actuar por 1 h. A continuación se procedió a realizar la determinación de ocratoxina A por la técnica de ELISA, manteniendo un ensayo control, al cual no se le añadió el extracto de limón. A partir de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de reducción correspondiente.

Para comparar los niveles de ocratoxina A antes y después del tratamiento con el extracto de limón, se realizó un análisis de T-Student para datos apareados, con un nivel de significancia de 5 % usando el programa estadístico Statgraphics, versión 5.1

### **- Resultados y Discusión**

En la evaluación de la capacidad de acción del extracto natural de *Citrus limonium* para el biocontrol de ocratoxina A en las muestras analizadas se observó que existían diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) en la concentración de OTA antes y después del tratamiento con el extracto aplicado. En la Tabla 1 se presentan los valores promedios de las

concentraciones de OTA antes y después del tratamiento con el extracto de *Citrus limonium*, donde se puede observar que el porcentaje promedio de reducción de OTA fue del orden del 42,17 %.

Tabla 1. Valores promedios de las concentraciones de ocratoxina A antes y después del tratamiento con el extracto de *Citrus limonium* y porcentaje promedio de reducción de ocratoxina A detectado en las muestras analizadas de alimentos concentrados para pollos de engorde.

Promedio concentración inicial (µg/kg)*	Promedio concentración final (µg/kg)*	Porcentaje promedio de reducción (%)
21,416 ± 6,126	12,384 ± 3,792	42,17

\* Media aritmética de 20 muestras.

La capacidad de reducción puesta de manifiesto en este estudio fue similar a la evidenciada por Mohanlall y Odhav (2006) [7], quienes determinaron que las fitoalexinas producidas por las naranjas (*Citrus sinensis*), pertenecientes a la familia *Rutaceae*, fueron capaces de producir una reducción de fumonisina B<sub>1</sub> y de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, en un rango comprendido entre 40 % y 43 %. De igual forma, la reducción de OTA encontrada en esta investigación es comparable a la aportada por Krishnamurthy y Shashikala (2006) [8], quienes encontraron que el uso de cortezas de *Citrus sinensis* produjo una reducción significativa de aflatoxina B<sub>1</sub> del 52,43 %, y que la reducción de esta micotoxina utilizando *Citrus medica* fue de 66,50 %.

#### - Conclusiones

El extracto natural de Rutáceas utilizado en esta investigación determinó una reducción estadísticamente significativa de ocratoxina A del orden de un 42,17 %, en las muestras de alimentos concentrados para pollos de engorde. En consecuencia consideramos que este extracto puede ser una alternativa válida para el control de la calidad de los alimentos, colaborando a mejorar la seguridad alimentaria.

#### - Referencias Bibliográficas

- [1] Kabak, B.; Dobson, A.D. y Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 (8): 593-619.
- [2] Sanchis, V.; Marín, S. y Ramos, A.J. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S69-S75.
- [3] Murphy, P.A.; Hendrich, S.; Landgren, C. y Bryant, C. 2006. Food mycotoxins: An update. *J. Food Sci.* 71 (5): 51- 65.
- [4] Calvo, M.A.; Costa-Batló, P. y Marzo, I. 2001. Sinergismo entre extractos naturales y ácidos orgánicos en nutrición aviar. Trabajo presentado en el XXXVIII Simposium Científico de Avicultura. Sección Española de Ciencia Avícola. Córdoba, España, del 21 al 23 de noviembre.
- [5] Souza, E.L.; Oliveira, E.; Freire, K.R. y Sousa, C.P. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 48 (2): 245-250.
- [6] Lee, K.W.; Everts, H. y Beynen, A.C. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poultry Sci.* 3 (12): 738-752.
- [7] Mohanlall, V. y Odhav, B. 2006. Biocontrol of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and fumonisin B<sub>1</sub> with 6,7-dimethoxycoumarin, a phytoalexin from *Citrus sinensis*. *J. Food Protect.* 69 (9): 2224-2229.
- [8] Krishnamurthy, Y.L. y Shashikala, J. 2006. Inhibition of aflatoxin B production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Lett. Appl. Microbiol.* 43 (5): 469-474.

**APLICACION DE MODELOS PREDICTIVOS DISPONIBLES PARA LA ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN COMEDORES COLECTIVOS.**

**García-Gimeno, R.M.<sup>1</sup>, Caracuel A.<sup>2</sup>, Valero, A., Pérez F., Carrasco E. y Zurera, G.**

<sup>1</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, bt1gagir@uco.es

<sup>2</sup> Servicio de Alimentación. HRU Carlos Haya. SAS. Consejería de Salud. Junta de Andalucía

**Introducción y Objetivos**

La actual demanda de comidas preparadas de mayor calidad y seguridad, ha conllevado que los servicios de alimentación hayan experimentado una mejora sustancial en los últimos años. De especial interés, entre otros, es la Alimentación Hospitalaria ya que va dirigida a un sector de la población susceptible, para el que se deben incrementar las medidas de seguridad y control alimentario.

La microbiología predictiva estudia las respuestas microbianas a diferentes condiciones ambientales (pH, aw, conservantes, etc.), con el fin de crear modelos matemáticos que expresen dichas relaciones y proporcionen predicciones de dicho comportamiento del comportamiento microbiano en medios de cultivo y alimentos.

En este estudio se pretende estimar mediante los modelos predictivos el posible crecimiento de microorganismos patógenos en 4 tipos de platos preparados teniendo en cuenta el perfil de tiempo/temperatura del plato preparado desde la cocina hasta su servicio. Queremos contestar a la pregunta ¿es posible que un microorganismo patógeno no detectado, crezca y llegue al consumidor en concentración suficiente para constituir un riesgo?

**Material y Métodos**

En el presente estudio, llevado a cabo en el Hospital Regional Universitario Carlos Haya (Málaga), se ha realizado el análisis microbiológico según el Real Decreto 3484/2000, de 50 muestras (durante el período 2006-2008) de distintos tipos de alimentos preparados de un hospital. Entre los 32 tipos de productos analizados, se escogieron 4 tipos de comida preparada correspondientes a los que presentaron recuentos totales o coliformes entre los valores m y M establecidos por dicho Real Decreto 3484/2000: ensalada, filetes de cerdo a la plancha, filete de pechuga de pollo a la plancha y rosada a la plancha.

A través de la bibliografía se obtuvieron los valores de los factores físico-químicos que influyen en el crecimiento como pH, actividad agua y concentración de NaCl.

Se utilizó para ello los software disponible a través de Internet: Pathogen Modeling Program (PMP 7) (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6786>) y Combase Predictor ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)) para poder estimar el posible crecimiento de microorganismos patógenos.

Los perfiles de tiempo/temperatura de las comidas preparadas (con y sin tratamiento térmico) fueron los publicados por Valero y col. (2008).

**Resultados y Discusión**

Se realizó una primera aproximación mediante el programa PMP 5 para observar cuáles serían los microorganismos potenciales con mayor posibilidad de crecimiento según las condiciones consideradas para cada alimento. Para ello se tuvieron en cuenta los siguientes valores de los factores: ensalada (pH=6.2, NaCl=0.5), filete de cerdo a la plancha (pH=6.2, NaCl=0.5); pechuga de pollo a la plancha (pH=5.8, aw=0.99, NaCl=0.5) y rosada a la plancha (pH=6.0, NaCl=0.5). Tomando como ejemplo las ensaladas se consideraron 2 temperaturas: 8°C, (temperatura máxima de almacenamiento en frío), y 24°C que fue la temperatura más alta observada en el momento de servicio de estos productos (Valero y col., 2008). A 8°C microorganismos patógenos no crecen pero sobreviven, aunque sin embargo, a 24°C crecen, y partir de las 4 horas es cuando algunos patógenos podrían haberse incrementado en 1 log/g, partiendo de concentraciones iniciales no detectables por las técnicas microbiológicas estándar. De aquí se deduce la importancia del mantenimiento del frío en la distribución de los platos que, en este caso concreto, al realizarse inmediatamente el servicio al consumidor, no transcurre el tiempo suficiente para que la

concentración microbiana alcance niveles que puedan en que pueda constituir un riesgo. Sin embargo, es una medida de gestión a tener en cuenta a la hora de establecer tiempos máximos que puede permanecer una comida preparada antes de ser servida.

Estudiando cada microorganismo por separado se obtiene que *E. coli* tardaría 6.1h en aumentar 1 log/g, pero sólo 2.3h si consideramos la peor situación (sin fase de adaptación). *Listeria monocytogenes* tardaría 2.4h, *Salmonella* spp. 2.1 h, y *Staphylococcus aureus* 3.6h en aumentar 1 log/g.

Lo cierto es que durante la distribución la temperatura de los alimentos va variando y esto no ha sido tenido en cuenta en las predicciones anteriores. Introduciendo el perfil temperatura/tiempo en el programa Combase Predictor nos permite obtener predicciones teniendo en cuenta estos perfiles y se observa que apenas se incrementan los recuentos en las 1.5 horas que transcurren desde que se elabora en cocina hasta que se sirve.

En el caso de las comidas calientes que deben servirse a más de 65°C se observa un descenso de esta temperatura desde la cocina central hasta que llega al consumidor. Se ha aplicado el programa PMP 7 introduciendo el perfil temperatura/tiempo para la estimación del crecimiento de *Cl. perfringens*. En este caso lo único que se considera es el perfil de temperatura sin tener en cuenta las demás condiciones ambientales y no está disponible la predicción con otros microorganismos. Así, para la pechuga de pollo a la plancha se observa una estimación de la tasa de crecimiento de 3.44 log/h.

Para el caso de los demás microorganismos, se ha de emplear modelos de inactivación térmica en la estimación de la respuesta microbiana a temperaturas superiores a 37°C. Considerando que la temperatura en que permanece durante más tiempo el alimento es la mínima registrada (peor situación) se estimó la supervivencia o inactivación de microorganismos patógenos basándose en los registros de temperatura descritos por Valero y col. (2008). En el caso de filete de cerdo a la plancha mantenido a una temperatura de 55°C *E.coli* disminuye 1 log/g cada 9 minutos, y *Listeria monocytogenes* cada 16 minutos. En el caso de la rosada a la plancha, a 58°C, *Listeria monocytogenes* tardaría 8 minutos en disminuir 1 log/g y *E.coli* 3 minutos. Esto nos dice que si hubiese una concentración no detectada inicialmente, la concentración de estos dos microorganismos disminuiría a las temperaturas consideradas.

### **Conclusiones**

La gran ventaja observada de la aplicación de la microbiología predictiva es la visión particular del comportamiento de cada microorganismo sin necesidad de experimentación alguna, obteniendo datos cuantitativos que pueden ayudar a demostrar la seguridad de un producto y al mismo tiempo marcando medidas de gestión como el tiempo máximo que un alimento puede permanecer preparado antes de ser servido, aspecto crucial cuando el producto va dirigido a una población de riesgo. Así también, nos ayuda a conocer la repercusión de la pérdida de la temperatura establecida (65°C), que en el caso concreto de filete de cerdo a la plancha, *Listeria monocytogenes* y *E.coli* a 58°C disminuye su número en las condiciones estudiadas por lo que no constituyen un riesgo de crecimiento de estos microorganismo patógenos.

Durante el presente estudio se ha encontrado la dificultad de que los rangos de temperatura considerados en los modelos de los programas mencionados no incluyen todas las temperaturas que se precisaban en este estudio, concluyendo la necesidad de mayor desarrollo de modelos y su incorporación a éstos u otros programas de fácil uso.

### **Referencias Bibliográficas**

RD 3484/2000 de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. BOE 12 Enero 2001; 11:1435-1441.

Valero, A., Caracuel, A.M., García-Gimeno, R.M. y Jiménez-Martínez, S. (2008). Influencia de la temperatura y tiempo de servicio sobre el riesgo microbiológico de comidas preparadas. 3er Congreso Internacional de Autocontrol y Seguridad Alimentaria, Córdoba, 23-25 de abril de 2008.

## DISEÑO DE UN MODELO DE VALORACIÓN DEL RIESGO DE LISTERIOSIS POR CONSUMO DE SALMÓN AHUMADO

Garrido V.<sup>1</sup>, García-Jalón I.<sup>1</sup>, Vitas AI.<sup>1</sup>, Moez S.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Département de Production Animale et de Santé Publique, Epidemiologie et Analyse de Risques, École Nationale Veterinaire d'Alfort. 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704, Maison Alfort, France

### - Introducción y Objetivos

La valoración microbiológica del riesgo es el proceso científico que determina la relación entre la exposición a un determinado patógeno en un alimento con la probabilidad de que ocurra un efecto adverso en la salud. Las tres primeras etapas de este proceso (identificación del peligro, valoración de la exposición y caracterización del peligro) se centran en la obtención de datos epidemiológicos, incidencia y concentración del patógeno en el momento del consumo, frecuencias de consumo y relación dosis-respuesta. En la última etapa (caracterización del riesgo) se integran todos estos valores en un modelo que nos predice el riesgo asociado al consumo de dicho producto.

El objetivo fue crear un modelo cuantitativo del riesgo de listeriosis por el consumo de salmón ahumado. La listeriosis es una grave enfermedad (septicemias, meningitis, encefalitis, abortos) producida por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. El salmón ahumado ha sido elegido como producto diana debido a la alta incidencia del patógeno descrita en este producto (9), el almacenamiento en refrigeración que permite el crecimiento de este microorganismo psicrotrofo y el consumo directo del producto sin ningún tratamiento previo bactericida.

### - Material y Métodos

Los datos utilizados en el modelo de riesgo han sido recabados por nuestro grupo de investigación entre los años 2003 y 2005 en diferentes ámbitos, desde la compra del producto hasta su consumo.

Para la valoración de la exposición fue necesaria la obtención de los datos de prevalencia del patógeno en diferentes marcas y lotes de salmón ahumado (1, 4), así como de la concentración (UFC/g)(2, 3). Además se llevó a cabo un estudio de la temperatura de los refrigeradores domésticos, para introducir la variabilidad en el modelo. El efecto de la temperatura sobre la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{opt}$ ) fue calculado mediante el modelo cardinal (5). Por último, los hábitos de consumo de la población Navarra se evaluaron mediante una encuesta validada (n=2000), obteniéndose datos de número de consumidores, tamaño de ración (g), tiempo de almacenamiento y frecuencia de consumo en un año.

Para la caracterización del peligro se utilizó el modelo "Single hit". Los valores de R descritos por (8) se combinaron con los datos de población Navarra distinguiendo entre grupos susceptibles (ancianos, embarazadas, transplantados, cáncer, etc) y población general. Se utilizó el software Excel @Risk 4.5 (Palisade, Newfield, USA), estimando el riesgo utilizando las simulaciones de Monte Carlo (100.000 interacciones) con un muestreo al azar ("Latin Hypercube"). Finalmente, se crearon varios escenarios para valorar medidas que permitan disminuir el riesgo.

### - Resultados y Discusión

Se observó una incidencia media del patógeno en salmón ahumado del 10,7%, aunque una de las marcas presentó una contaminación del 60% de los lotes analizados. Asumimos una distribución normal para los recuentos (oscilando entre 10-590 UFC/g). Las raciones y frecuencias de consumo fueron variables, por lo que se utilizó una distribución discreta. El 85% de la población encuestada consumió raciones de entre 15 y 82 g, entre 1 y 49 veces al año (77%). El tiempo de refrigeración y la temperatura se ajustaron a una distribución exponencial y normal respectivamente.

El modelo inicial estimó una probabilidad marginal de enfermar por consumo de salmón ahumado de  $5,6 \times 10^{-4}$ , lo que supone una estimación anual de 119 casos. Sin embargo, la disminución del tiempo de almacenamiento a 7 días estimó una probabilidad de  $7,1 \times 10^{-6}$ , con una reducción del número de casos frente al modelo inicial del 99%. Este primer modelo requiere diversas mejoras, ya que no fueron introducidas las diferencias encontradas en el consumo de salmón en función del sexo y grupos de edad. Además se asumió que todas las marcas de salmón fueron consumidas de igual forma, por lo que serían necesarios estudios de mercado para comprobar el grado de consumo de las marcas altamente contaminadas.

#### **- Conclusiones**

Aunque numerosos países europeos utilizan la metodología de la valoración de riesgos para conocer y gestionar los peligros microbiológicos (7, 8), en España está siendo desarrollada por pocos grupos de investigación (6). Nuestro estudio del riesgo de listeriosis ha sido una primera aproximación a esta valiosa herramienta proporcionando las claves para gestionar esta enfermedad de transmisión alimentaria. Son necesarios seguimientos continuados de la incidencia del patógeno en alimentos, más datos sobre el consumo de alimentos de riesgo y campañas de prevención e información que recojan las medidas evaluadas en los escenarios para la reducción del riesgo.

#### **- Referencias Bibliográficas**

1. Anonymous. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method - Amendment 1: Modification of the isolation media of the haemolysis test and inclusion of precision data, International Standard ISO 11290-1:1996/Amd 1: 2005. International Organization for Standardization, Geneva.
2. Anonymous. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method - Amendment 1: Modification of the enumeration method. International Standard ISO 11290- 2: 1998/ Amd 1: 2005. International Organization for Standardization, Geneva.
3. Anonymous. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method: ISO 11290-2. International Organization for Standardization, Geneva.
4. Anonymous. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1. International Organization for Standardization, Geneva.
5. Augustin, J., V. Carlier. 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 56:29-51.
6. Perez-Rodriguez, F., E. C. Todd, A. Valero, E. Carrasco, R. M. Garcia, and G. Zurera. 2006. Linking quantitative exposure assessment and risk management using the food safety objective concept: an example with *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios. *J Food Prot* 69:2384-94.
7. Rocourt, J., P. BenEmbarek, H. Toyofuku, and J. Schlundt. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35:263-7.
8. Sanaa, M., L. Coroller, and O. Cerf. 2004. Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. *Risk Anal* 24:389-99.
9. Vitas AI, V. Aguado, and I. and Garcia-Jalon. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int J Food Microbiol* 349.

## DETECCIÓN ESPECÍFICA DE *ASPERGILLUS ELEGANS* MEDIANTE PCR

**Gil-Serna J.<sup>1</sup>, González-Salgado A.<sup>2</sup>, Vázquez C.<sup>1</sup>, González-Jaén M.T.<sup>2</sup> y Patiño B.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología III, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. José Antonio Novais 2, 28040, Madrid, jgilsern@bio.ucm.es.

<sup>2</sup>Dpto. de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Novais 2, 28040, Madrid.

### Introducción y Objetivos

*Aspergillus* es un género complejo que comprende más de 100 especies, por lo que la identificación basada únicamente en caracteres morfológicos supone en muchas ocasiones importantes dificultades que requieren el asesoramiento de expertos y una inversión muy importante de esfuerzo y tiempo.

La clasificación precisa de las cepas es crucial, ya que las diferentes especies tienen perfiles toxigénicos distintos. En el caso de la ocratoxina A (OTA), varias son las especies capaces de producir la micotoxina, destacando *A. ochraceus*, primera especie productora descrita. La OTA es una de las micotoxinas más importantes debido a su alta toxicidad tanto en animales como en humanos al tener propiedades nefrotóxicas, carcinogénicas y teratogénicas. Está ampliamente distribuida en una gran variedad de productos agrícolas y actualmente existe regulación de la Unión Europea sobre los niveles máximos permitidos en alimentos destinados para el consumo humano.

La detección temprana de especies productoras de OTA es esencial para prevenir que esta micotoxina entre en la cadena alimentaria. De esta manera, se evitan las pérdidas económicas asociadas a las partidas contaminadas al no existir procesos que permitan su eliminación de los alimentos o de las materias primas. Las técnicas moleculares son rápidas, sensibles y específicas y permiten no sólo la identificación precisa de la especie fúngica, sino que también dan información sobre la variabilidad a nivel intraespecífico y permiten su seguimiento epidemiológico.

*Aspergillus elegans* está incluida dentro de la sección *Circumdati*. Morfológicamente esta especie es muy similar a *A. ochraceus*, por lo que para distinguirlos es imprescindible la utilización de métodos moleculares de identificación (Varga et al., 2000). *A. elegans* se ha encontrado en varias ocasiones creciendo sobre distintos sustratos como el café o algunos frutos, pero sólo algunos de los aislamientos de café verde han sido descritos como productores de OTA (Tsubouchi et al., 1984; Batista et al., 2003).

El objetivo del presente trabajo fue el diseño de un método de PCR convencional para la detección e identificación de *A. elegans* basado en la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del DNA ribosómico.

### Material y Métodos

Se ha obtenido la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 del DNA ribosómico de distintas cepas de *A. elegans* y de otras especies y géneros relacionados o que habitualmente contaminan los mismos productos. Estas secuencias se han analizado junto con otras obtenidas de las bases de datos con el objetivo de identificar regiones adecuadas para el diseño de cebadores específicos para *A. elegans*. El protocolo de PCR optimizado comprende 25 ciclos de amplificación y una temperatura de hibridación de 64°C para la pareja de cebadores ELEG1 y ELEG2.

La especificidad del ensayo diseñado se probó con DNA genómico de distintas cepas de *A. elegans* (tanto de colecciones de cultivo como aisladas de alimentos) y de otras especies de hongos que suelen contaminar los mismos productos o que son filogenéticamente próximas (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. flavus* y varias especies de los géneros *Penicillium* y *Fusarium*).

### Resultados y Discusión

En todas las cepas de *A. elegans* se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 450 pares de bases al visualizarlo en un gel de agarosa (2%). Por el contrario, en ninguna de las

otras especies se produjo amplificación con los cebadores específicos para *A. elegans*. En la figura 1 se muestra un ejemplo del ensayo con algunas de las cepas utilizadas en el estudio.

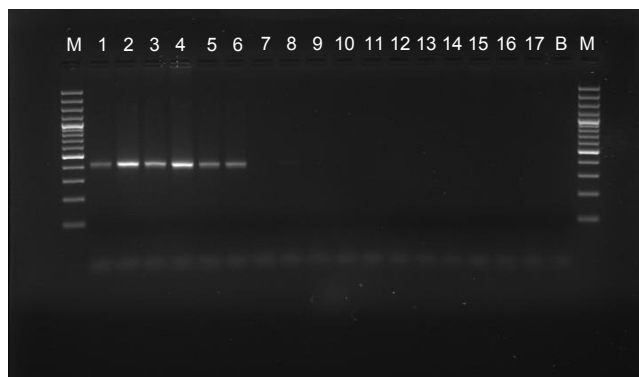


Figura 1. Ensayo para determinar la especificidad de la pareja de cebadores ELEG1/ELEG2. El producto de amplificación de 450 pb se observa en las cepas de *A. elegans* pero no en las otras especies.

Orden: Marcador escalera (100bp), *A. elegans* CBS 102.14, *A. elegans* CBS 310.80, *A. elegans* CBS 614.78, *A. elegans* CBS 615.78, *A. elegans* 345568, *A. elegans* 345571, *A. ochraceus* ALD, *A. ochraceus* ALH, *A. ochraceus* CCT 6795, *A. ochraceus* CCT 6825, *A. niger* CECT 2091, *A. tubingensis* Bo66, *A. japonicus* ITEM 4687, *A. carbonarius* 325, *A. flavus* ITEM 4591, *Penicillium corylophilum* CECT 2270, *Fusarium verticillioides* FvMM1-2, Blanco, Marcador escalera (100bp).

La PCR convencional ya se ha aplicado con éxito en otras ocasiones para detectar otras especies del género *Aspergillus* (Patiño et al., 2005; González-Salgado et al., 2005) aunque ésta es la primera vez que se diseña un método molecular para la detección específica de *A. elegans*. El diseño de los cebadores basado en la región ITS hace que el ensayo sea muy sensible ya que estas secuencias se encuentran en varias copias en el genoma. La variabilidad que presenta dicha región ha sido suficiente para el diseño de un ensayo rápido, capaz de discriminar entre dos especies estrechamente relacionadas como *A. elegans* y *A. ochraceus*, sin tener que recurrir a los complejos métodos de identificación tradicional.

### Conclusiones

Se ha desarrollado un ensayo sensible, rápido y específico para identificar *A. elegans*, una especie productora de OTA que puede estar presente en distintos alimentos. Su aplicación permitirá predecir la posible contaminación con OTA de los alimentos donde esta especie haya sido detectada.

Este trabajo está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante el proyecto AGL 2007-66416-C05-02/ALI y por la Universidad Complutense y la Comunidad de Madrid mediante el proyecto CCG07-UCM/AGR-2612.

### Referencias Bibliográficas

Batista LR, Chalfoun SM, Prado G, Schwan RF y Wheals AE, 2003. *Toxicogenic fungi associated with processed (green) coffee beans (Coffea Arabica L.)*. International Journal of Food Microbiology, **85**, 293-300.

González-Salgado A, Patiño B, Vázquez C y González-Jaén MT, 2005. *Discrimination of Aspergillus niger and other Aspergillus species belonging to section Nigri by PCR assays*. FEMS Microbiology Letters, **245**, 353-361.

Patiño B, González-Salgado A, González-Jaén MT y Vázquez C, 2005. *PCR detection assays for the ochratoxin-producing Aspergillus carbonarius and Aspergillus ochraceus species*. International Journal of Food Microbiology, **104**, 207-214.

Tsubouchi HK, Yamamoto K, Hisada K y Sakabe Y, 1984. *A survey of occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans*. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicologists, **19**, 14-21.

Varga J, Tóth B, Rigó K, Téren J, Hoekstra RF y Kozakiewicz Z, 2000. *Phylogenetic analysis of Aspergillus section Circumdati based on sequences of the Internal Transcribed Spacer regions and the 5.8 S rRNA gene*. Fungal Genetics and Biology, **30**, 71-80.

## DETECCIÓN DE CEPAS TOXIGÉNICAS DE *ASPERGILLUS* Y *FUSARIUM* EN CEREALES ESPAÑOLES

González-Salgado, A.<sup>1</sup>, Marín, P.<sup>1</sup>, Estéban, M.<sup>2</sup>, Fernández, C.<sup>1</sup>, Patiño, B.<sup>2</sup>, Gil, J.<sup>2</sup>, Vázquez, C.<sup>2</sup> y González-Jaén, MT.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.  
amagonza@bio.ucm.es

<sup>2</sup>Dpto. de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

### Introducción y Objetivos

Los hongos productores de micotoxinas se encuentran habitualmente como saprófitos o como parásitos de vegetales incluyendo semillas y frutos. Se ha estimado que un 25% de los cultivos destinados a la elaboración de alimentos contienen cantidades detectables de micotoxinas (Charmley *et al.*, 1995). El hecho de que muchos de los productos susceptibles de contaminación sean alimentos habituales de la dieta humana, como los cereales, aumenta la importancia de las micotoxinas convirtiéndose además en un problema de salud pública. Todo ello ha llevado consigo el establecimiento de límites y normativas, cada vez más estrictos, y que afectan a numerosos cultivos y alimentos y, en particular, a los cereales y productos básicos de la dieta. Los principales hongos productores de toxinas pertenecen principalmente a tres géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Sweeney y Dobson, 1999). Generalmente, cuando se hace referencia a la población fúngica asociada a cereales, se suele diferenciar entre hongos fitopatógenos (pre cosecha), capaces de infectar la planta y producir enfermedades en ella, y hongos saprofitos (post cosecha), que proliferan en el cereal almacenado. En el primer grupo se incluirían las especies del género *Fusarium* y en el segundo las especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Entre las toxinas que produce el género *Fusarium* destacan los tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, T2, HT2), las fumonisinas y zearalenona. El género *Aspergillus* produce dos tipos de toxinas fundamentalmente, las aflatoxinas y las ocratoxinas.

El objetivo de este trabajo es la detección molecular de especies de *Fusarium* y *Aspergillus* productoras de micotoxinas, para así poder prever el perfil toxicogénico más probable en las muestras analizadas.

### Material y Métodos

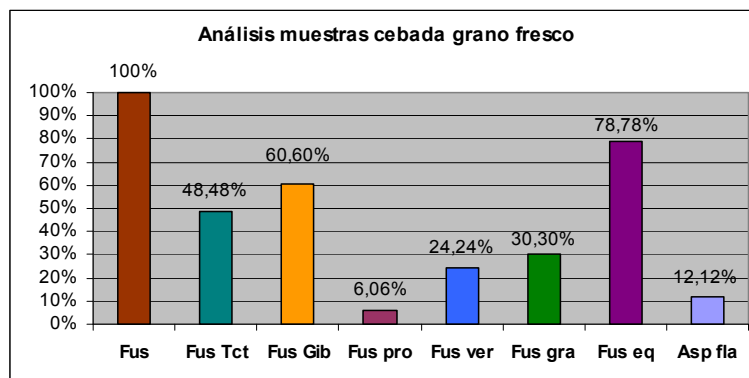
Se analizaron un total de 52 muestras de cereales procedentes de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Valladolid y Burgos), y Castilla La Mancha (Albacete). Las especies de cereales analizadas fueron cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo blando (*Triticum aestivum* L.). Las muestras se recogieron en 2006 en dos etapas: en campo (33 muestras de cebada y 7 de trigo) y una vez cosechado y seco (12 muestras).

Para realizar el diagnóstico molecular, de cada muestra se tomaron 4 gramos, que se incubaron en matraces con medio líquido Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% durante 5 días a 28°C en agitación. Tras la extracción de DNA genómico de estas muestras, se llevó a cabo un diagnóstico molecular mediante PCR para la identificación de las especies. Los cebadores específicos fueron diseñados a partir del análisis de secuencias de las regiones ITS e IGS del rDNA, cuyo carácter multicopia aumenta la sensibilidad con respecto a las secuencias de copia única. Las especies analizadas en pre cosecha fueron dentro del género *Fusarium*, *Fusarium verticillioides* (Patiño *et al.*, 2004), *F. proliferatum* (Jurado *et al.*, 2006), *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* (Jurado *et al.*, 2005) y dentro del género *Aspergillus*, *A. flavus* (González-Salgado *et al.*, 2008), *A. ochraceus*, *A. carbonarius* (Patiño *et al.*, 2005) agregado *A. niger* y *A. japonicus* (González-Salgado *et al.*, 2005). Además se utilizaron inicialmente los ensayos generales para detectar *Fusarium*, especies productoras de tricotecenos y especies de complejo *Gibberella* (Jurado *et al.*, 2006). En post cosecha sólo se analizaron las diferentes especies de *Aspergillus*.

### Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos mediante el análisis por PCR para 33 muestras de cebada de grano fresco se muestran en la siguiente figura. Todas las muestras fueron positivas a *Fusarium* (Fus). De

las especies toxigénicas de este género, cabe destacar *F. equiseti* y las englobadas dentro del grupo productores de tricotecenos. En este grupo se incluiría también *F. graminearum*. Sin embargo, otras de las especies importantes incluidas en ese grupo, como *F. culmorum*, *F. poae* o *F. sporotrichoides*, no se detectaron. Aunque las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum* suelen asociarse preferentemente con el maíz, se ha observado su presencia en los cereales analizados. La presencia de estas especies también se había observado en estudios previos (Jurado *et al.*, 2006b) por lo que los resultados observados apuntarían a una distribución significativa de estas especies en España y una posible contaminación por fumonisinas. Los análisis para el género *Aspergillus* indican, como podría esperarse, una contaminación leve de *A. flavus* (Asp fla), mientras que no se detectaron *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, especies del agregado *A. niger* ni *A. japonicus*.



En las muestras de trigo blando en semilla fresca que se disponía, se detectó contaminación por especies productoras de fumonisinas del complejo *Gibberella* (*Fusarium verticillioides*), y especies productoras de tricotecenos (*F. equiseti*). En estas semillas, a diferencia de las de cebada, no se detectó contaminación por *F. graminearum* ni *F. proliferatum*. En los análisis para especies de *Aspergillus*, 1 muestra resultó positiva para *A. flavus*.

En cuanto a las semillas de almacenaje o grano seco, únicamente se llevaron a cabo los ensayos para la detección de especies de *Aspergillus*, al ser éste un género propio de postcosecha. En cebada se detectó *A. flavus*, *A. niger* y *A. carbonarius*, mientras que en trigo hubo muestras positivas para *A. flavus* y *A. niger*.

### Conclusiones

- El protocolo descrito basado en técnicas moleculares (PCR), es adecuado para la detección de especies productoras de micotoxinas en cereales. Supone un gran ahorro de tiempo, ya que permite manejar un gran número de muestras a la vez y evita los cambios de micoflora que se producen al almacenar las muestras antes de analizarlas.
- En cereal fresco podemos predecir riesgo de contaminación con tricotecenos (debido a *F. equiseti* y *F. graminearum*) y fumonisinas (especialmente debidas a *F. verticillioides*).
- En cereal seco podemos predecir riesgo de contaminación con aflatoxinas (*A. flavus*) y riesgo moderado de OTA (*A. niger* y *A. carbonarius*).

### Referencias Bibliográficas

- Charmley *et al.*, 1995. *Journal of Dairy Science*, 76 (11): 3580-3587.  
 González-Salgado *et al.*, 2005. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 353-361.  
 González-Salgado *et al.*, 2008. *Food Additives and Contaminants*, 25 (6): 758-764.  
 Jurado *et al.*, 2005. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 562-568.  
 Jurado *et al.*, 2006a. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:681-689.  
 Jurado *et al.*, 2006b. *Mycotoxin Research*, 22 (2): 87-91.  
 Patiño *et al.*, 2004. *Journal of Food protection*, 67: 1278-1283.  
 Patiño *et al.*, 2005. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 207-214.  
 Sweeney y Dobson, 1999. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por los proyectos AGL2007-66416-C05-02 y CCG07-UCM/AGR-2612.

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MANIPULADORES DEL BANCO DE LECHE HUMANA DE BLUMENAU – SANTA CATARINA (BRASIL)

Reiter M. G.<sup>1</sup>, Petzold S.<sup>2</sup>, Arcoverde T. L. y Jordano R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología, Campus III. Rua São Paulo, 2171, 89012-001 – Dpto. de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais de la Universidade Regional de Blumenau, SC- Brasil  
<sup>2</sup>Banco de Leche Humana de Blumenau y Universidade Regional de Blumenau, SC-Brasil  
<sup>3</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Grupo Microbiología de los Alimentos), Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14071Córdoba (Spain), rjordano@uco.es

**- Introducción y Objetivos**

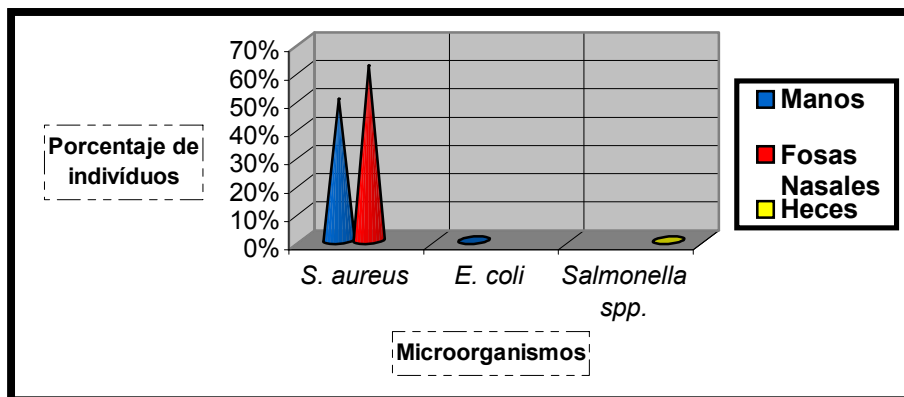
Actualmente, el interés por la lactancia materna ha aumentado de forma considerable (5). De hecho, son habituales campañas de fomento de dicha forma de alimentación por parte de gobiernos y entidades no gubernamentales, cuyo objetivo primordial es fomentar una mayor concienciación sobre su importancia. En Brasil, el incremento de la lactancia materna ha tenido su reflejo en la creación de bancos de leche humana, establecimientos que reciben leche donada por nodrizas y la destinan a los recién nacidos que no pueden ser amamantados por la propia madre. El objetivo del presente trabajo es investigar la presencia de *Staphylococcus aureus* en fosas nasales y manos; *Salmonella* spp. en heces; y *Escherichia coli* en manos como un indicador de higiene, entre manipuladores del Banco de Leche Humana de Blumenau, Estado de Santa Catarina – SC (Brasil).

**- Material y Métodos**

Los análisis se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología de la American Public Health Association (APHA) (7) y las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (3). Las muestras se tomaron de seis manipuladores del Banco de Leche Humana de Blumenau, SC (Brasil). De cada manipulador se recogieron tres muestras a lo largo de varios meses. En el caso de *Salmonella* spp. las muestras de heces fueron recogidas en frascos estériles de único uso, fuera del horario laboral de los manipuladores. Las muestras fueron diluidas en agua de peptona al 0,1% estéril que posteriormente fue incubada a 36±1°C, 24 horas (pre-enriquecimiento). En la investigación de *S. aureus* las muestras se tomaron con torundas a partir de las fosas nasales de los manipuladores. A continuación, las torundas fueron depositadas en tubos de ensayo estériles que contenían 9 mL de agua de peptona estéril al 0,1%. Para detección de *E. coli* y *S. aureus*, a partir de las muestras recogidas de las manos de los manipuladores, se utilizaron bolsas estériles conteniendo 225 mL de agua de peptona al 0,1% estéril, en las que los manipuladores introdujeron las manos masajeándolas durante aproximadamente un minuto. La toma de las muestras de manos y fosas nasales se llevó a cabo en la jornada laboral de los manipuladores. Todas las muestras, tras la recogida, fueron transportadas en condiciones isotérmicas y de forma inmediata al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Regional de Blumenau para su análisis en el plazo máximo de una hora.

**- Resultados y Discusión**

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura siguiente:



Los resultados de la presencia de *E. coli* en manos de los manipuladores son similares a los obtenidos por White *et. al.* (8). Por el contrario, Sousa y Campos (6) detectaron coliformes fecales en las manos de dos de los tres individuos controlados, en tanto que no verificaron *S. aureus*. Raddi, Leche y Mendoça (4), sí detectaron *S. aureus* en las manos del 41,7% de los manipuladores de alimentos investigados. En la investigación de portadores nasales de *S. aureus*, dichos autores (4), detectaron un 50% de casos positivos en el grupo control estudiado, mientras que entre manipuladores el porcentaje fue del 41,7%. Andrade y Zelante (1), investigaron la incidencia de portadores de *S. aureus* en manos, heces, lengua y fosas nasales de 112 manipuladores de alimentos. De los 40 portadores detectados, el 35,7%, 20 (50%) eran nasales. Teniendo en cuenta que el principal reservorio de *S. aureus* en el hombre son las fosas nasales, y que estos pueden diseminarse a través de las manos y llegar a utensilios y alimentos, los datos obtenidos en el presente trabajo (61,7% de portadores nasales y 50% de presencia en manos), evidencian que existe un posible riesgo de contaminación de la leche. Finalmente, el resultado de la investigación de *Salmonella* spp. en las heces de los manipuladores, supone una garantía para la calidad de la leche proporcionada a los recién nacidos. Por el contrario, Guimarães *et. al.* (2) comprobaron que de los 56 manipuladores de alimentos investigados en tres cocinas hospitalarias e industriales de Blumenau, SC (Brasil), siete (12,5%) presentaron coprocultivos positivos para *Salmonella*.

#### **- Conclusiones**

Se sugiere la conveniencia de tomar medidas preventivas que garanticen la calidad de la leche humana, procedente de los bancos de leche, destinada a los recién nacidos y prematuros. Entre otras acciones, se recomienda el control periódico de microorganismos patógenos que pueden estar presentes en la leche manipulada, y la evaluación de las condiciones de salud de los manipuladores de la misma. Finalmente, un estudio completo de la calidad de la leche suministrada a los recién nacidos por el Banco de Leche Humana de Blumenau, SC (Brasil), requiere que la investigación se haga extensiva a los manipuladores de los dispensarios de leche de los hospitales, concluyendo así el ciclo que la leche donada recorre desde las nodrizas hasta los recién nacidos.

#### **- Agradecimientos**

El presente trabajo forma parte de un proyecto financiado por UNESCO, FAPESC (Fundación de Apoio a Pesquisa do Estado de Santa Catarina) y Ministerio de Salud de Brasil.

#### **- Referencias Bibliográficas**

1. Andrade G. P. de y Zelante F. 1989. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos en las manos, boca y heces en portadores asintomáticos. Rev. Salud Pública, 23(4): 277-284.
2. Guimarães C. L., Fagundes F. S., Buratto A., Sansão C., Kimura R., Taneja A. y Reiter M. G. R.1999. Portadores de *Salmonella* spp. en manipuladores de alimentos en Blumenau, SC. VIII Encontro Estadual de Farmacêuticos y Bioquímicos, VI Congresso Estadual de Farmacêuticos y Bioquímicos. Florianópolis: SINDFAR, p. 77.
3. NCCLS. 2004. Quality control for commercially prepared microbiological culture media. 3ª ed. Approved Standard, M22-A3. Wayne (PA).
4. Raddi M. S. G., Leche C. Q. F. y Mendoça C. P. 1988. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. Rev. Salud Pública, 22(1): 36-40.
5. Rea M. F. 2003. Reflexões sobre a amamentación no Brasil: de como passamos a 10 meses de duración. Rio de Janeiro: Cad. Salud Pública, 19: 37-45.
6. Sousa C. L. y Campos G. D. 2003. Condiciones higiênico-sanitárias de uma dieta hospitalar. Campinas: Rev. Nutrición, 16(1): 127-134.
7. Vanderzant C. y Splittstoesser D. F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. 3ª ed. Washington (DC).
8. White H. J., Vilela D. C., Krepp A. C. M. y Goulart R. M. Q. C. 2005. Análise microbiológica de las manos de los manipuladores envolvidos no preparo de dietas enterais del hospital escola de Itajubá/MG. Rev. Nutrición, 70: 46-49.

**PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y ANALISIS SALMONELLA DENTRO DEL SISTEMA DE AUTOCONTROL DE UN MATADERO DE PORCINO**

***Ibáñez M.<sup>1</sup>, Miras J.<sup>2</sup>, Martínez J.<sup>2</sup>, Manzano J.<sup>3</sup>, Carrillo J.<sup>3</sup> y Cayuela A.<sup>3</sup>***

<sup>1</sup>Area de Gestión Sanitaria Sur de Granada., [mariam.ibanez.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:mariam.ibanez.sspa@juntadeandalucia.es)

<sup>2</sup>Laboratorio Alve-Gesima, C.B.

<sup>3</sup>Area de Gestión Sanitaria Norte de Almería

**- Introducción y Objetivos**

El Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril, entre las medidas de higiene específicas establece la obligación de los operadores económicos de establecer sistemas de muestreo y análisis. Por otro lado, impone también la obligación de aplicar y mantener un procedimiento basado en los principios del APPCC.

El Reglamento CE nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, (modificado por Reglamento CE nº 1441/2007) establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los operadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contenidas en el Reglamento CE 852/2004.

Objetivo: Implantar un protocolo de toma de muestras y análisis de salmonelas en canales de porcino dentro del sistema de autocontrol de un matadero, utilizando el método de toma de muestras no destructivo con esponja, según norma ISO-17604, y análisis de *Salmonella* conforme a la norma EN-ISO-6579.

**- Material y Métodos**

Material para toma de muestras: diluyente de sal de peptona estéril, en frascos con 25 ml; esponja estéril (sin sustancias inhibitorias), en una bolsa de plástico estéril; plantilla estéril cuadrada, con cavidad interna de área 100 cm<sup>2</sup> (10 cm × 10 cm); guantes estériles; y nevera portátil.

Método de toma de muestras: Se localizan los puntos de muestreo en la canal, teniendo en cuenta las zonas donde sea más probable encontrar contaminación que en el matadero de referencia se consideró vientre, jamón, quijada, lomo; tomando las muestras inmediatamente antes del enfriamiento de la canal. El área total de muestreo tendrá, como mínimo, 400 cm<sup>2</sup>. Se abre la bolsa que contiene la esponja estéril y verter parte del diluyente de sal de peptona para empapar la esponja, sin que el exceso de líquido sea visible. Masajear la esponja desde fuera de la bolsa para que se empape totalmente. Colocarse un par de guantes estériles y extraer cuidadosamente la esponja de la bolsa. Colocar la plantilla sobre un área de la canal elegida para el muestreo. Pasar la esponja sobre las áreas elegidas frotando dentro del marco, 10 veces en sentido vertical y 10 veces en sentido horizontal. Después arrastrar, colocar la esponja de nuevo en la bolsa de esponjas para muestras y añadir más diluyente a la bolsa de muestras para completar un total de 25 ml. Se juntan las muestras de las diferentes localizaciones de muestreo de la canal. Cerrar la bolsa e introducir en la nevera portátil con acumuladores de frío o hielo triturado, impidiendo que las muestras se congelen o entren en contacto con los bloques congelados de hielo. Transportar al laboratorio y tratar las muestras en el plazo de una hora o almacenar a 2°C +/- 2°C durante un máximo de 24 horas.

Material para análisis laboratorial: Autoclave; incubadoras a (36± 2)°C y (41,5±1)°C; Baño de agua capaz de mantener una temperatura de 47 °C; probetas estériles; asas estéril, pipetas estériles de 1y 10 ml; tubo de hemólisis; placas de petri, bolsas de polietileno estériles; triturador de paletas; y medios de cultivo (Agua de peptona tamponada, Caldo Muller-Kauffman tetracionato, Caldo Rappaport-Vassiliadis, Agar SM ID, Agar XLD, Medio de Kligler, Agar Lisina-Hierro, Agar PCA, Medio urea-indol, API 20E, Solución de percloruro férrico al 30% diluida a 1/3, Reactivo de Kovacs, Discos de ONPG, Reactivo de la oxidasa, Antisueros Polivalentes).

Método de análisis:

1.- Preenriquecimiento: Se añade agua de peptona en cantidad necesaria para obtener una dilución 1/10. Colocar la bolsa en el triturador de paletas y hacer funcionar el aparato durante 60 segundos. Incubar a  $36 \pm 2$  °C durante  $18 \pm 2$  horas como máximo.

2.- Enriquecimiento: A partir del caldo de preenriquecimiento obtenido, sembrar 0,1 ml a partir del caldo de preenriquecimiento en un tubo con 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis. Incubar a  $(41,5 \pm 1)$  °C, durante  $(24 \pm 3)$  horas. Sembrar 1,0 ml en caldo tetracionato. Incubar a  $(36 \pm 2)$  °C, durante  $(24 \pm 3)$  horas.

3.- Aislamiento: A partir de los medios de enriquecimiento efectuar siembras con asa de platino sobre las superficies de placas de XLD y SM ID. Incubar a  $(36 \pm 2)$  °C, durante  $(24 \pm 3)$  horas.

4.- Lectura e identificación: Examinar las placas tan pronto como se saquen de la estufa considerando como colonias sospechosas las colonias de color rosa índigo, de forma redondeada, de las placas con Agar SM ID, y las colonias rojas con o sin centro negro de las placas con Agar XLD. Elegir al menos un colonia sospechosa de cada uno de los medios de aislamiento y como mucho 4 colonias si la primera es negativa. Se realizan pruebas bioquímicas para la confirmación y si obtenemos pruebas positivas se realizará pruebas para confirmación serológica.

### **- Resultados y Discusión**

Los resultados serían satisfactorios si obtenemos ausencia de *Salmonella* en la zona examinada por canal. En caso de obtener resultados insatisfactorios se procederá a establecer un protocolo de mejora en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso.

Frente a los principales inconvenientes de los métodos de toma de muestras destructivos (obtención de canales comercialmente inaceptables y la necesidad de muestrear áreas pequeñas, que pueden dar lugar a errores en los resultados cuando la presencia del germen está distribuida heterogéneamente o la presencia de salmonela es escasa), las técnicas no destructivas permiten el examen de áreas mayores

### **- Conclusiones**

El muestreo microbiológico puede ser utilizado como la parte del control de procesos y para verificación del sistema Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos, así como su empleo en programas de vigilancia sobre el predominio de microorganismos patógenos.

### **- Referencias Bibliográficas**

Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril,

El Reglamento CE nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, modificado por Reglamento CE nº 1441/2007

Norma ISO-17604

Norma EN-ISO-6579.

**PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y RECuento DE COLONIAS AEROBIAS DENTRO DEL SISTEMA DE AUTOCONTROL DE UN MATADERO DE PORCINO**

**Martín M A<sup>1</sup>, Manzano J.<sup>1</sup>; Cayuela A.<sup>1</sup>; Ibáñez M.<sup>2</sup>; Miras J.<sup>3</sup>,y Martínez J.<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Area de Gestión Sanitaria Norte de Almería., [mangeles.martin.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:mangeles.martin.sspa@juntadeandalucia.es)

<sup>2</sup>Laboratorio Alve-Gesima, C.B.

<sup>3</sup>Area de Gestión Sanitaria Sur de Granada

**- Introducción y Objetivo**

El Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril, entre las medidas de higiene específicas establece la obligación de los operadores económicos de establecer sistemas de muestreo y análisis. Por otro lado, impone también la obligación de aplicar y mantener un procedimiento basado en los principios del APPCC.

El Reglamento CE nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, (modificado por Reglamento CE nº 1441/2007) establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los operadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contenidas en el Reglamento CE 852/2004.

Objetivo: Implantar un protocolo de toma de muestras y análisis de aerobias mesófilas en canales de porcino dentro del sistema de autocontrol de un matadero, utilizando el método de toma de muestras destructivo de escisión con plantilla, según norma ISO-17604, y recuento de colonias aerobias conforme a la norma EN-ISO-4833.

**- Material y Métodos**

Material: Norma ISO-17604 para el método de toma de muestras destructivo de escisión con plantilla y norma EN-ISO-4833 para el recuento de colonias aerobias.

Material para toma de muestras: bisturí estéril, pinzas estériles, plantilla estéril de 5 cm<sup>2</sup>; bolsas de plástico estériles para homogeneización tipo peristáltico, guantes estériles; y nevera portátil.

Método de toma de muestras: Se eligen cinco canales aleatoriamente. Se localizan los 4 puntos de muestreo en cada una de las canales elegidas, teniendo en cuenta las zonas donde sea más probable encontrar contaminación que en el matadero de referencia se consideró vientre, jamón, quijada, lomo; tomando las muestras inmediatamente antes del enfriamiento de la canal. El área total de muestreo tendrá, como mínimo, 20 cm<sup>2</sup>. Se cortan las muestras de aproximadamente 2 mm de grosor, según el trazado de las plantillas estériles, usando bisturí y pinzas estériles y se juntan las muestras de las diferentes localizaciones de muestreo de la canal en la bolsa de plástico. Cerrar la bolsa e introducir en la nevera portátil con acumuladores de frío o hielo triturado, impidiendo que las muestras se congelen o entren en contacto con los bloques congelados de hielo. Transportar al laboratorio y tratar las muestras en el plazo de una hora o almacenar a 2°C +/- 2°C durante un máximo de 24 horas.

Material para análisis laboratorial: Autoclave; incubadoras a 36± 2 °C; Baño de agua capaz de mantener una temperatura de 47 °C; probetas estériles; asas estéril, pipetas estériles; placas de petri, bolsas de polietileno estériles; triturador de paletas; medios de cultivo (Agar PCA); Agua de triptona.

Método de análisis:

1- Las muestras se homogenizan durante dos minutos en una bolsa con 100 ml de líquido de dilución (10<sup>0</sup>)

2- A partir de la serie de diluciones decimales, y por duplicado, depositar con pipeta estéril, 1 ml. De cada dilución en otras tantas placas de Petri estériles. La bolsa no constituye una dilución (10<sup>0</sup>).

3- Añadir, aproximadamente, 15 ml, de PCA, previamente licuado y atemperado a  $47 \pm 1$  °C, en cada placa. El tiempo transcurrido desde que se deposita la muestra y se vierte el medio de cultivo no debe sobrepasar los 10 minutos. Igualmente, desde que se prepara la primera dilución hasta que se vierte el medio de cultivo en la última placa, no se superarán los 20 minutos.

4- Mezclar el medio y el inóculo con movimientos circulares de la placa a favor y en contra de las agujas del reloj.

5- Se dejan solidificar las placas en superficie horizontal.

6- Invertir la placa y colocar en estufa a  $31 \pm 1$  °C durante  $68 \pm 4$  h. para recuento total de bacterias aerobias.

#### **- Resultados y Discusión**

Los resultados serían satisfactorios si la muestra logarítmica diaria es inferior o igual a m; serían aceptables si la media logarítmica diaria en encuentra entre m y M e insatisfactorios, si la media logarítmica es superior a M; siendo  $m = 3,5$  log y  $M = 5,0$  log. En caso de obtener resultados insatisfactorios se procederá a establecer un protocolo de mejora en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso.

Los principales inconvenientes de los métodos de toma de muestras destructivos son la obtención de canales comercialmente inaceptables y la necesidad de muestrear áreas pequeñas, que pueden dar lugar a errores en los resultados cuando la presencia del germen está distribuida heterogéneamente o su presencia es escasa. Al obtener canales comercialmente inaceptables, solamente se puede muestrear una pequeña proporción de las canales, lo que puede dar lugar a imprecisiones significativas cuando la contaminación total es baja y heterogéneamente distribuida, o cuando la presencia de bacterias es escasa.

Frente a dichos inconvenientes, la escisión del tejido superficial acumula todas las bacterias en la superficie, lo que contribuye a la invariabilidad de los resultados, que no se conseguiría si se utilizarán métodos no destructivos (previa validación de los mismos).

Otro inconveniente es que en el resultado final al ser un recuento influyen una serie de factores como son la habilidad del muestreador, el tiempo de llegada al laboratorio, (sobre todo en zonas rurales) y la adecuada conservación y transporte de la muestra.

#### **- Conclusiones**

El muestreo microbiológico puede ser utilizado como parte del control de procesos y para verificación del sistema Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos, así como su empleo en programas de vigilancia higiene del sacrificio.

#### **- Referencias Bibliográficas**

Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril,

El Reglamento CE nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, modificado por Reglamento CE nº 1441/2007

Norma ISO-17604

Norma EN-ISO-4833.

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO EN LA CONSERVACIÓN DE  
“LECHAZO ASADO” ENVASADO A VACÍO.**

**Martínez, B.; Rubio, B; García-Cachán, M.D.**

*Estación Tecnológica de la Carne. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. C/ Filiberto Villalobos s/n. 37770 Guijuelo (Salamanca).*

## **INTRODUCCIÓN**

Los cambios en los hábitos de compra y consumo han hecho que los platos preparados sean una importante alternativa de venta al por menor, siendo habitual en los lineales de los supermercados e hipermercados, encontrar platos preparados expuestos en murales refrigerados iluminados. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el consumidor de hoy en día, además de necesitar soluciones prácticas para sus comidas, es cada vez más exigente con la calidad y seguridad del producto que adquiere. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento (temperatura e iluminación) sobre la conservación de “lechazo asado” a lo largo de su almacenamiento a vacío desde el punto microbiológico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Las paletillas y piernas de cordero lechal asadas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por un fabricante local. El envasado a vacío de cada una de las piezas, una vez enfriadas, se realizó en bolsas de plástico de PA/PE con una envasadora mod: EVT-7-TD Tecnotrip. Se establecieron los siguientes lotes: *lote control* (piezas almacenadas a una temperatura de 2 °C y en oscuridad), *lote 1* (piezas almacenadas a una temperatura de 2°C y bajo iluminación y *lote 2* (piezas almacenadas a una temperatura de 5°C y bajo iluminación). Todos los lotes fueron almacenados bajo las diferentes condiciones establecidas, hasta el momento de la toma de muestra. Los tiempos de muestreo seleccionados fueron 0, 4, 10, 17 y 24 días de envasado. Cada día de muestreo se emplearon 2 muestras, 2 por cada tratamiento, para realizar los siguientes análisis: recuentos de flora aerobia mesófila, enterobacterias, *E. coli*, *S. aureus* e investigación de *Salmonella* spp y de *L. monocytogenes*. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó un mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con objeto de determinar la existencia o no de diferencias en el tiempo de envasado y entre las distintas condiciones de conservación. En aquellos casos en que existían diferencias significativas, se utilizó el test de Tukey HSD (honest significant difference) para la separación de las medias de los grupos de tratamientos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 95% y se utilizó el programa STATISTICA 6.0.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 1, se observa que cuando las muestras fueron almacenadas a 2 °C, no hubo diferencias entre los recuentos microbiológicos de las muestras conservadas en oscuridad y las mantenidas con luz. A lo largo del tiempo de envasado, todas las muestras presentaron recuentos crecientes de aerobios, siendo estos valores superiores a 7 lg ufc/g a los 17 días de envasado. Los recuentos de enterobacterias, *E. coli* y *S. aureus* permanecieron próximos a 1 lg ufc/g para todos los tiempos estudiados.

En relación con los resultados obtenidos para las muestras almacenadas con luz, pero a diferentes temperaturas (Tabla 2), se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a los 4 y 10 días de envasado en los recuentos de aerobios, obteniéndose recuentos más bajos para las muestras almacenadas a 2°C. Este comportamiento también pudo observarse para enterobacterias y *S. aureus* aunque en este último caso no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los tiempos estudiados. Resultados similares fueron aportados por Nyati (2000) en platos preparados elaborados a partir de carne cuando fueron almacenados envasados a vacío a 3 °C y a 8 °C.

Por último, en cuanto a la investigación de los patógenos *Salmonella* spp y de *L. monocytogenes*, ausencia en 25 g fue el resultado obtenido en todas las muestras.

**Tabla 1.** Recuentos microbiológicos (lg ufc/g) obtenidos para el “lechazo asado” envasado a vacío a lo largo del almacenamiento a 2 °C (valores medios).

Microorganismo	Iluminación	0 días	4 días	10 días	17 días	24 días
Aerobios	No	<sup>A</sup> 1,66±0,26 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 4,66±1,15 <sub>b</sub>	<sup>A</sup> 6,09±0,44 <sub>bc</sub>	<sup>A</sup> 7,52±0,63 <sub>c</sub>	<sup>A</sup> 8,01±0,38 <sub>c</sub>
	Si	<sup>A</sup> 1,66±0,26 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 3,78±0,31 <sub>b</sub>	<sup>A</sup> 5,45±0,47 <sub>b</sub>	<sup>A</sup> 7,41±0,89 <sub>c</sub>	<sup>A</sup> 8,46±0,14 <sub>c</sub>
Enterobacterias	No	<1	<1	<1	1,97±1,37	<1
	Si	<1	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	No	<1	<1	<1	<1	<1
	Si	<1	<1	<1	<1	<1
<i>S. aureus</i>	No	<1	<1	<1	1,91±1,28	<1
	Si	<1	<1	1,67±0,95 <sub>a</sub>	2,18±0,14 <sub>a</sub>	1,37±0,52 <sub>a</sub>

a, b, c, d: indican diferencias significativas con el tiempo de almacenamiento.

A, B: indican diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 2.** Recuentos microbiológicos (lg ufc/g) obtenidos para el “lechazo asado” envasado a vacío a lo largo del almacenamiento con luz (valores medios).

Microorganismo	Temperatura	0 días	4 días	10 días	17 días	24 días
Aerobios	2 °C	<sup>A</sup> 1,66±0,26 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 3,78±0,31 <sub>b</sub>	<sup>A</sup> 5,45±0,47 <sub>b</sub>	<sup>A</sup> 7,41±0,89 <sub>c</sub>	<sup>A</sup> 8,46±0,14 <sub>c</sub>
	5 °C	<sup>A</sup> 1,66±0,26 <sub>a</sub>	<sup>B</sup> 5,48±0,00 <sub>b</sub>	<sup>B</sup> 8,17±0,30 <sub>c</sub>	<sup>A</sup> 8,55±0,35 <sub>c</sub>	<sup>A</sup> 8,75±0,12 <sub>c</sub>
Enterobacterias	2 °C	<1	<1	<1	<1	<1
	5 °C	<1	2,64±2,32 <sub>a</sub>	6,08±0,14 <sub>ab</sub>	7,71±0,52 <sub>b</sub>	6,54±2,18 <sub>b</sub>
<i>E. coli</i>	2 °C	<1	<1	<1	<1	<1
	5 °C	<1	<1	<1	<1	<1
<i>S. aureus</i>	2 °C	<1	<1	<sup>A</sup> 1,67±0,95 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 2,18±0,14 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 1,37±0,52 <sub>a</sub>
	5 °C	<1	1,63±0,89 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 1,84±1,18 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 2,74±2,46 <sub>a</sub>	<sup>A</sup> 3,96±0,69 <sub>a</sub>

a, b, c, d: indican diferencias significativas con el tiempo de almacenamiento.

A, B: indican diferencias significativas entre tratamientos.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, la temperatura de almacenamiento es de gran importancia a la hora de establecer la vida útil del “lechazo asado” envasado a vacío. En las condiciones estudiadas, la vida útil del producto es inferior a 17 días cuando es conservado a 2°C e inferior a 10 días cuando es conservado a 5 °C.

## BIBLIOGRAFÍA

Nyati, H. (2000). An evaluation of the effect of storage and processing temperatura on the microbiological status of sous vide extended shelf life products. *Food Control*, 11, 471-476.

## COMPARACIÓN MÉTODO AUTOMATIZADO TEMPO STA FRENTE A LOS METODOS DE RECuento EN PLACA SEGÚN ISO 6888-2 Y PETRIFILM STX

Muñiz J.<sup>1</sup>, Álvarez M.<sup>1</sup>, Alves M.<sup>1</sup>, Rubio T.<sup>1</sup> y Mata A.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alce Calidad S.L. Polígono Silvota, 33192. Llanera Asturias. [micro@alcecalidad.com](mailto:micro@alcecalidad.com)

<sup>2</sup>bioMérieux España S.A. Manuel Tovar, 45-47. 28034. Madrid. [ana-isabel.mata@eu.biomerieux.com](mailto:ana-isabel.mata@eu.biomerieux.com).

### Introducción y Objetivos

El objetivo es evaluar las tarjetas TEMPO STA, para la enumeración de estafilococos coagulasa positivos, utilizando muestras natural y artificialmente contaminadas por comparación con el método ISO 6888-2 y un método alternativo que es el *3M Petrifilm Staph express (STX)*.

El test TEMPO STA es un método automatizado de recuento basado en la tecnología del Número Más Probable (NMP).

El medio de cultivo contiene un indicador de pH fluorescente, que cuando es neutro emite una señal detectada por el *TEMPO Reader*. Durante la incubación, las cepas de estafilococos coagulasa positivos presentes en la tarjeta acidifican el manitol presente en el medio de cultivo, resultando un descenso del pH, lo cual provoca una extinción de la señal. Dependiendo del número y tipo de pocillos positivos, se crea un código numérico que el equipo extrapola mediante un logaritmo interno a las tablas del NMP, calculándose así el resultado en UFC/g.

### Material y Métodos

En el desarrollo de este estudio se emplearon los siguientes equipos y reactivos:

- Equipo TEMPO (llenador y lector).
- Estufa regulada a 37 °C.
- Placas de Petri.
- Agua de triptona (empleado como diluyente).
- Medio de cultivo Baird-Parker con RPF (según norma ISO 6888-2) (bioMérieux).
- Láminas rehidratables Petrifilm Staph Xpress (STX) (3M).
- Discos STX de confirmación de *S. aureus* (3M).
- Cabina de flujo laminar.
- Contador de colonias.
- Equipo Vitek 2, empleado para la confirmación de positivos (bioMérieux).
- Tarjetas Vitek GP (confirmación de positivos) (bioMérieux).

Se analizaron un total de 86 muestras de alimentos naturales, es decir no contaminadas de forma artificial, para comprobar la fiabilidad del TEMPO STA. Todas las muestras fueron analizadas en paralelo por los 3 métodos: TEMPO STA, ISO 6888-2 y Petrifilm STX. Para el ensayo de las muestras con el medio Baird-Parker + RPF se siguió el protocolo de la norma ISO 6888-2, y todas las colonias susceptibles de ser *S. aureus* fueron confirmadas mediante una tarjeta Vitek que muestra el perfil bioquímico y su identificación con una fiabilidad del 95%. Para el ensayo de las muestras con el medio Petrifilm STX se siguieron fielmente las instrucciones del fabricante y todas las láminas con colonias sospechosas se confirmaron utilizando los discos de confirmación STX. Se sembró 1 ml de las diluciones a estudiar ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), realizando su lectura tras 48 horas de incubación en la misma estufa calibrada que el método ISO 6888-2. Este ensayo no se realizó por duplicado, de manera que el resultado fue el conteo directo de cada una de las laminas Petrifilm. Para el ensayo TEMPO STA, se sembró una tarjeta mediante el TEMPO Filler y tras una incubación de 24 horas en la misma estufa calibrada que el método ISO 6888-2 se leyó de forma automática con el TEMPO Reader, de forma que el resultado para cada tarjeta es el que el que se obtuvo en el propio estudio.

### Resultados y Discusión

Del total de las 86 muestras analizadas únicamente 25 dieron resultados de crecimiento, resultando negativas el resto.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Comparación entre método ISO 6888-2 y TEMPO STA

Matriz	BP – RPF (ufc/g)	TEMPO STA (ufc/g)	Diferencias	Log Ref	Log Valor	Dif Log		
Pastel	12000	21000	-9000	4,0792	4,3222	-0,2430		
Pastel	12000	17000	-5000	4,0792	4,2304	-0,1513		
Pollo	10	10	0	1,0000	1,0000	0,0000	N	25
Pescado	44000	15000	29000	4,6435	4,1761	0,4674	t	2,064
Pescado	40000	17000	23000	4,6021	4,2304	0,3716	t	1,899
Pollo	22000	21000	1000	4,3424	4,3222	0,0202	No existen diferencias significativas	
Pollo	21000	21000	0	4,3222	4,3222	0,0000		
Empanada	3700	9000	-5300	3,5682	3,9542	-0,3860		
Picadillo	3700	3100	600	3,5682	3,4914	0,0768		
Picadillo	4000	4300	-300	3,6021	3,6335	-0,0314		
Hamburguesa	380	120	260	2,5798	2,0792	0,5006		
Pudding	480	510	-30	2,6812	2,7076	-0,0263		
Chocolate	59	29	30	1,7709	1,4624	0,3085		
Pastel	8000	2400	5600	3,9031	3,3802	0,5229		
Ensalada	120	210	-90	2,0792	2,3222	-0,2430		
Queso	4000	1000	3000	3,6021	3,0000	0,6021		
Queso	990000	1700000	-710000	5,9956	6,2304	-0,2348		
Leche	850	280	570	2,9294	2,4472	0,4823		
Hamburguesa	55	21	570	2,9294	2,4472	0,4823		
Queso	8800	5700	34	1,7404	1,3222	0,4181		
Queso	170	140	3100	3,9445	3,7559	0,1886		
Queso	440	1000	-560	2,6435	3,0000	-0,3565		
Pescado	70	100	-30	1,8451	2,0000	-0,1549		
Queso	56000	39000	17000	4,7482	4,5911	0,1571		
Queso	8800	6700	2100	3,9445	3,8261	0,1184		
Promedios	49625,4	75424,8	-25777,8	3,4057	3,2902	0,1156		
				Sd		0,304327		

Comparación entre método Petrifilm STX y TEMPO STA

Matriz	Petrifilm (ufc/g)	TEMPO STA (ufc/g)	Diferencias	Log Ref	Log Valor	Dif Log		
Pastel	15000	21000	-6000	4,1761	4,3222	-0,1461		
Pastel	15000	17000	-2000	4,1761	4,2304	-0,0544		
Pollo	10	10	0	1,0000	1,0000	0,0000	N	25
Pescado	54000	15000	39000	4,7324	4,1761	0,5563	t	2,064
Pescado	54000	17000	37000	4,7324	4,2304	0,5019	t	0,189
Pollo	6000	21000	-15000	3,7782	4,3222	-0,5441	No existen diferencias significativas	
Pollo	6000	21000	-15000	3,7782	4,3222	-0,5441		
Empanada	3300	9000	-5700	3,5185	3,9542	-0,4357		
Picadillo	6400	3100	3300	3,8062	3,4914	0,3148		
Picadillo	2400	4300	-1900	3,3802	3,6335	-0,2533		
Hamburguesa	290	120	170	2,4624	2,0792	0,3832		
Pudding	400	510	-110	2,6021	2,7076	-0,1055		
Chocolate	80	29	51	1,9031	1,4624	0,4407		
Pastel	5900	2400	3500	3,7709	3,3802	0,3906		
Ensalada	140	210	-70	2,1461	2,3222	-0,1761		
Queso	1000	1000	0	3,0000	3,0000	0,0000		
Queso	950000	1700000	-750000	5,9777	6,2304	-0,2527		
Leche	1200	280	920	3,0792	2,4472	0,6320		
Hamburguesa	160	21	139	2,2041	1,3222	0,8819		
Queso	4800	5700	-900	3,6812	3,7559	-0,0746		
Queso	120	140	-20	2,0792	2,1461	-0,0669		
Queso	210	1000	-790	2,3222	3,0000	-0,6778		
Pescado	40	100	-60	1,6021	2,0000	-0,3979		
Queso	56000	39000	17000	4,7482	4,5911	0,1571		
Queso	4800	6700	-1900	3,6812	3,8261	-0,1448		
Promedios	47490,0	75424,8	-27934,800	3,2935	3,2781	0,0154		
				Sd		0,4069848		

Conclusiones

Tras analizar las muestras comparando los resultados dos a dos y mediante una t de student, se pudo comprobar que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

Referencias Bibliográficas

- Norma ISO 6888-2
- Manual de instrucciones Petrifilm STX
- Manual de instrucciones TEMPO

## DETECCIÓN DE CEPAS MICOTOXIGÉNICAS EN TRIGOS ESPAÑOLES

Sardiñas, N<sup>1</sup>., Méndez, L<sup>1</sup>., Esteban, M<sup>1</sup>., Patiño, B<sup>1</sup>., González-Jaén, MT.<sup>2</sup> y Vázquez, C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>2</sup> Dpto. de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

### Introducción y Objetivos

Uno de los aspectos más notables dentro del marco de la bioseguridad alimentaria es determinar qué peligros presentes en los alimentos pueden ocasionar problemas a los consumidores y son un riesgo para su salud, y preparar un plan de actuación sobre este riesgo dirigido a reducir al máximo la exposición de éste por parte de los ciudadanos. Así, organizaciones como la FAO y la OMS proponen una línea de actuación en el análisis del riesgo que se basa en llevar a cabo una (a) evaluación del riesgo, (b) comunicación del riesgo y (c) gestión del riesgo.

Uno de los peligros que se pueden encontrar en alimentos corrientes en nuestra dieta son las micotoxinas. Estas sustancias son metabolitos secundarios fúngicos altamente tóxicos que se encuentran de manera natural en alimentos de origen vegetal y animal. Las propiedades nefrotóxicas, hepatotóxicas, neurotóxicas, teratogénicas, estrogénicas y cancerígenas, entre otras, han sido el principal punto de atención en la evaluación de la inocuidad y el análisis del riesgo por las autoridades. Los cereales forman parte de nuestra dieta básica y son unas de las materias primas más habitualmente contaminadas por hongos productores de micotoxinas. La ocratoxina A (OTA), las aflatoxinas y los tricotecenos, especialmente deoxinivalenol (DON) son las toxinas detectadas con más frecuencia en trigos españoles.

Dentro de la necesidad de evaluar el riesgo, hemos analizado 37 muestras de trigos de diferentes variedades y localizaciones geográficas. Se han aplicado herramientas moleculares y se ha puesto de manifiesto la necesidad de estandarizar los tratamientos previos a la utilización de herramientas moleculares.

### Material y Métodos

Se analizaron muestras 37 de trigo: 9 de trigo blando (*Triticum aestivum*) de ciclo corto (2 variedades), 20 de trigo blando de ciclo largo (2 variedades), y 8 de trigo duro (*Triticum durum*) (2 variedades), procedentes de diferentes localizaciones de la geografía española.

Para realizar el diagnóstico molecular, de cada muestra se tomaron 4 gramos, que se incubaron en matraces con medio líquido Sabouraud suplementado con cloranfenicol al 0,5% (Pronadisa, Madrid), durante 5 días a 28°C en agitación. Las muestras una vez filtradas se homogeneizaron y la eficacia de dos métodos de disgregación fue comparada. Se extrajo el DNA genómico con el kit *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAgen, España) y se llevó a cabo un diagnóstico molecular mediante PCR para la identificación de las especies relevantes, *A. flavus* (González-Salgado et al., 2008), *A. ochraceus* y *A. carbonarius* (Patiño et al., 2005), el agregado *A. niger* (González-Salgado et al., 2005) y las especies productoras de DON (Chandler et al., 2003).

Los productos de amplificación se detectaron en geles de agarosa al 2%.

### Resultados y Discusión

La ausencia de métodos validados para el tratamiento de las muestras es una necesidad urgente para la incorporación de herramientas moleculares a los estudios rutinarios, varios factores pueden ser determinantes como el tamaño de muestra, la homogeneización, la incubación, etc. Para estandarizar la metodología de procesado de la muestra se analizaron 4 muestras de trigo diariamente durante cinco días de incubación. A continuación las muestras fueron o bien liofilizadas y posteriormente machacadas con nitrógeno líquido, o machacadas directamente. Tras las extracciones de DNA se valoró el contenido en DNA (ng/µl). Las muestras liofilizadas se disgregaban más fácilmente y se observó menor variabilidad entre muestras.

De las 37 muestras de trigo analizadas, en 30 muestras hemos podido detectar *Aspergillus flavus*, lo que nos indica un posible riesgo de contaminación con aflatoxinas, en 10 *Aspergillus niger*,

lo que revelaría riesgo de contaminación con OTA. Las otras especies de *Aspergillus* no se detectaron en ninguna muestra. Figura 1

La presencia de especies fúngicas productoras de DON estuvo exclusivamente asociada a muestras de trigo blando de ciclo corto. Figura 2

Dentro de cada grupo de trigos no se observaron diferencias reseñables entre las dos variedades analizadas, ni por localización geográfica.

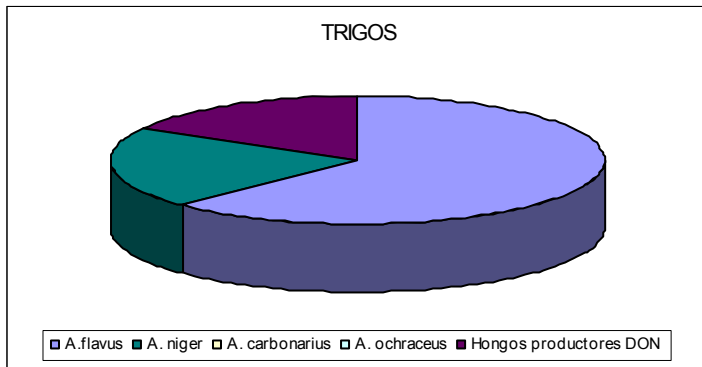


Figura 1: Distribución (%) de las diferentes especies en las 37 muestras de trigo

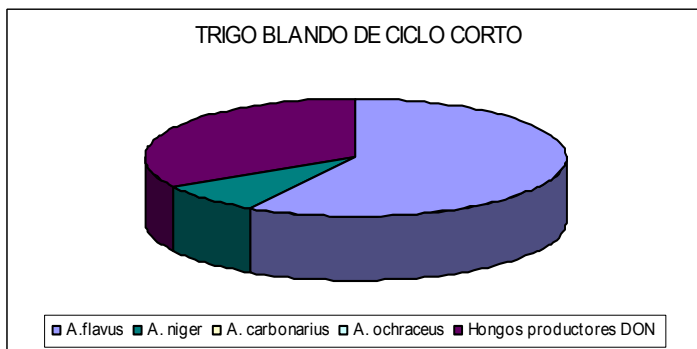


Figura 2: Distribución (%) de las diferentes especies en las muestras de trigo blando de ciclo largo

- El protocolo descrito basado en técnicas moleculares (PCR), es adecuado para la detección de especies productoras de micotoxinas en cereales. Supone un gran ahorro de tiempo, ya que permite manejar un gran número de muestras a la vez y evita los cambios de micoflora que se producen al almacenar las muestras antes de analizarlas.
- En trigo podemos predecir un alto riesgo de contaminación por aflatoxinas, ya que un alto porcentaje de las muestras analizadas están contaminadas con *Aspergillus flavus*. Existiría un riesgo, aunque menor, de contaminación por OTA debido a *Aspergillus niger*
- Solamente hemos podido detectar especies productoras de DON en trigo blando de ciclo largo. Parece que las diferentes condiciones de cultivo que tiene este cereal favorece la contaminación con especies productoras de DON.

### Referencias Bibliográficas

Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P., 2003. *Physiological and molecular plant pathology*. 62:355-367.

González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T., 2005. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 353-361.

González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C. y González-Jaén, M.T. 2008. *Food Additives and Contaminants*.25:758-764

Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., 2005. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 207-214.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por los proyectos AGL2007-66416-C05-02 y CCG07-UCM/AGR-2612.

**CALIDAD HIGIÉNICA DE COMIDAS PREPARADAS DE ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA**

**Peso Echarri P.<sup>1</sup>, Pérez Conesa D.<sup>1</sup>, Llamas Botía C.<sup>1</sup>, Flores Ruiz J.<sup>1</sup>, Martínez Graciá C.<sup>1</sup> y Ros Berrueto G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100, Murcia, patri.peso@um.es

**- Introducción y Objetivos**

El consumo de comidas preparadas de establecimientos de restauración colectiva ha aumentado en los últimos años en España. La comida servida en estos lugares puede ser la causa de toxiinfecciones alimentarias (Soriano y col. 2002). La Legislación vigente, establece los criterios microbiológicos específicos para cada tipo de alimento, con el fin de reducir riesgos en la cadena alimentaria y por lo tanto garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos consumidos en estos establecimientos. Una de las herramientas para garantizar la inocuidad de los alimentos elaborados y consumidos en dichos establecimientos es la implantación del sistema APPCC en las empresas del sector alimentario.

El Real Decreto 3484/2000, clasifica las comidas preparadas en dos grupos:

-Grupo A: comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico.

-Grupo B: comidas preparadas con tratamiento térmico.

Dicha normativa establece como microorganismos indicadores a aerobios mesófilos y a enterobacterias lactosa positiva o coliformes, como testigos de falta de higiene a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y como patógenos *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad higiénica de platos preparados de diferentes establecimientos de restauración colectiva de la Región de Murcia analizando los parámetros microbiológicos que se recogen en la normativa citada anteriormente.

**- Material y Métodos**

Se realizó el análisis microbiológico de 192 muestras recogidas a lo largo del año 2006, de diferentes establecimientos de restauración colectiva de la Región de Murcia. De las 192 muestras, 69 pertenecían al grupo A (sin tratamiento térmico o con algún ingrediente no sometido a tratamiento térmico) y 123 al grupo B (con tratamiento térmico). Todas muestras se recogieron en recipientes de plástico estériles, su transporte hasta el laboratorio fue en condiciones de refrigeración y se procesaron inmediatamente a su llegada al laboratorio, de la Universidad de Murcia perteneciente al Servicio de Seguridad Microbiológica de alimentos, Evaluación Nutricional y Análisis Sensorial.

Los microorganismos analizados se corresponden con los recogidos en las Normas microbiológicas vigentes: RD 3484/2000, BOE 12/1/2001 y Reglamento CE 2073/2005 modificado CE 1441/2007, D.O.U.E. 07/12/2007.

Para el estudio de aerobios mesófilos, coliformes, *E. coli* y estafilococos, se pesaron 10 g de muestra en una bolsa de stomacher a la que se añadió 90 ml de agua de peptona. Se homogeneizó y después de 30 minutos se sembraron por duplicado las diferentes diluciones decimales realizadas. Para el recuento de aerobios mesófilos totales utilizamos Plate Count Agar (Oxoid) incubado a 37° C/ 48 h. El número de coliformes y de *Escherichia coli* se determinó en el medio de cultivo cromogénico RAPID'E.coli 2™, se incubó a 37° C/24 h. Baird-Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) fue el medio utilizado para enumerar los estafilococos coagulasa positiva, se incubó a 37° C/ 48 h.

Para el análisis de *Salmonella*, primero se realizó un pre-enriquecimiento no selectivo con peptona al 1% y se incubó a 37° C/18h. Posteriormente, 1 ml del cultivo se añadió a 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis soya, y se incubó a 37° C/ 24h. Por último se sembró en triple estría en el medio RAPID' *Salmonella* (Biorad). La confirmación de las colonias sospechosas se realizó con la galería API20E (Biomérieux). Para la detección de *Listeria monocytogenes* se realizó un pre-enriquecimiento selectivo en caldo Fraser a 30° C/ 24h. Posteriormente se sembró en triple estría y

por duplicado en el medio RAPID'L.mono™. Las colonias sospechosas se confirmaron mediante el test de catalasa, β- Hemolisis en agar sangre y API listeria (Biomerieux)

### - Resultados y Discusión

Como se observa en la Figura 1, los recuentos del grupo A fueron superiores a los del grupo B, destacando la presencia de los microorganismos patógenos *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en un pastel de carne y ensaladillas de marisco, respectivamente. Los recuentos de microorganismos indicadores y de testigos de falta de higiene fueron más elevados de lo esperado en las muestras con tratamiento térmico, indicando una posible contaminación cruzada o falta de higiene en la manipulación tras dicho tratamiento. En la Figura 2 se muestra que un 52% de las comidas preparadas pertenecientes al grupo A superaron en uno o más los límites establecidos. En el grupo B el porcentaje de muestras que superaron estos límites fue de 33%.

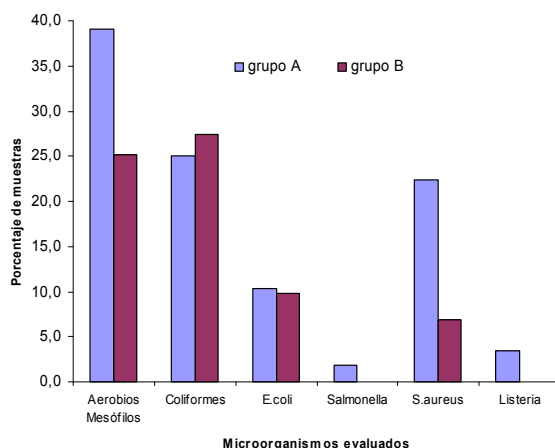


Figura 1. Porcentaje de cada parámetro que supera el límite exigido por Reglamento 3484/2000

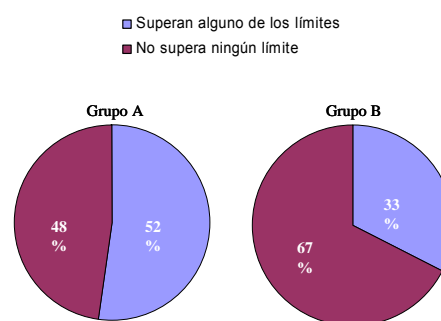


Figura 2. Porcentaje de muestras que superan en uno o más los criterios microbiológicos recogidos en el Reglamento 3484/2000.

En estudios similares, los porcentajes de las muestras que superaron uno o más criterios microbiológicos, fueron: 27,6% (Arrans y col., 2002), 38,2% (Torre y col., 1998) y 48,7% (Pérez-Silva, y col., 1998).

### - Conclusiones

La vigilancia mediante el análisis microbiológico puede servir para corregir deficiencias higiénicas en la preparación de este tipo de alimentos. Destacamos elevados recuentos de microorganismos marcadores en más de la mitad de las muestras en los alimentos no tratados térmicamente. Esto podría suponer que tales alimentos pueden potencialmente vehicular microorganismos causantes de toxiinfecciones alimentarias.

### - Referencias Bibliográficas

- Boletín Oficial del Estado. 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. BOE 11/12/2001.
- Rey Arrans J.C., Aranda Ramírez C., Pedrosa Arias M., Conde Valero A. y Castilla Pedregosa I. 2002. Higiene alimentaria en los establecimientos de restauración de una zona turística de Andalucía. Medicina de Familia Vol. 3, Nº 2.
- Soriano J.M., Rico H., Moltó J.C., Mañes J. 2002. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. Food Control 13 pp. 253–261.
- Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Torre R., Jurado R., Pérez J., Hernández M., Morales E. y Jurado M. 1998. Calidad microbiológica de platos elaborados en establecimientos de restauración. Rev Esp Nutr Comunitaria 4: 293-4.
- Pérez-Silva M.C., Belmonte S. y Martínez J.1998. Estudio microbiológico de los alimentos elaborados en comedores colectivos de alto riesgo. Rev Esp Salud Pública 72: 67-75.

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS DE LAS FUENTES QUE NO MANAN DE LA RED DE LA PROVINCIA DE VALENCIA

**Quiles F.<sup>1</sup>, Martí P.<sup>2</sup>, Mormeneo S.<sup>1</sup>, Camaró M<sup>a</sup> L.<sup>2</sup>, Sacristán T.<sup>2</sup> e Irazo M<sup>a</sup> <sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Unidad de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. Av. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100. Burjassot. Valencia. f.quiles.000@recol.es

<sup>2</sup>Laboratorio de Salud Pública de la Generalitat Valenciana. Camí de la Marjal, s/n. 46470. Albal. Valencia.

### Introducción y Objetivos:

El agua como alimento, no aparece en la pirámide de la alimentación, pero es imprescindible para la vida consumir de dos a tres litros de agua al día, de los que la mitad aproximadamente los obtenemos de los alimentos y la otra mitad se deben beber. El agua es un bien necesario y escaso y, además, puede causar problemas de salud si no conocemos bien su origen, por eso el agua para consumo humano es sistemáticamente tratada para evitar la presencia de microorganismos (1).

Tradicionalmente se asocia el agua de manantial con buena calidad y beneficios para la salud, pero es importante que se entienda que el agua de fuentes que no está tratada puede tener grandes riesgos para la salud por ser un importante vehículo de transmisión de enfermedades. Así pues, las fuentes públicas que no manan de la red no poseen garantía sanitaria suficiente (2) para el consumo humano, ya que sus aguas no están sometidas a la acción de ningún tipo de tratamiento antimicrobiano (3). Durante las últimas décadas y debido al incremento del turismo rural, excursiones, senderismo, etc., existe un aumento en la afluencia y en el consumo del agua procedente de estas fuentes. Un control y vigilancia adecuados de la calidad de las aguas de las fuentes que no manan de la red por parte de los organismos responsables son fundamentales para el suministro de unas aguas con garantías sanitarias y aptas para el consumo humano (Decreto 58/2006).

Los objetivos de este estudio han sido: detectar y analizar la influencia de los Factores de Riesgo Contaminante (4) relacionados con los manantiales según la ubicación de las fuentes seleccionadas, evaluar y estudiar la variación de la calidad microbiológica del agua de las fuentes que no manan de la red con una frecuencia de muestreo mensual, y evaluar la eficacia del programa de control antes citado, con la finalidad de relacionar la incidencia de los Factores de Riesgo con la posible contaminación microbiana.

### Material y Métodos:

El ámbito de estudio ha sido la provincia de Valencia seleccionándose cinco fuentes a partir de las 577 fuentes censadas por la Consellería de Sanitat, pertenecientes a zonas y localizaciones geográficas distintas de acuerdo con unos criterios de selección que pudieran validar los resultados: *Fuente de San Antón (Cofrentes)*, *Fuente La Cadena (Ayora)*, *Font del Cirer (Simat de la Vallidigna)*, *Font Roja (Pla de Corral)* y *Fonteta de Trini (Turis)*.

A continuación, se procedió a realizar una encuesta para determinar las características principales de cada fuente en cuanto a infraestructura y condiciones ambientales del entorno que pudieran afectar o modificar los parámetros microbiológicos analizados. Durante el período de Enero a Diciembre de 2007, y mensualmente se realizaron determinaciones microbiológicas de los parámetros siguientes: Recuento de Coliformes totales, de *Escherichia coli*, de Enterococos intestinales, de *Clostridium perfringens* y de Bacterias aerobias a 22°C siguiendo la normativa actual (Real Decreto 140/2003).

Los datos analíticos obtenidos se compararon y cotejaron con los datos analíticos históricos realizados durante los últimos diez años a estas mismas fuentes por el Laboratorio de Salud Pública de la Generalitat Valenciana dentro del programa de control y vigilancia de las aguas de las fuentes públicas que no manan de la red, que lleva a cabo esta Administración.

### Resultados y Discusión:

De los resultados obtenidos, claramente se observa que los Factores de Riesgo Contaminante están presentes en todas las fuentes objetos del estudio y el incremento en la asociación de varios de ellos, tanto estructurales como ambientales, facilita la presencia de contaminación microbiana.

Es importante destacar que al realizar controles microbiológicos mensuales, la proporción de fuentes que no superan los criterios de potabilidad aumenta de forma importante en relación al método de un solo control microbiológico anual, según el programa de vigilancia actual. De acuerdo con los resultados obtenidos, el agua de ninguna de las fuentes estudiadas sería apta para el

consumo por encontrarse sus parámetros microbiológicos fuera de los límites establecidos por la normativa vigente.

Respecto al recuento de Bacterias aerobias a 22°C, en muchos de los controles se superaron las 150 u.f.c. / ml y en otros se mantuvieron a un nivel aceptable. Aunque la legislación establece un margen muy amplio en sus niveles guía (RD. 140/2003), su uso como indicador de la calidad del agua es importante, ya que puede ser el primer signo de alarma ante una nueva contaminación, proliferación de algas, suciedad o deterioro de alguna fase del abastecimiento que indicaría la necesidad de tomar medidas de control. La presencia, casi constante, de coliformes totales en la mayoría de las muestras tomadas, puede sugerir algún tipo de contaminación no fecal, ya que no son específicos de ésta, pudiendo provenir del suelo, plantas, etc. *Escherichia coli* ha sido aislada en diez de las muestras, sobre todo, en dos de las fuentes que han manifestado una clara tendencia a la contaminación microbiana (*Font Roja* y *Font del Cirer*). Los Enterococos intestinales aparecen de forma variable en todas las fuentes y solo aparece de forma constante en una de ellas, la *Font del Cirer*. La presencia de *Clostridium perfringens* de forma persistente en alguna de las fuentes (*Font del Cirer*) siempre asociada a otros gérmenes, puede indicar una contaminación antigua o producida a distancia del foco detectado (granjas).

Con este estudio, se confirma, además, que alrededor del 82% de las fuentes que se analizan con periodicidad anual (Programa de vigilancia de la Administración) no alcanzan los niveles de potabilidad según el RD. 140/2003, llegando a ser el porcentaje de hasta el 100% de las fuentes, cuando la periodicidad de la toma de muestras es mensual.

### **Conclusiones:**

Los datos extraídos de las encuestas, relacionados y contrastados con los resultados analíticos de los parámetros microbiológicos de cada fuente, reflejan claramente la relación existente de que a mayor número de Factores Relacionados con la Contaminación presentes (actividades agrícolas, ganaderas o de esparcimiento, protección de la captación, limpieza del entorno, etc.), mayor contaminación bacteriana en las aguas de dichas fuentes. Con este estudio, además, se ha comprobado la deficiente calidad microbiológica del agua de estas fuentes, ya que no cumplen los criterios de calidad del agua dentro del marco normativo español por lo que el agua de ninguna de las fuentes estudiadas sería apta para el consumo humano, con el consiguiente riesgo que supone para la salud pública

Los Programas desarrollados para el Control y Vigilancia de las fuentes que no manan de la red, no aseguran un control analítico eficaz para la detección de fuentes contaminadas, ya que el muestreo anual se ha determinado insuficiente para un control realmente efectivo, debido a las grandes variaciones que se producen en los resultados en relación a los resultados obtenidos mediante un muestreo mensual en diferentes épocas del año.

### **Referencias Bibliográficas:**

1. Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W. y Schleifer, KH. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol.* 54: 81-127.
2. Clasen, T., Schmidt, WP., Rabie, T., Roberts, I. y Cairncross, S. 2007. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 39118.489931. BE.
3. Binefa, G. y Hernández, G. 2002. Vigilancia de brotes de transmisión hídrica en España. Año 1998. *Boletín Epidemiológico Semanal. Ministerio de Sanidad y Consumo.* 9: N° 25. PP. 261-268.
4. Smith, KR., Corvalan, CF. y Kjellstrom, T. 1999. How much global ill health is attributable to environmental factors? *Epidemiology.* 10: 573-584.

## EFFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PATULINA POR *PENICILLIUM EXPANSUM* DE DIFERENTES VARIEDADES DE MANZANAS Y PERAS.

Ramos A.J.<sup>1</sup>, Morales H.<sup>1</sup>, Barros G.<sup>2</sup>, Marín S.<sup>1</sup> y Sanchis V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Tecnología de Alimentos, XaRTA, ETSEA, Universidad de Lleida. Av. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, España, ajramos@tecal.udl.ca

<sup>2</sup>Dpto. de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36, km. 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba, República Argentina.

### Introducción y Objetivos

La patulina es una micotoxina producida por mohos filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Byssoschlamys*. *P. expansum*, el agente causante de la podredumbre azul, es el principal responsable de la presencia de esta toxina en los productos alimenticios, especialmente en frutas (manzana y pera) y derivados. Se ha demostrado que al menos el 50% de las manzanas con síntomas claros de podredumbre azul procedentes de centrales hortofrutícolas contienen patulina (Viñas et al., 1993), sucediendo algo similar en el caso de las peras. Este hecho, junto con la evidencia de que son justamente las frutas lesionadas, o las de menor calidad, las mayoritariamente utilizadas por la industria transformadora de este tipo de frutas, supone un riesgo de introducción de esta toxina en la cadena alimenticia humana. De hecho, la Unión Europea ha regulado el nivel máximo admisible de esta toxina en este tipo de productos, habiéndolo situado entre 10 y 50 µg/kg, en función del tipo de consumidor potencial y del derivado considerado (Reglamento UE1881/2006).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la influencia de la variedad de fruta empleada en la acumulación de patulina por *P. expansum*, así como el efecto de su conservación a temperatura ambiente (20°C), en frigoconservación (1°C) o con un tratamiento combinado de temperaturas.

### Material y Métodos

Se ha investigado el efecto de la variedad (Golden, Gala y Fuji para manzanas, y Conference y Blanquilla para peras) en un total de 24 frutas de cada variedad procedentes de la cosecha del 2005 obtenidas en el mercado minorista. A 4 unidades por variedad se les realizó un análisis de los parámetros de calidad siguientes: firmeza, concentración de sólidos solubles, acidez (g ácido málico/L zumo) y pH de la pulpa.

El resto de frutas fueron desinfectadas superficialmente, produciéndoles posteriormente una herida de 2 mm de profundidad sobre la que se depositaron 20 µl de una suspensión de conidios (10<sup>6</sup> conidios/mL) de una cepa de *P. expansum* (cepa UdLTA 3.72) de comprobada capacidad productora de patulina.

La mitad de las frutas se incubaron a 20°C hasta que el tamaño de la lesión fúngica alcanzó 1 cm, momento en el cual la zona podrida fue seccionada y conservada a -25°C hasta su análisis. El resto de frutas se dividió en dos sublotes (marcados como sublote 1°C y sublote 1+20°C) conservando ambos a 1°C/85-90%HR hasta que la lesión alcanzó 1 cm. En ese momento con el sublote 1°C se procedió como anteriormente, mientras que el sublote 1+20°C fue transferido a 20°C durante 3 días más (simulando el período en espera previo al procesado para zumos, por ejemplo), procediendo entonces a seccionar y conservar la parte podrida como se ha explicado anteriormente.

Para la realización del análisis de patulina en las porciones seleccionadas se procedió en primer lugar a obtener un *purée* homogeneizando la sección conservada con agua en una proporción 1:1 p/p, para posteriormente tratar este homogeneizado enzimáticamente con pectinasa para eliminar la pectina. Tras una centrifugación, en el sobrenadante resultante se analizó la patulina siguiendo el método AOAC 995.10 (AOAC, 1998), realizando la cuantificación por HPLC con detección por UV a 276nm.

Las diferencias en los parámetros de calidad y en la acumulación de patulina fueron analizadas mediante una ANOVA y un Test de rango múltiple de Duncan. Las interacciones entre factores se analizaron mediante el test de separación de medias corregidas por mínimos cuadrados (LSMEANS). Los factores analizados para la acumulación de patulina fueron la variedad y el tratamiento de conservación. Se empleó el paquete estadístico SAS 8.2v.

## **Resultados y Discusión**

Tanto la variedad como el tipo de almacenamiento efectuado, y sus interacciones, presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,0001$ ). Se produjo una mayor acumulación de patulina en los frutos conservados a 20°C que en los conservados a 1°C (194,29 ng patulina/fruta vs 34,59 ng/fruta) aunque esta diferencia no fue significativamente diferente. Sin embargo, cabe destacar que los frutos que posteriormente a un almacenamiento en frío pasaron a 20°C presentaron niveles de contaminación mucho mayores (1194,75 ng/fruta).

El análisis de los resultados para cada temperatura por separado mostró que a 20°C se tardan unos 4-5 días en alcanzar lesiones de 1cm de diámetro, sin diferencias entre las variedades estudiadas, frente a los 24 y 32 días necesarios para peras y manzanas cuando la temperatura fue de 1°C.

La variedad de fruta que acumuló más patulina fue la manzana variedad Gala, que llegó a acumular hasta 2233,07 ng patulina/fruta en el tratamiento combinado 1+20°C. Debido a esta alta producción de patulina en esta variedad no se observaron diferencias significativas entre las otras cuatro variedades estudiadas. Con el objeto de dilucidar si esta alta acumulación de patulina podía relacionarse con algún parámetro de calidad de la fruta, se realizó un test de rango múltiple de Duncan, pero no se observó ninguna diferencia que la distinguiera de las otras variedades de manzanas.

A 20°C la acumulación de patulina fue mayor en manzanas Fuji, mientras que a 1°C fue mayor en manzanas Golden. A 1+20°C Fuji y Golden acumularon más toxina que las variedades de pera ensayadas.

El valor de pH de las manzanas ensayadas varió entre 4,0 y 4,81. La acumulación de patulina a esos valores de pH a 20°C no fue significativamente diferente. Sin embargo a 1°C parece que ejerció un efecto determinante, especialmente en el caso de las manzanas Golden, cuyo valor de pH fue el más bajo. Aunque el crecimiento de *P. expansum* parece ser mayor en peras que en manzanas, son estos últimos frutos los que acumulan más patulina. La especificidad entre la fruta y el patógeno puede jugar un papel en ello, especialmente a pH cercanos a 3,5.

## **Conclusiones**

La frigoconservación de la fruta es una medida efectiva para reducir el desarrollo fúngico y la producción de patulina en manzanas y peras. La variedad de la fruta puede jugar un papel importante, especialmente en el caso de las manzanas, ya que en ellas se han encontrado mayores niveles de patulina en la variedad Gala, un hecho que ha de ser objeto de un estudio más profundo, y que puede estar ligado a variables tales como el pH propio de la fruta o su grado de madurez.

El hecho de que manzanas frigoconservadas puedan estar un tiempo conservadas a temperatura ambiente, antes de su utilización, puede conllevar un incremento en la acumulación de esta toxina en la fruta, lo que es posible que ocurra en el caso de las manzanas destinadas a la producción de derivados, como zumos, por lo que este factor debería de ser tenido en cuenta a la hora de considerar el correspondiente APPCC.

## **Agradecimientos**

Al MEC (AGL 2004-07549-C05-00) y al XaRTA por la financiación de este estudio.

## **Referencias Bibliográficas**

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., 4th rev., AOAC International: Gaithersburg, MD, 1998, Section 49.6.02.

Reglamento (CE) N°1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Vañas. I., Vela, E. and Sanchis, V., 1993. Capacidad productora de patulina de cepas de *Penicillium expansum* procedentes de centrales hortofrutícolas de Lleida. Rev. Iberoamer. Micol. 10, 30-32.

VERIFICACIÓN DE *S. aureus* EN LECHE MATERNA PROCEDENTE DEL BANCO DE LECHE HUMANA DE BLUMENAU, SANTA CATARINA, BRASIL

Schüler, C. M.<sup>1</sup>, Imianovsky, U.<sup>2</sup>, Jordano R.<sup>3</sup>, Reiter, M. G. R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Alumna del Curso de Ciências Biológicas <sup>2</sup>Mestrando en Ciência y Tecnología de Alimentos <sup>4</sup>Professora Laboratório de Microbiologia, Campus III. Rua São Paulo, 2171, 89012-001 – Dpto. de Ciências Naturales, Centro de Ciências Exatas y Naturales de la Universidade Regional de Blumenau, SC- Brasil <sup>3</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Grupo Microbiología de los Alimentos), Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14071Córdoba, (Spain)

**- Introducción y Objetivos**

La leche materna, debido a sus propiedades inmunológicas, nutricionales, endocrinológicas y emocionales (vínculo madre-bebé), está considerada como el alimento ideal para niños en los seis primeros meses de vida (SCHANLER et al., 1999; GIUGLIANI, 2000; TOMA y MONTEIRO, 2001; CARVALHO y TAMEZ, 2002). La calidad microbiológica de la leche humana distribuida por los bancos de leche humana es muy importante para la salud de los neonatales (ROSA, 1990; ALMEIDA, 1999). El objetivo de este trabajo es verificar la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche materna, cruda, pasterizada y procedentes del *lactarium* (ofrecida a los bebés en la UTI pediátrica).

**- Material y Métodos**

Las muestras procedían del Banco de Leche Humana (BLH) de Blumenau, Santa Catarina, Brasil. Se llevaron a cabo tres diluciones decimales que se inocularon en agar Baird-Parker (Merck) y se incubaron a 36±1°C durante 48 h. Posteriormente las colonias sospechosas fueron evaluadas morfológicamente y se inocularon en tubos que contenían caldo infusión corazón cerebro (Merck) incubándose 24 h a 36±1°C. De las colonias típicas se llevaron a cabo pruebas bioquímicas (catalasa y coagulasa) identificándose mediante el sistema API Staph (bioMérieux).

**- Resultados y Discusión**

Se detectó la presencia de *S. aureus* en las 40 muestras de leche cruda analizadas (100%), oscilando de  $4 \times 10^1$  a  $> 6,50 \times 10^6$  UFC/mL, lo que pone de manifiesto la importancia de las orientaciones de higiene a las donantes de leche y la necesidad de una adecuada pasterización. En 14 muestras de leche pasterizada (35%) también se constató *S. aureus*, entre  $1 \times 10^1$  y  $7,70 \times 10^2$  UFC/mL. De las muestras procedentes del *lactarium*, 11 (27,5%) resultaron positivas, variando de  $1 \times 10^1$  a  $3,25 \times 10^5$  UFC/mL. En seis muestras la pasterización eliminó la bacteria, pero se produjo una contaminación posterior que pudo haber sido provocada por los manipuladores de la leche. Ello evidencia la necesidad de unas buenas prácticas de higiene de los manipuladores de leche materna. La totalidad de las colonias fueron identificadas por el Sistema API. En leche cruda, 12 pertenecían al género *Staphylococcus*; 13 fueron identificadas como *S. aureus* y 2 como *S. chromogenes* y *S. capitis*, respectivamente; 1 positiva para el género *Micrococcus*; 6 para *Micrococcus lylae*; 2 para *Kocuria rosea*; 1 para *S. caprae* y 3 para *S. epidermidis*. En leche pasterizada, 6 fueron positivas para *Staphylococcus*; 2 positivas para *S. aureus* y 1 para *K. roseae*. En las muestras procedentes del *lactarium*, 2 fueron positivas para *Staphylococcus* y 2 para *S. aureus*. La capacidad de diseminación de las cepas de *S. aureus* se conoce desde hace décadas así como sus consecuencias para los sistemas sanitarios en todo el mundo (BARRETT, 1997; COTTER et al., 1997; KLUYTMANS et al., 1997). Por otra parte, la inadecuada pasterización de la leche además de comprometer las propiedades beneficiosas de la leche humana ordeñada incrementa su susceptibilidad para contaminaciones subsiguientes (BJORKSTÉN et al., 1990).

**- Conclusiones**

Los resultados mostraron un alto grado de contaminación de la leche cruda por *S. aureus*. Igualmente se evidenció que en general la pasterización fue eficaz. No obstante, la recontaminación producida, en algunos casos, pone de manifiesto que deben mejorarse las medidas de higiene por parte de los manipuladores. La presencia de otros estafilococos también es indicadora de contaminación de la leche. La pasterización es de vital importancia para garantizar la calidad

higiénico-sanitaria en los bancos de leche humana. Finalmente, los datos obtenidos en el presente trabajo fueron puestos a disposición del BLH para su discusión.

#### **- Agradecimientos**

El presente trabajo forma parte de un proyecto mayor financiado por FAPESC (Fundación de Apoyo a la Pesquisa del Estado de Santa Catarina) y beca PIPE (Universidad Regional de Blumenau, SC, Brasil).

Al BLH de Blumenau, en especial a Maria Goreti Dassoler por su colaboración con las muestras.

#### **- Referencias Bibliográficas**

ALMEIDA, J.A.G. Brasil perde 180 milhões de litros de leite materno no Rio. Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. 3-5, 1999.

BARRETT, S. P. MRSA pathogenicity and bacteremia. J. Hosp. Infect. 37: 171-172, 1997.

BJORKSTÉN, B.; BURMAN, LG.; CHATEV, P.; FREDRIKZON, B.; GOTHEFORS, L.; HERNELL, O. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? BMJ; 281:765-9, 1980.

CARVALHO, M. R. de; TAMEZ, R. Amamentação: bases científicas para a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

COTTER, L.; LYNCH, M.; CRYAN, B.; GREER, P. & FANNING, S. Investigation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak in an Irish hospital: triplex PCR and DNA amplification fingerprinting. J. Hosp. Infect. 36: 37-47, 1997.

GIUGLIANI, E. O aleitamento materno na prática clínica. Pediatr. , v. 76, p. 238-252, 2000.

KLUYTMANS, J.; VAN-BELKUM, A. & H. VERBRUGH. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. 10: 505-520, 1997.

ROSA, C.A.; NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; HAGLER L.C.; HAGLER A.N. Yeasts from human milk collected in Rio de Janeiro, Brazil. Microbiol; 21:361-3.,1990.

SCHANLER, R. J.; O`CONNOR, K. G.; LAWRENCE, R. Pediatricians practices and attitudes regarding breastfeeding promotion. Pediatrics, v. 103, p. 35-40, 1999.

TOMA, T. S.; MONTEIRO, C. A. Avaliação da promoção do aleitamento materno nas maternidades públicas e privadas do Município de São Paulo. Rev. Saúde Pública, v. 35, p. 409-414, 2001.

**MODELIZACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN LECHE MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE BACTERIOFAGOS COMO AGENTES DE BIOCONTROL**

**Obeso, J<sup>1</sup>, Martínez, B<sup>1</sup>, Arroyo-López F.N<sup>2</sup>, Garrido-Fernández, A<sup>2</sup>, García, P<sup>1</sup>, Rodríguez, A<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, España*

<sup>2</sup>*Instituto de la Grasa (IG-CSIC). Dpto. de Biotecnología de Alimentos, Sevilla, España*

**Introducción y Objetivos**

El control de la contaminación por *Staphylococcus aureus* tiene particular relevancia en la industria alimentaria debido a la capacidad de algunas cepas para producir enterotoxinas termorresistentes y otros factores de virulencia que pueden causar intoxicaciones alimentarias (de Buysy y col., 2001). Este microorganismo ha sido identificado como agente causante del 13,9% de los casos de intoxicaciones relacionadas con el consumo de quesos y del 11,1% relacionadas con el consumo de leche en España (Anonymous, 2003)

Una alternativa prometedora para inhibir específicamente el desarrollo de *S. aureus* en los alimentos es el uso de *bacteriófagos* dado que actúan como agentes bactericidas, induciendo la lisis de las bacterias hospedadoras (Hudson y col. 2005). Entre las características de los bacteriófagos que favorecen su uso como agentes de biocontrol cabe destacar su inocuidad y su alta especificidad, no afectando a la microbiota normal del individuo ni a las células del organismo (Hudson y col. 2005).

En este contexto, hemos aislado y caracterizado 2 fagos líticos ( $\Phi 88$  y  $\Phi 35$ ) que infectan cepas de *S. aureus* aisladas en ambientes lácteos. La mezcla de estos fagos es activa frente a *S. aureus* en leche (García y col. 2007).

Con objeto de optimizar la utilización de bacteriófagos como agentes de biocontrol, hemos estudiado la evolución de *S. aureus* en leche pasteurizada a diferentes temperaturas, en presencia de diferentes concentraciones de fagos ( $\Phi 88$  +  $\Phi 35$ ), durante un período de 8 h. La mortalidad bacteriana a las 8 h (respuesta) fue descrita mediante un modelo matemático predictivo secundario que permite predecir la inhibición ejercida por una mezcla de bacteriófagos sobre *S. aureus* en diferentes condiciones térmicas.

**- Material y Métodos**

La cepa *S. aureus* Sa9) se usó como contaminante de la leche en los diferentes ensayos, como hospedador para la propagación de los bacteriófagos  $\Phi 35$  y  $\Phi 88$  (37°C; agitación) y como cepa indicadora para determinar el título fágico (UFP/ml) (García y col., 2007).

El medio utilizado para el cultivo de la cepa bacteriana y la propagación de los bacteriófagos fue medio 2xTY (Sambrook y col., 1989). Los recuentos de viables se llevaron a cabo en el medio selectivo Agar Baird Parker suplementado con yema de huevo-telurito (Scharlab).

Las preparaciones concentradas de fagos se obtuvieron mediante precipitación de los sobrenadantes de cultivos lisados, mediante la adición de polietilenglicol (PEG) 8000 y de NaCl a concentraciones finales del 10% p/v y 0,5 M, respectivamente, y centrifugación en gradiente de ClCs (Sambrook y col., 1989).

Para la elaboración del modelo predictivo se utilizaron los datos de mortalidad (*respuestas*) obtenidos en ensayos en leche, definidos por distintas combinaciones de las variables (factores) *temperatura* (15-37°C), *contaminación bacteriana inicial* ( $10^4$ - $10^6$  UFC/ml) y *concentración de bacteriófagos añadida* ( $10^2$ - $10^8$  PFU/ml). El programa **Design Expert 6.06** fue utilizado para definir las distintas combinaciones de las variables, y los programas **General Lineal Model** y **General Regression Model** para realizar el análisis de regresión de los datos experimentales. La respuesta (% mortalidad) fue descrita como un modelo de regresión polinómica en función de los factores considerados, utilizando el método de los mínimos cuadrados. Se obtuvo así una ecuación polinómica de segundo grado que se representó gráficamente (modelo de superficie de respuesta). La bondad del ajuste del modelo se evaluó mediante la significación de la *p* del test de Fischer ( $p < 0.05$ ).

**- Resultados y Discusión**

La evolución en leche pasteurizada de *S. aureus* y de la mezcla de fagos fue estudiada durante un período de 8 h. La mortalidad bacteriana (%) observada a las 8 h en diferentes ensayos ha sido descrita mediante la siguiente ecuación polinómica:  $M = -125,86 + 5,96 \cdot x + 28,76 \cdot y - 0,745 \cdot xy$ , donde **M** es la mortalidad, **x** es la temperatura e **y** es  $\log_{10}$  concentración de fagos. Las interacciones

de los dos factores sobre la mortalidad bacteriana se reflejan gráficamente en una superficie de respuesta (Figura 1), donde las líneas representan los valores de mortalidad estimados y los símbolos los valores de mortalidad real obtenidos en los ensayos experimentales

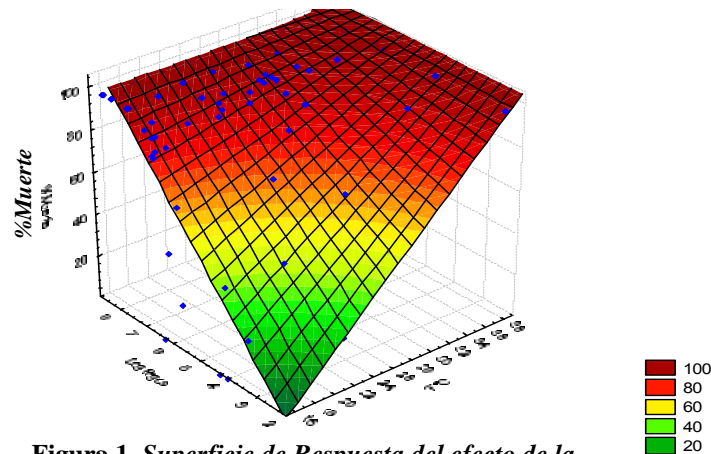


Figura 1. Superficie de Respuesta del efecto de la concentración de bacteriófagos y de la  $t^a$  sobre la mortalidad de *S.aureus* en leche

#### - Conclusiones

El modelo predictivo desarrollado que define la mortalidad bacteriana como una función de los efectos de temperatura y la concentración de fagos y de la interacción entre ambos.

Concentraciones elevadas de bacteriófagos ( $\geq 10^7$  UFP/ml) permiten “desinfectar” leche contaminada por *S. aureus* en el rango de temperatura estudiado (15-37°C), independientemente de la contaminación bacteriana inicial.

#### - Referencias Bibliográficas

- [De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V.](#), 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol.* 67(1-2):1-17.
- Anonymous. (2003). European Commission, Health & Consumer Protection. Directorate-General, 26–27 March. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses.
- Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G (2005). Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J Food Prot.* 68(2):426-37.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A., (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal* 17:1232-1239.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

## DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN ENSALADAS Y PREPARADOS CÁRNICOS LISTOS PARA SU CONSUMO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EXTREMADURA

**Rodríguez, M., Casado, E.M., Sánchez, B., Andrade, M.J., Gordillo, R. y Córdoba, J.J.**  
*Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10071  
Cáceres, marrodri@unex.es*

### Introducción y objetivos

*Listeria monocytogenes* es uno de los microorganismos patógenos más importantes relacionados con enfermedades de origen alimentario, se caracteriza por tener un alto poder de infección, con dosis infectivas inferiores a 1000 células. *L. monocytogenes* origina la listeriosis que afecta fundamentalmente a mujeres embarazadas, ancianos, enfermos de cáncer y personas inmunodeprimidas; sin embargo investigaciones recientes hacen referencia a una nueva modalidad de listeriosis no invasiva asociada con gastroenteritis que puede afectar a personas sanas (Aureli y col., 2000; Cocolin y col., 2005). Los estudios epidemiológicos revelan que la fuente más frecuente de llegada de este microorganismo a los alimentos es la contaminación cruzada en las plantas de procesado, este hecho junto con la particularidad de que *L. monocytogenes* prolifera en un amplio rango de temperaturas, incluidas las de refrigeración, predisponen a los alimentos que tienen una mayor manipulación y comercializados en refrigeración como posibles causantes de listeriosis. En este sentido, entre los alimentos más frecuentemente implicados en casos de listeriosis están los productos listos para el consumo como ensaladas, preparados cárnicos y productos lácteos.

Los reglamentos relativos a la seguridad alimentaria en la mayor parte de los países no permiten la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos listos para su consumo. Desde el año 2006 el reglamento de la Unión Europea nº 2073/2005 ha introducido el límite máximo permitido de este microorganismo en alimentos listos para su consumo en 100 ufc/g.

Con este estudio se pretende evaluar el peligro de la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo como ensaladas y preparados cárnicos expendidos en la Comunidad Autónoma de Extremadura.

### Material y Métodos

Se han analizado 514 muestras tomadas en superficies comerciales entre diferentes ensaladas mixtas de hortalizas crudas y preparados cárnicos loncheados (jamón curado, lomo curado, jamón cocido, pechuga cocida de pavo, etc.).

Las muestras de cada producto se han tomado por triplicado, en diferentes épocas del año. Los muestreos se realizaron en varias superficies comerciales de la Comunidad Autónoma de Extremadura y en estaciones de servicio de la región. Los productos fueron mantenidos en refrigeración hasta su análisis, que se realizó antes de la fecha de caducidad del producto.

La detección y recuento de *L. monocytogenes* se ha realizado en todas las muestras siguiendo la Norma ISO 11290-1 y 11290-2. También se han analizado las muestras mediante la metodología propuesta por Martín y col., 2007, utilizando conjuntamente las técnicas de ácidos nucleicos (PCR) y las técnicas inmunológicas (separación inmuno-magnética con partículas imantadas con anticuerpos anti-*Listeria*)

Los resultados obtenidos con las técnicas de microbiología clásica fueron confirmados con la técnica de PCR, para ello se tomó 1 ml del homogeneizado obtenido de cada muestra en el caldo Semi Fraser, después de ser incubado a 30°C durante 24 h. Posteriormente se recuperaron los microorganismos presentes mediante la utilización de Dynabeads específicos para *L. monocytogenes*

### Resultados y Discusión

Las ensaladas mixtas listas para el consumo mostraron los niveles más altos de muestras positivas con un porcentaje importante de muestras con recuentos superiores a  $10^2$  ufc/g (Tabla 1). Si bien en los productos cárnicos se observó una menor incidencia de *L. monocytogenes* que en

ensaladas, destaca la contaminación detectada en los productos cocidos loncheados y en algunos de los productos de corto tiempo de maduración. No se detectó en cambio, *L. monocytogenes* en productos cárnicos loncheados de más larga maduración como jamón curado

Tabla 1. Porcentaje de muestras en las que se detectó *L. monocytogenes* a niveles superiores a  $10^2$  ufc/g.

Producto	% muestras con <i>L. monocytogenes</i>
Ensaladas mixtas listas para consumo	12,18
Pechuga cocida de pavo loncheada	2,1
Mortadela loncheada	-
Jamón cocido loncheado	1,85
Bacon loncheado	-
Lomo Sajonia/adobado loncheado	11,76
Salchichón loncheado	3,17
Salami loncheado	-
Chorizo loncheado	-
Jamón curado loncheado	-
Lomo curado loncheado	3,7

### Conclusiones

La investigación de *L. monocytogenes* en ensaladas mixtas y productos cárnicos listos para su consumo revela la presencia de este patógeno en un número relevante de muestras en las ensaladas y en algunos de los productos cárnicos loncheados y envasados, con niveles superiores a  $10^2$  ufc/g.

Hay peligro de *L. monocytogenes* en ensaladas listas para el consumo, y por tanto deberían extremarse las medidas de higiene en la preparación de estos productos.

El protocolo de PCR optimizado permite la detección sensible de *L. monocytogenes* en un tiempo inferior a 2,5 horas, frente a los métodos clásicos que tardan varios días en confirmar el resultado.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico (Proyecto 3PR05A106) y por la Consejería de Sanidad y Consumo de la Junta de Extremadura

### Referencias Bibliográficas

- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. y Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342, 1236-1241.
- Cocolin L., Stella, S.I, Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C. y Comi, G. (2005). Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 167-178
- Martín., R., Sánchez, B., Casado, E.M., Córdoba, J.J. y Rodríguez, M. (2007). Desarrollo de métodos de PCR para la detección sensible y específica de *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla

**SECUENCIACIÓN AMINOACÍDICA E IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA RP42C DE UNA CEPA DE *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*.**

**Rodríguez A., Nuñez F., y Asensio M. A.**

*Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad, s/n, 10071, Cáceres, andreama@unex.es.*

**Introducción y Objetivos.**

En los últimos años se ha desarrollado ampliamente la investigación para la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos para aplicaciones en diversos campos como la medicina con el tratamiento contra las micosis, o en agricultura para prevenir la aparición de mohos en plantas. En lo que se refiere a la higiene de los alimentos, estos compuestos se podrían emplear para la prevención del desarrollo de mohos toxigénicos en los productos alimenticios.

A partir de una cepa de *Penicillium chrysogenum* aislada de jamones madurados se purificó una proteína de aproximadamente unos 6,5 kDa (Acosta, 2006) con potente actividad antifúngica frente a mohos toxigénicos tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium restrictum* y *Penicillium griseofulvum*, de la que hasta ahora se había estudiado su actividad, comportamiento en diferentes condiciones y en presencia de distintos compuestos, punto isoelectrico, peso molecular, etc.

Para continuar con la caracterización de dicha proteína RP42C habría que obtener diversas secuencias aminoacídicas que nos permitan diseñar cebadores para identificar el gen que codifica para la misma.

El objetivo principal del presente estudio es la obtención de la secuencia de ADN que codifica la proteína antifúngica RP42C para obtener más información sobre la misma y enfocar futuras investigaciones en su actividad, lo cual a su vez se facilitaría pudiendo expresar la proteína de forma más rápida y en mayor concentración en microorganismos como *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*.

**Material y Métodos.**

En primer lugar se llevó a cabo la secuenciación aminoacídica de la proteína RP42C con un espectrómetro de masas Micromasswaters Q-TOF2. Se sometió a la proteína a una reducción mediante dithiothreitol, una alquilación con iodoacetamida y posterior digestión enzimática. Las digestiones se realizaron con las proteasas tripsina, quimotripsina y endoproteinasa GluC (Lee, D.G., 1999). Tras obtener distintas secuencias aminoacídicas, se introdujeron las mismas en bases de datos (BLASTP) para buscar homologías con otras proteínas.

Tras la obtención de varias secuencias aminoacídicas se diseñaron cebadores con la menor degeneración posible para amplificar mediante la técnica de PCR parte del gen que codificara la proteína objeto de estudio. Los productos obtenidos en la reacción se purificaron a partir del gel, se ligaron al vector pCR2.1-TOPO, se clonaron en células transformantes de *E.coli* de las cuales se purificaron los plásmidos y se secuenciaron.

Una vez conocida parte de la secuencia del gen que codificaba para la proteína RP42C, se procedió a la técnica RACE-PCR (amplificación rápida de extremos de ADN complementario) para la obtención de los extremos 5' y 3' del gen (Marx, F., 1995). Para ello se extrajo el ARN del moho tras 5 días en agitación a 26°C en medio extracto de malta. Posteriormente se procedió a la obtención del ADN complementario para la RACE-PCR del extremo 5' y ADN complementario para la RACE-PCR del extremo 3' mediante transcripción reversa en la que se incluyeron dos adaptadores distintos, específicos de los extremos 5' y 3', para introducir en esas zonas secuencias que sean reconocidas por los cebadores universales empleados para la posterior amplificación. Se diseñaron cebadores específicos de la región del gen conocida de la proteína RP42C y se realizaron las dos reacciones de RACE-PCR por separado para la obtención de los extremos 5' y 3'. Finalmente se clonaron los fragmentos obtenidos en la reacción y se secuenciaron.

### Resultados y Discusión.

Dado que la proteína RP42C tiene un peso molecular muy bajo, de unos 6,5kDa, su secuencia de aminoácidos es corta y ello complica el encontrar distintas secuencias aminoacídicas. No obstante, al emplear distintas enzimas de digestión se consiguieron secuencias aminoacídicas de gran valor. Las bases de datos BLASTP mostraron que la proteína antifúngica RP42C tenía alta homología con otras proteínas de bajo peso molecular, especialmente con la proteína antifúngica Anafp de *Aspergillus Niger* (Lee, D.G., 1999).

Mediante el diseño de los cebadores degenerados se consiguió amplificar un fragmento de ADN de unas 70 pares de bases que se secuenció y que también tenía homología con la correspondiente a la proteína de bajo peso molecular Anafp de *Aspergillus Niger*.

Posteriormente mediante el diseño de dos cebadores específicos, uno para la obtención del extremo 3' del gen y otro para la obtención del extremo 5' del gen, se han purificaron dos bandas de cada reacción de las cuales dos de ellas parecen corresponderse en tamaño con lo esperable tanto para el extremo 5' (banda de unas 220pb) como para el 3' (banda de unas 120pb). Actualmente se están secuenciando dichas bandas y se analizarán las secuencias que permitirán diseñar nuevos cebadores necesarios para la amplificación del gen completo.

### Conclusión.

La información obtenida permite esclarecer que RP42C se trata de una nueva proteína a partir de *Penicillium chrysogenum* con homología con la proteína de bajo peso molecular Anafp de *Aspergillus Niger* y que dada su gran actividad antifúngica es importante seguir investigando sobre ella.

### Referencias Bibliográficas.

1. Acosta, R. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura, junio de 2006.
2. Lee, G.D., S.Y. Shin, C.Y. Maeng, Z.Z. Jin, K.L. Kim y K.S. Hahm (1999). Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 646-651.
3. Marx, F., Haas, H., Reindl, M, Stöfflet, G., Lottspeich, F. and Redl, B. (1995). Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene.* 167: 167-171.

### Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2004-06546-ALI del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el FEDER. Andrea Rodríguez es beneficiaria de una beca de FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## **VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN DEL *Enterococcus faecalis* MEDIANTE ACIDIFICACIÓN**

**Rodríguez. M.R. Aguirre J.S. y García de Fernando G.D.**

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid.

### **Introducción y objetivo**

Los consumidores se decantan cada vez más por los alimentos mínimamente procesados porque su calidad organoléptica es mejor y su valor nutritivo mayor. No obstante, estos productos conllevan un riesgo microbiológico mayor, ya que, por regla general, las condiciones de su procesado no son tan intensas como las convencionales. Las operaciones conservantes suelen combinar diferentes operaciones, como tratamientos térmicos, shock osmótico, aditivos o acidificación. Estas operaciones no tienen por qué perseguir la esterilidad comercial del alimento y, en el caso particular de los mínimamente procesados, es muy posible que los criterios de esterilidad comercial (si es que se intentara conseguir) sean menos estrictos. Por tanto, es de esperar que la incidencia microbiana en estos alimentos sea mayor que en los que han recibido tratamientos convencionales, aunque es muy posible que la carga microbiana inicial en tales alimentos sea muy escasa, de una o pocas más células viables por envase. Un factor a considerar y que gana relevancia en estas condiciones es la variabilidad del comportamiento microbiano. Todos los individuos de una población no responden igual ante un proceso conservante. Una mayor comprensión de esta variabilidad ayudaría a la industria a ajustar más las condiciones de sus procesos para alcanzar objetivos microbiológicos concretos. Además, conocer la variabilidad de la inactivación microbiana debe redundar en una mejora de los modelos de destrucción microbiana, tanto patógenos como alterantes, en los alimentos.

Por todo lo expuesto, el objetivo planteado es el estudio de la variabilidad de la inactivación de *Enterococcus faecalis* mediante tratamientos acidificantes subletales.

### **Material y Métodos**

Cepa: *Enterococcus faecalis* LM24

Sustratos: Tampón citrato 0,1 N y caldo de pollo; el pH de este último se ajustó con ácido acético.

Se trabajó con setenta y cinco tubos para cada uno de los lotes que recibía tratamiento acidificante y 10 para los lotes control (pH 7,0). Todos se inocularon con *E. faecalis* y se mantuvieron al pH de estudio (3,59 tampón citrato y 2,80 caldo de pollo,) durante los tiempos necesarios para lograr 2, 3 y 4 reducciones decimales. Los valores D en esos medios y a esos pHs son: 6,6 min. y 6,95 min., respectivamente.

Una vez transcurridos los tiempos establecidos, se tomó una alícuota de 0,1 ml de muestra de cada tubo y se depositó en un eppendorf con 0,9 ml de tampón fosfato 0,2 N, pH 7,0, estéril, con el objetivo de detener el tratamiento de inactivación. Posteriormente se sembró una alícuota en agar soja tripticasa (TSA) con la ayuda de un equipo de siembra en espiral (Eddy Jet TelStar AV-100) y se incubó a 37° C. Tras 48 horas de incubación, los supervivientes se enumeraron en un analizador de imagen (Counter Flash). Los recuentos de los supervivientes obtenidos, se procesaron con el programa VariFit (cedido por el Computacional Microbiology Group of the Institute of Food Research, Norwich, Inglaterra), obteniéndose unas distribuciones normales.

### **Resultados y Discusión**

Como era de esperar, los tratamientos acidificantes provocaban la inactivación de los microorganismos, aunque la disminución del número de supervivientes no concordó exactamente con la teórica, deducida de los valores D calculados previamente. Esta observación se aprecia sobre todo en el tratamiento acidificante 4D en caldo de pollo, en el que se logró una reducción de 3,58 (en términos de ciclos logarítmicos). Es probable que esta divergencia se deba a la inherente resistencia de esta bacteria ante las condiciones adversas y al prolongarse los tratamientos, los supervivientes sean capaces de adaptarse y mantenerse viables. De todas maneras, en los dos sustratos estudiados se ha observado un incremento de la variabilidad en el número de supervivientes al intensificarse el tratamiento de inactivación. En la Figura 1 puede observarse como las barras de error aumentan en

longitud conforme la reducción decimal del número de supervivientes aumenta. Este incremento de la variabilidad al intensificarse el tratamiento conservante concuerda con lo hallado en otras investigaciones en las que se ha analizado la variabilidad de *E. faecalis*<sup>1, 2</sup>, *Listeria innocua*<sup>1, 2</sup>, *Pseudomonas fluorescens*<sup>3</sup> y *Salmonella Enteritidis*<sup>4</sup> ante tratamientos térmicos<sup>2</sup>, de irradiación<sup>1, 3</sup> y acidificantes<sup>4</sup> en diferentes sustratos, incluyendo leche<sup>2</sup> y jamón cocido<sup>1, 3</sup>.

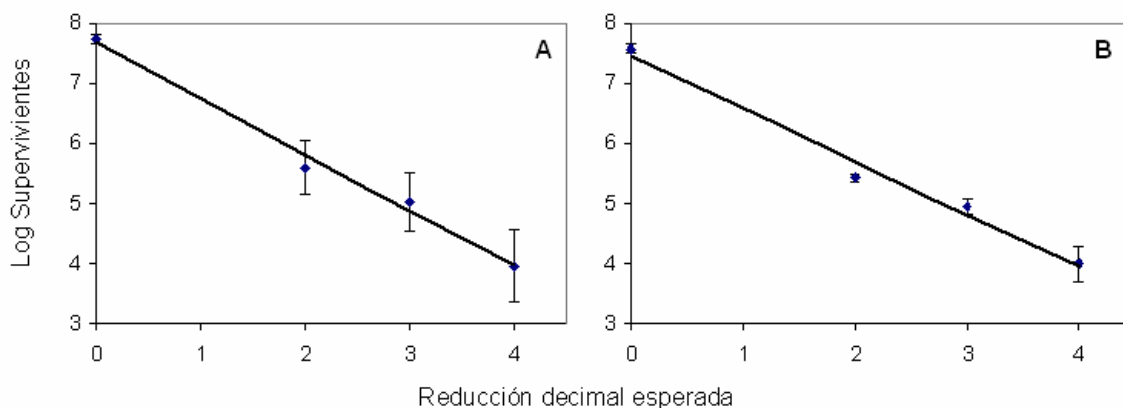


Figura 1. *Enterococcus faecalis* supervivientes en tampón citrato 0,1 N, pH 3,59 (A) y caldo de pollo / ácido acético, pH 2,80 (B). Se muestran las medias de 75 muestras  $\pm$  desviación estándar.

### Conclusiones

La demostrada generalización de que la intensificación de los tratamientos conservantes subletales provoca una mayor variabilidad en el número de supervivientes obliga a considerar esta variabilidad como un factor importante a la hora de diseñar los procesos de conservación de los alimentos y determinar su vida útil, así como estimar su potencial peligrosidad. Un ejemplo quizás ayude a comprender la magnitud de la cuestión. Sea un producto con una carga de un patógeno de  $10^3$ /envase. Se le aplica un tratamiento 5D. Teóricamente sobreviviría 1 patógeno cada 100 envases, pero, asumiendo una variabilidad de  $\pm 1$  ciclo logarítmico, la realidad es que podría existir un patógeno cada 10 o cada 1000 envases –considérese que esta variabilidad no es exagerada-. La industria debe contemplar esta posibilidad y calcular la variabilidad inherente a su procesado.

### Agradecimientos.

Los autores agradecen las subvenciones recibidas para los proyectos, AGL-2005-01239, Consolider CSD2007- 0016 y S- 0505/AGR-0314 (CAM).

### Bibliografía

1. Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. (2007). Variability of the *Listeria innocua* and *Enterococcus faecalis* inactivation in ham by irradiation. 5<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Foods. Athens, 16th-19th September. p. 307.
2. Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. (2007). Variability of the *Listeria innocua* and *Enterococcus faecalis* inactivation in milk by heating treatment. 5<sup>th</sup> International Conference on Predictive Modelling in Foods. Athens, 16th-19th September. p.339.
3. Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. (2008). Variabilidad de la inactivación de *Pseudomonas fluorescens* mediante irradiación. XIII CYTALIA, Madrid, 9-11 de Abril.
4. Rodríguez, M.R., Aguirre, J.S., García de Fernando, G.D. (2008). Variabilidad de la inactivación de *Salmonella* Enteritidis mediante la acidificación. XIII CYTALIA, Madrid, 9-11 de Abril.

**PELIGROS EN LA FABRICACION Y ENVASADO DE ZUMO DE NARANJA.**

**Romero López Mª V., Sánchez Ariza M.J.**

*Distrito Almería. Servicio Andaluz de Salud*

**Introducción:**

El APPCC es un sistema probado que aplicado correctamente, garantiza que la seguridad de los alimentos esta debidamente gestionada. Permite centrarse en la seguridad del producto como prioridad más importante y planificar para evitar el decidir como controlar un problema esperando su aparición.

**Objetivo:**

- Estudio del Sistema APPCC en una industria de fabricación y envasado de zumo de naranja del Distrito Almería.
- Comprobar que todos los peligros microbiológicos han sido identificados y controlados.

**Material y Métodos:**

La primera información se obtuvo del censo de industrias que deben ser controlados por el Distrito Almería .Esta industria es la única de este sector del Distrito .Se han realizado varias visitas a la industria la primera de ellas fue presentación y visita de las instalaciones. Las posteriores han sido de revisión de la documentación del sistema APPCC. Desde el primer momento se ha contado con el apoyo y autorización por parte de la industria para poder realizar este trabajo.

**Resultados:**

Una vez que tenemos el diagrama de flujo que incluye todas las etapas del proceso en el orden correcto, hemos continuado con el análisis de peligros tal y como se describe en el Principio1 del APPCC que lo hemos plasmado en la siguiente tabla:

TABLA DEL ANALISIS DE PELIGROS

ETAPA DEL PROCESO	PELIGROS	PELIGRO	MEDIDA DE CONTROL	
<b>Recepción</b>				
	Físicos..	Residuos : hojas, piedras	Lavado en la llegada	
			Selección visual.	
	Químicos	Plaguicidas	Proveedores certificado ecológico	
	Microbiológicos	Mohos, levaduras, Bacterias.	Posterior pasteurización	
<b>Desaireación</b>				
	Químico	Oxidación	Ausencia de luz y oxígeno	
<b>Pasteurización</b>				
	Físico	Partículas metálicas	Filtros	
	Químicos	Residuos de detergentes del lavado	Medir pH	

	Microbiológico		Medida de temperatura	
<b>Enfriamiento</b>				
	Químicos	Propilenglicol del refrigerante	Visual, es azul, hay una cámara de agua entre medio	
<b>Almacenamiento</b>				
	Físicos		filtros	
	Microbiológico	Que fermenten por distintas causas	Control de presión	

**Conclusiones:**

En el estudio se ha comprobado que el sistema APPCC esta implantado y que lo esta de forma correcta y que todos los peligros microbiológicos están bajo control, debido entre otras a los siguientes factores: la dirección de la empresa se implica desde el inicio, el personal tiene formación información y experiencia sobre seguridad alimentaria, el equipo utilizado esta debidamente calibrado, los productos defectuosos son identificados y controlados debidamente y se verifica regularmente el sistema por medio de auditorias.

**Referencias Bibliográficas**

- Reglamento (CE) 852/2004, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.
- Reglamento (CE) 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

**CARACTERIZACIÓN DE UN MICROORGANISMO ADECUADO PARA LA VALIDACIÓN DE PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN DE ALIMENTOS INFANTILES**

**Ros-Chumillas, M.<sup>1</sup>, Antolinos, V.<sup>1</sup>, Romero, F.<sup>2</sup>, Abellán, P.<sup>2</sup>, Periago, P.M.<sup>1</sup> y Fernández, P.S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA), Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena, pablo.fernandez@upct.es

<sup>2</sup>Instituto de Nutrición Infantil Hero Baby, Alcantarilla (Murcia), España.

**Introducción y objetivos**

La conservación por esterilización de los alimentos es un tratamiento comúnmente usado en la industria alimentaria. En los alimentos infantiles es necesario aplicarlo con controles muy estrictos, para asegurar un elevado grado de seguridad en el producto final, debido a que van destinados a consumidores que se pueden considerar “población especialmente susceptible”.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar a un microorganismo indicador que permitiera validar los tratamientos térmicos aplicados a estos productos. Para ello, se realizó un estudio de la resistencia térmica del microorganismo *Bacillus sporothermodurans* en un alimento infantil. Una vez caracterizado en condiciones isotérmicas, se expuso a perfiles de temperatura no isotérmicos que simulaban los tratamientos de autoclaves comerciales. Para ello, se utilizó este microorganismo como elemento sensor en ITT’s microbiológicos, lo que permitió llevar a cabo validaciones del tratamiento térmico aplicado.

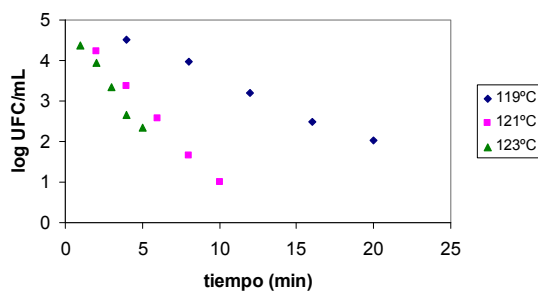
**Materiales y métodos**

La termorresistencia se determinó en un termorresistómetro Mastia (patente 200302529), en alimento infantil que contenía pescado, en condiciones isotérmicas a distintas temperaturas (119, 121 y 123°C). Se obtuvieron las curvas de supervivencia y se calcularon los valores D a las distintas temperaturas. A partir de los valores D se obtuvo la curva TDT, de tiempo de muerte térmica, calculándose el valor z del microorganismo en este sustrato.

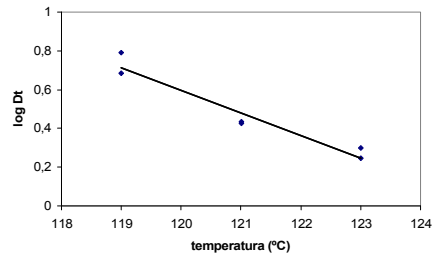
**Resultados y discusión**

Los valores obtenidos, tanto D como z, indicaron que se trataba de un microorganismo adecuado para validar el proceso de esterilización que se iba a llevar a cabo. El valor z obtenido en concreto fue de 8,8°C, próximo al de *C. botulinum* (10°C) por lo que se consideró suficientemente próximo para interpretar los valores de F<sub>0</sub> alcanzados.

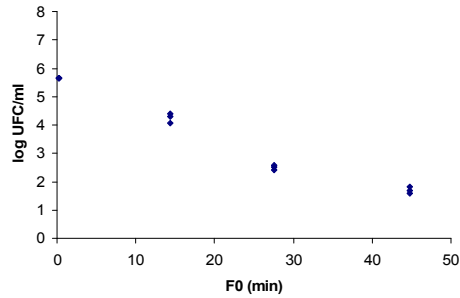
Una vez caracterizado el microorganismo, se procedió a elaborar integradores tiempo temperatura inoculados con *Bacillus sporothermodurans*. Para establecer la validez de este sistema, se introdujeron los ITT’s en el termorresistómetro Mastia y se sometieron a perfiles de calentamiento no isotérmico, que simulaban la evolución de temperatura en el interior de los autoclaves de la empresa alimentaria. Una vez completado el tratamiento, se recuperaban y se procedía a la enumeración de los supervivientes. Se aplicaron valores de F<sub>0</sub> entre 15 y 45 min, para establecer la linealidad en la sensibilidad al calor de este sistema de validación biológica (Figura 3).



**Figura 1.** Curvas de supervivencia de *Bacillus sporothermodurans* en alimento infantil (pescado) a las temperaturas de tratamiento indicadas.



**Figura 2.** Curva TDT de *Bacillus sporothermodurans* suspendido en alimento infantil a distintas temperaturas.



**Figura 3.** Validación de los ITTs en el termorresistómetro Mastia, sometiendo las partículas suspendidas en alimento infantil a distintos valores de  $F_0$ .

### Conclusiones

Se apreció una buena correlación entre los valores de  $F_0$  alcanzados y los calculados a partir de registros de temperatura, por lo que se consideró que el sistema era adecuado para la validación de las autoclaves utilizadas para la esterilización de alimentos infantiles.

### Referencias bibliográficas

Periago, P.M., van Zuijlen, A., Fernández, P.S., Klapwijk, P.M., ter Steeg, P.F., Corradini, M.G., Peleg, M. 2004. *International Journal of Food Microbiology*. 95:205-218.

**ESTUDIO DE LAS CONDICIONES HIGIENICO SANITARIAS COMO FACTOR DE RIESGO MICROBIOLÓGICO EN INDUSTRIAS DEL SECTOR HARINAS Y DERIVADOS**

**Sánchez Ariza M.J., Romero López M.V.**

*Distrito Almería. Servicio Andaluz de Salud.*

**Introducción**

Atendiendo al número de industrias alimentarias, las dedicadas a la elaboración de productos de panadería-pastelería están dentro de las principales en el Distrito Sanitario Almería. En Andalucía es el segundo sector alimenticio con mayor número de industrias inscritas en el Registro Sanitario de Alimentos durante el año 2005. Para obtener productos alimenticios seguros deben seguirse una serie de normas de higiene que comprometen a la totalidad de la empresa, desde las instalaciones hasta el personal de cuyos conocimientos en higiene y manipulación de alimentos va depender, entre otros, el aumento del riesgo microbiológico en el producto final.

**Objetivos**

- Conocer la situación higiénica sanitaria de las industrias del sector harinas y derivados del Distrito Sanitario Almería, en los años 2006 y 2007
- Identificar y comparar las causas que originan las situaciones higiénico sanitarias deficientes en los años 2006 y 2007
- Orientar las actuaciones de control oficial para mejorar las condiciones higiénico sanitarias de estos establecimientos.

**Material y métodos**

Estudio descriptivo de los datos aportados por la Red Básica de Información Alimentaria (ReBIA) relativo a la actividad inspectora en industrias de harina y derivados ubicadas en Distrito Sanitario Almería, en los años 2006 y 2007. La ReBIA es un sistema de información y registro en Seguridad Alimentaria y todas las actividades derivadas del Control Oficial tienen su reflejo en estas partes, cada inspector con frecuencia bimensual emite un parte de ReBIA en el que se informa el número de establecimientos censados en su zona de trabajo, número de establecimientos inspeccionados, visitas que ha realizado de inspección, número total de actas emitidas y número de actas positivas ( actas con deficiencias ), además debe indicar las causas de las actas positivas, es decir deficiencias detectadas en cuanto a condiciones higiénicas de los locales, condiciones higiénicas de personal, higiene de la manipulación, condiciones higiénicas del almacenaje, condiciones higiénicas del transporte y deficiencias en cuanto al etiquetado y otros , incluyendo en este apartado las deficiencias referidas a los sistemas de autocontrol. En este estudio se recopilan los datos emitidos por cada uno de los inspectores del Distrito Sanitario Almería referidos a industrias del sector harinas y derivados durante los años 2006 y 2007.

**Resultados.**

Durante el año 2006 se inspeccionaron 176 establecimientos, se levantaron un total de 235 actas de inspección de las cuales el 41% fueron positivas y en el año 2007 se inspeccionaron 194, se emitieron un total de 204 actas, 40% fueron positivas.

<b>Causas de las deficiencias sanitarias</b>	<b>Año 2006</b>	<b>Año 2007</b>
Condiciones higiénico sanitarias de locales	43%	39%
Condiciones higiénicas del personal	7 %	11%
Condiciones de manipulación	10%	11%
Condiciones del almacenamiento	13%	13%
Condiciones higiénicas del transporte	2%	9%
Etiquetado y otros	25%	17%

### **Discusión y conclusiones**

En los años 2006 y 2007 no hubo variación en el porcentaje de actas positivas. Dentro de las causas de las deficiencias predominan las referidas a las condiciones higiénico sanitarias de los locales con igual incidencia en ambos años, seguido del etiquetado y otros donde se incluyen las deficiencias de los sistemas de autocontrol. Existen pequeñas diferencias de las causas detectadas entre los dos años del estudio, por un lado hay una ligera disminución en el año 2007 de las causas debidas a la higiene de los locales y al etiquetado y por otro hay un aumento en el 2007 de las causas debidas al personal, a la higiene en la manipulación y al transporte, manteniéndose igual en los dos años las deficiencias debidas a las condiciones higiénicas del almacenamiento.

El control oficial debe incidir en la mejora de las condiciones higiénicas de los locales y del cumplimiento de los sistemas de autocontrol.

### **Referencias bibliográficas**

- Real Decreto 1137/1984 de 28 de marzo por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para fabricación, circulación y comercio de pan y panes especiales
- Real Decreto 2419/78 de 19 de mayo por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de productos de confitería pastelería, bollería y repostería.
- Reglamento (CE) 852/2004, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.

## PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN CANALES DE PORCINO Y AVE DE UN DISTRITO SANITARIO

Sánchez J.A.<sup>1</sup>, Vinuesa F.M.<sup>1</sup>, Castell C.<sup>2</sup>, Guigosa P.<sup>3</sup>, Raya, A.<sup>1</sup>, López A.<sup>1</sup>, Martínez M.A.<sup>1</sup>, Líndez B.<sup>1</sup>, Collado V.I.<sup>1</sup> y Rodríguez A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Salud Pública / <sup>3</sup>Área de Epidemiología. Distrito Sanitario Metropolitano. Servicio Andaluz de Salud. C/ Gustavo Doré, 3 – Bajos. 18015, Granada, [jasanchez33@gmail.com](mailto:jasanchez33@gmail.com)

<sup>2</sup>Área de Microbiología. Laboratorio Agroalimentario de Atarfe. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Avda. de la Diputación, s/n, 18230 Atarfe (Granada).

### - Introducción y Objetivos:

La carne y los productos cárnicos son fuentes importantes de agentes zoonóticos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*. Todos estos patógenos pueden habitar el tracto gastrointestinal de los animales productores de alimentos y ser transferidos a los alimentos durante los procesos de sacrificio, transformación, manipulación y consumo<sup>1</sup>.

En el año 2006 se notificaron al Sistema de Información Microbiológica 5117 casos de salmonelosis, 5883 casos de campilobacteriosis, 375 casos de yersiniosis y 78 casos de listeriosis. Aunque el número de casos producidos por *Y. enterocolitica* y *L. monocytogenes* es menor, las enfermedades pueden ser más severas, sobre todo en la población de riesgo<sup>1,2</sup>.

El objetivo del presente trabajo es determinar en canales de porcino la prevalencia de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* y en canales de ave la prevalencia de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Campylobacter* spp.

### - Material y Métodos:

Se seleccionaron 6 mataderos del Distrito Sanitario Metropolitano de Granada (4 mataderos de porcino y 2 mataderos de aves). Durante los meses de abril a mayo se tomaron 60 muestras de canales de porcino y 30 muestras de canales de ave. En cada sesión de muestreo se siguieron las pautas establecidas en el Reglamento (CE) 2073/2005, empleando en las canales de porcino las directrices definidas en la ISO 17604 para el método de esponja abrasiva. Las localizaciones seleccionadas fueron en la cara interna de la canal; la zona del abdomen y en la cara externa; la zona del jamón, lomo y vientre. Las muestras, una vez acondicionadas, se introdujeron en una nevera portátil y se trasladaron al laboratorio iniciando el mismo día de la toma el correspondiente análisis. Los análisis microbiológicos se realizaron según los siguientes métodos normalizados: *L. monocytogenes*: FDA/BAM, Ed. Online.; *Campylobacter* spp.: ISO 10272-1; *Y. enterocolitica*: ISO 10273; y *Salmonella* spp.: ISO 6579. El análisis de datos se ha efectuado con el programa estadístico SPSS 15.0, calculando para cada especie animal la prevalencia y los intervalos de confianza al 95%.

### - Resultados y Discusión:

***Salmonella* spp.:** La prevalencia de *Salmonella* spp. fue 17,9%,  $I_{C_{0,95}}=[0,078 ; 0,279]$ , para las canales de porcino y 3,3%,  $I_{C_{0,95}}=[0,000 ; 0,098]$ , para las canales de ave. En la bibliografía consultada la prevalencia de salmonela en las canales de porcino está comprendida entre el 1,4%<sup>3</sup> y el 40%<sup>4</sup>, mientras que para las canales de ave el rango puede variar entre el 4%<sup>5</sup> y el 84%<sup>6</sup>. Si comparamos estos resultados con el criterio de higiene establecido en el Reglamento (CE) 2073/2005<sup>7</sup>, podemos comprobar que las canales de porcino analizadas superan los valores satisfactorios del citado criterio al poseer una prevalencia superior al 10%. Este incremento puede deberse a la elección de la superficie interna de la canal como localización de muestreo ya que la zona del abdomen es más susceptible de contaminación con restos de contenido intestinal. Estudios realizados por Sánchez *et al.*<sup>8</sup> obtuvieron una prevalencia del 2,2% en canales de porcino cuando se muestreó la superficie externa de la canal, mientras que en la superficie interna de las mismas canales la prevalencia fue del 13,3%.

Las canales de ave cumplen el criterio de higiene establecido en el citado reglamento ya que su prevalencia es inferior al 14%. El cumplimiento de este criterio era de esperar ya que las canales obtenidas procedían de manadas libres de salmonela. La contaminación pudo ser adquirida a partir de las jaulas de transporte y los equipos del matadero<sup>9</sup>.

***L. monocytogenes*:** La prevalencia de *L. monocytogenes* fue del 12,3%,  $I_{C_{0,95}}=[0,038 ; 0,208]$ , para las canales de porcino y 23,3%,  $I_{C_{0,95}}=[0,082 ; 0,385]$ , para las canales de ave. En España, la prevalencia de este microorganismo en carne fresca de porcino es del 15,2% y en carne

fresca de ave del 10,2%<sup>10</sup>. La presencia de valores elevados en canales de ave puede indicar unas prácticas higiénicas deficientes<sup>11</sup>.

**Y. enterocolítica:** Las canales de porcino presentaron una prevalencia del 1,9%,  $I_{C_{0,95}}=[0,000 ; 0,056]$ . Para este microorganismo la prevalencia puede variar desde el 0%<sup>12</sup> al 29,2%, siendo la etapa de evisceración el factor que más influye en la contaminación de las canales<sup>13</sup>.

**Campylobacter spp.:** Ninguna de las canales de ave presentó contaminación con *Campylobacter* spp. La prevalencia de *Campylobacter* spp. depende de factores como la estacionalidad, edad de los animales, tamaño de la manada, prácticas de despoblación en la manada de origen, grado de desinfección de las jaulas de transporte de los animales, prácticas higiénicas del matadero, siendo el factor más influyente las medidas de bioseguridad en la granja<sup>14-17</sup>. Muchos estudios han analizado la prevalencia de *Campylobacter* spp. en aves, estableciendo rangos entre el 3 y el 98%<sup>18</sup>. Estos valores excluyen el resultado obtenido en nuestro trabajo sin embargo, son varios los motivos que pueden explicarlo: 1) Que las canales procedan de manadas libres de *Campylobacter* spp. Rasschaert *et al.*<sup>19</sup> en 8 manadas libres de *Campylobacter* spp., no detectaron este microorganismo cuando analizaron la piel de cuello. 2) El aumento de las medidas de bioseguridad como consecuencia de la aparición de la gripe aviar y de la aplicación práctica de la legislación que ordena la avicultura de carne. 3) La estacionalidad, las muestras no se tomaron en los meses en que la prevalencia era máxima (julio y agosto)<sup>16</sup>. 4) Que los tratamientos administrados a los animales durante su cría disminuyan la prevalencia de este microorganismo. Todas las manadas fueron tratadas según su "Informe de Cadena Alimentaria" con enrofloxacin y/o colicistina y/o doxiciclinas. 5) El enfriado de las canales y el lavado externo e interno de las mismas, disminuya la prevalencia del germen<sup>20</sup>. 6) La adopción del estado "viable no cultivable" como consecuencia de su exposición al oxígeno, cambio de temperatura o no disposición de nutrientes<sup>21</sup>.

#### -Conclusiones:

**Canales de porcino:** En base a los resultados obtenidos y como consecuencia de superar los valores satisfactorios del Reglamento (CE) 2073/2005, se han de realizar mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen. **Canales de ave:** La alta prevalencia de *L. monocytogenes* indica unos altos niveles de contaminación del ambiente del matadero, por lo que se recomienda diseñar e implantar procedimientos eficaces de limpieza y desinfección de instalaciones y equipos que eviten el asentamiento y la formación de biopelículas, así como la realización de controles regulares que verifiquen su ausencia en las canales y el ambiente. La ausencia de *Campylobacter* spp. promueve la realización de nuevos estudios que determinen la prevalencia de este microorganismo a nivel de la manada y su resistencia a antibióticos.

#### -Agradecimientos:

El equipo de investigación agradece la financiación facilitada por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (P.I. 0159/07) y la colaboración del Laboratorio Agroalimentario de Atarfe dependiente de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

#### -Referencias Bibliográficas:

1. EFSA (European Food Safety Authority). *The EFSA Journal*, **2007**, 130.
2. CNE (Centro Nacional de Epidemiología). *Boletín Epidemiológico Semanal*, **2007**, 15, 109-110.
3. Botteldoorn, N.; Heyndrickx, M.; Rijpens, N.; Grijspeerdt, K.; Herman, L. *J. Appl. Microbiol.*, **2003**, 95, 891-903.
4. McDowell, S.; Porter, R.; Madden, R.; Cooper, B.; Neill, S.D. *Int. J. Food Microbiol.*, **2007**, 118, 116-125.
5. Corral, J.; González, R.; Laborda, L. *Rev. San. Hig. Pub.*, **1983**, 57, 943-947.
6. Parveen, S.; Taabodi, M.; Schwarz, J.G.; Oscar, T.P.; Harter, J.; White, D.G. *J. Food. Prot.*, **2007**, 70, 2466-2472.
7. Reglamento (CE) 2073/2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338 de 22 de diciembre de 2005.
8. Sánchez, J.A.; Marfil, R.; Serrano, S.; Diz, J.; Jodral, M. *I Congreso Iberoamericano Seg. Alimentaria*, **2006**, 19-20.
9. Rasschaert, G.; Houf, K.; De Zutter, L. *J. Appl. Microbiol.*, **2007**, 103, 333-341.
10. EFSA, **2006** Disponible en: [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/Report\\_2006\\_Spain\\_0.pdf](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/Report_2006_Spain_0.pdf).
11. Lindblad, M.; Lindmark, H.; Thisted, S.; Lindqvist, R. *J. Food. Prot.*, **2006**, 69, 2875-2882.
12. Bonardi, S.; Brindani, F.; Pizzin, G.; Lucidi, L.; D'Incau, M.; Liebana, E.; Morabito, S. *Int. J. Food Microbiol.*, **2003**, 85, 101-110.
13. Nesbakken, T.; Eckner, K.; Hoidal, H.K.; Rotterud, O.J. *Int. J. Food Microbiol.*, **2003**, 80, 231-240.
14. Allen, V.M.; Weaver, H.; Ridley, A.M.; Harris, J.A.; Sharma, M.; Emery, J.; Sparks, N.; Lewis, M.; Edge, S. *J. Food. Prot.*, **2008**, 71, 264-270.
15. Pattison, M. *J. Appl. Microbiol.*, **2001**, 90, 121S-125S.
16. Romero, P.; Reiersen, J.; Lowan, R.; Bisailon, J.R.; Michel, P.; Fridriksdóttir, V.; Gunnarsson, E.; Stern, N.; Berke, O.; McEwen, S.; Martin W. *Prev. Vet. Med.*, **2006**, 74, 264-278.
17. Hansson, I.; Plym, L.; Gustafsson, P.; Boqvist, S.; Lindblad, J.; Olsson, E.; Andersson, Y.; Vagsholm, I. *J. Food. Prot.*, **2007**, 70, 2008-2014.
18. Han, K.; Jang, S.; Choo, E.; Heu, S.; Ryu, S. *Int. J. Food Microbiol.*, **2007**, 114, 50-59.
19. Rasschaert, G.; Houf, K.; De Zutter, L. *J. Food. Prot.*, **2006**, 69, 27-33.
20. Smith, D.P.; Northcutt, J.K.; Musgrove, M.T. *Int. J. Poult. Sci.*, **2005**, 4, 955-958.
21. Park, S.F. *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**, 74, 177-188.

PREDICCIÓN DEL CRECIMIENTO DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS EN EXTRACTO DE PIMENTÓN EN FUNCIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE AGUA

Marín S., Colom C., Sanchis, V. y Ramos, A.J.

Dpto. de Tecnología de Alimentos, ETSEA, Universidad de Lleida. 25198, Lleida [smarin@tecal.udl.cat](mailto:smarin@tecal.udl.cat)

**Introducción y Objetivos**

El pimentón es un condimento en polvo obtenido a partir del secado y molido de determinadas variedades de pimientos rojos, de amplio consumo a nivel español. Es precisamente en la fase de secado cuando los pimientos son especialmente susceptibles al ataque fúngico. Posteriormente, el almacenamiento y distribución del producto acabado deberá asegurar el mantenimiento de niveles de humedad seguros.

En pimentón se han encontrado niveles de aflatoxina B<sub>1</sub> de hasta 11,2 µg/kg y hasta 154 µg/kg de aflatoxinas totales. Recientemente, el análisis de 100 muestras de pimentón resultó positivo en todos los casos para aflatoxina B<sub>1</sub> (<0,025-40,9 µg/kg) (Aydin et al., 2007). El reglamento 1881/2006 de la Comisión de 19/12/2006 fija un contenido máximo en *Capsicum* spp. de 5 µg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub>, y de 10 µg/kg de la suma de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Se han aislado cepas de *Aspergillus flavus* de pimentón, de las cuales aproximadamente un 45% eran productoras de aflatoxinas (Elshafie et al., 2002).

Las condiciones de crecimiento de las especies aflatoxigénicas han sido ampliamente estudiadas, sin embargo no existen estudios relativos al crecimiento sobre pimentón. Numerosos trabajos han aplicado modelos cinéticos a la predicción del crecimiento de especies aflatoxigénicas en diferentes sustratos, sin embargo, raramente se han aplicado modelos de probabilidad. El objetivo del presente trabajo es aplicar modelos matemáticos a la predicción del crecimiento de cepas aflatoxigénicas sobre pimentón en función de la actividad de agua/humedad del sustrato.

**Material y Métodos**

Se utilizaron dos cepas de *A. flavus* previamente aisladas de pimentón picante, con probada capacidad para producir aflatoxinas.

Se preparó medio agar con un 3% de extracto de pimentón y se le añadió glicerol a la concentración suficiente para conseguir niveles de actividad de agua de 0,99, 0,97, 0,95, 0,93, 0,91, 0,89, 0,87 y 0,85. Se repartieron los medios en placas de Petri de 9 cm, y se inocularon centralmente con suspensiones de esporas de una u otra cepa. Se incubaron a 25°C y se realizaron medidas periódicas de los diámetros de crecimiento de las colonias. Se realizaron 3 repeticiones sucesivas del experimento completo.

Modelos cinéticos. La modelización primaria se llevó a cabo utilizando el modelo de Baranyi y Roberts (1994). Una vez obtenidos los parámetros velocidad de crecimiento (µ) y fase de latencia (λ) se realizó la modelización secundaria de dichos parámetros en función de la actividad de agua. Para ello se aplicó el modelo de Rosso et al. (2001):

$$\mu\left(\frac{1}{\lambda}\right) = \frac{\mu_{opt} (a_w - a_{w(max)}) (a_w - a_{w(min)})^2}{(a_{w(opt)} - a_{w(min)}) [(a_{w(opt)} - a_{w(min)}) (a_w - a_{w(opt)}) - (a_{w(opt)} - a_{w(max)}) (a_{w(opt)} + a_{w(min)} - 2a_w)]}$$

µ<sub>opt</sub>: velocidad de crecimiento en condiciones óptimas

a<sub>w(max)</sub>: actividad de agua máxima que permite crecimiento

a<sub>w(min)</sub>: actividad de agua mínima que permite crecimiento

a<sub>w(opt)</sub>: actividad de agua en que µ= µ<sub>opt</sub>

Modelos de probabilidad. Se asignaron los valores 0 y 1 a aquellos tiempos de incubación en que no se observó, o se observó crecimiento, respectivamente. Estos datos se modelizaron usando regresión lineal logística para determinar la frontera de presencia/ausencia de crecimiento. La ecuación de segundo orden utilizada fue:

$$\text{Logit } P = \ln(P/(1-P)) = b_0 + b_1 a_w + b_{11} a_w^2 + \text{tiempo} + \text{tiempo}^2$$

Donde P es la probabilidad de crecimiento (en el intervalo 0 a 1), y b, son los coeficientes a estimar.

### Resultados y Discusión

El modelo de Rosso se ajustó adecuadamente a los datos obtenidos de velocidad de crecimiento ( $R^2=0,98-0,99$ ;  $MSE=0,3-0,7$ ) y fase de latencia ( $R^2=0,72-0,93$ ;  $MSE=0,01-0,18$ ) (Fig. 1). Las estimaciones obtenidas a partir de dicho modelo fueron las siguientes:  $a_{w(max)}=0,99-1,00$ ;  $a_{w(min)}=0,82-0,88$ ;  $a_{w(opt)}=0,97-0,99$ .

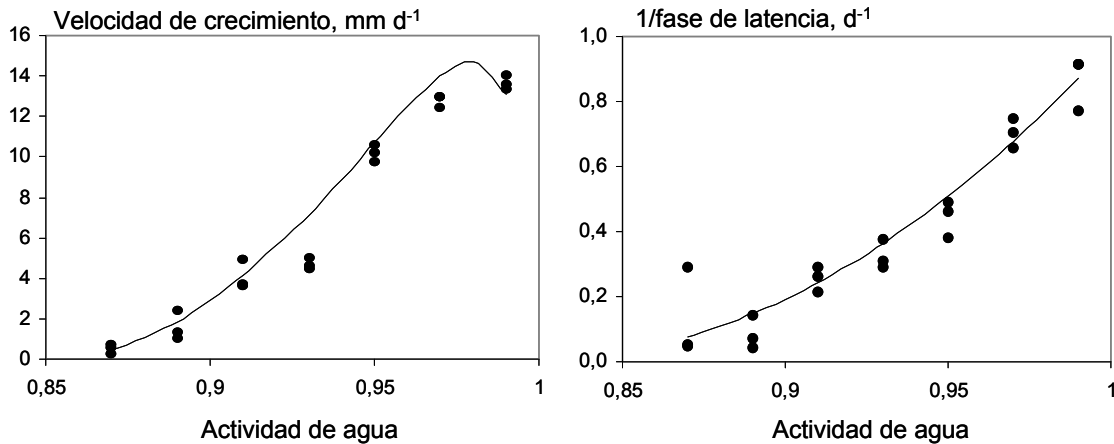
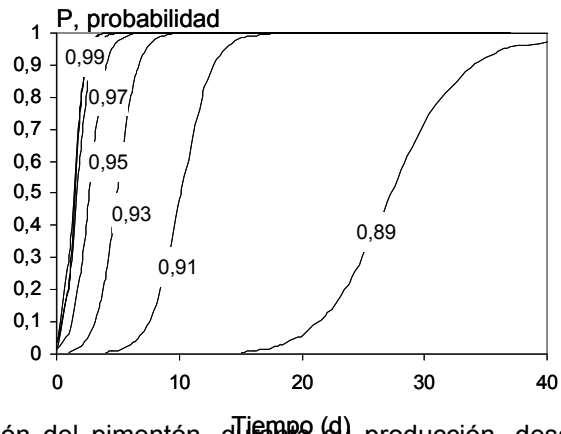


Figura 1. Ajuste del modelo de Rosso a los parámetros de crecimiento de *Aspergillus flavus* sobre medio a base de pimentón.

Por otra parte, la regresión lineal logística mostró como a  $0,91a_w$  había más de un 90% de probabilidad que el crecimiento ocurriera tras 12-14 días, mientras que a  $0,89a_w$  sería tras más de un mes, y que la probabilidad que se diera el crecimiento de estas cepas aflatoxigénicas era prácticamente nula a  $0,87a_w$  (Fig. 2).

Figura 2. Probabilidad de crecimiento de *Aspergillus flavus* sobre pimentón a diferentes niveles de actividad de agua,  $R^2=0,92$ .



### Conclusiones

Teniendo en cuenta las curvas de sorción del pimentón, durante su producción, desde el secado hasta su comercialización se han de minimizar o evitar los períodos de tiempo con valores de humedad de alrededor de 24-26% de cara a la prevención de la aparición de aflatoxinas.

### Referencias Bibliográficas

- Aydin A, Erkan ME, Baskaya R, Ciftcioglu G. 2007. Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. Food Control 18, 1015-1018.
- Baranyi J, Roberts, TA. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23, 277-294.
- Elshafie AE, Al-Rashdi TA, Al-Bahry SN, Bakheit CS. 2002. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. Mycopathologia 155, 155-160.
- Rosso L, Robinson TP. 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. Int. J. Food Microbiol. 63, 265-273.

**Agradecimientos:** Al MEC, proyectos AGL2004-06413ALI y AGL2007-66416-C05-03, por el apoyo económico.

## OCRATOXINA A EN PLASMA DE DONANTES DE SANGRE DE LA PROVINCIA DE LLEIDA

Sanchis V., Coronel M.B., Peris J., Ramos A.J. y Marín S.

Dpto. de Tecnología de Alimentos, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria, Universidad de Lleida. XaRTA, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198, Lleida.

### - Introducción y Objetivos

La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario producido por los mohos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* y *Penicillium verrucosum* en diferentes alimentos. Es nefrotóxica, hepatotóxica, inmunosupresora y carcinogénica en animales. La OTA está clasificada como posiblemente carcinógena (grupo 2B) por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC). Además ha sido considerada en la etiología de la Nefropatía Endémica de los Balcanes (Petkova-Bocharova y Castegnaro, 1991) y está asociada con la aparición de tumores en el tracto urinario (Smith y col., 1994). Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la exposición a la OTA de donantes de sangre residentes en la provincia de Lleida mediante la determinación de la concentración de OTA en plasma, y evaluar las diferencias en concentraciones de OTA según el género de los donantes y según su edad.

### - Material y Métodos

Las muestras se obtuvieron durante las campañas de donación de sangre en los meses de Marzo y Abril de 2008, en las poblaciones de Lleida, Torà, Balaguer, Almacelles, Tárrega y Alcarràs. Los donantes (59 mujeres y 59 hombres) accedieron a donar una cantidad adicional de sangre para este estudio. El plasma se separó dentro de las seis horas posteriores a la extracción de la sangre mediante centrifugación a 1000 g durante diez minutos y a 4° C. La OTA se extrajo del plasma según el procedimiento publicado por Zimmerli y Dick (1995) con algunas modificaciones: la muestra se acidificó con una solución de ácido ortofosfórico 0,5 M y cloruro de sodio 2M y se extrajo la toxina dos veces con cloroformo. Se procedió a la evaporación del solvente orgánico mediante rotavapor. El extracto seco obtenido se resuspendió en PBS:acetonitrilo (95:5) para su limpieza por columna de inmunoafinidad (Ochraprep, R-Biopharm Rhône LTD, Escocia), procediendo según el protocolo suministrado por el fabricante. Tras la purificación, las muestras se analizaron mediante HPLC. El método de extracción y cromatografía se validó en nuestro laboratorio obteniendo un porcentaje de recuperación del 77,24% y un coeficiente de variación del 23%. El límite de detección fue de 0,075 ng OTA/mL plasma.

### - Resultados y Discusión

El análisis de los resultados se realizó teniendo en cuenta el sexo y la edad de los donantes. La clasificación por edad se hizo en los intervalos: 18 a 29 años (grupo A), 30 a 44 años (grupo B) y 45 a 65 años (grupo C). Además se definieron los intervalos de concentración (ng OTA/mL plasma): 0 a 0,5, > 0,5 a 1, > 1 a 2, > 2 a 4, > 4 a 6, > 6 a 8 y > 8 a 10 para determinar las frecuencias de las concentraciones en los grupos antes mencionados.

Se detectó OTA en el 99,15% de las muestras, es decir, sólo en una persona del total analizado la concentración en plasma de OTA fue menor que el límite de detección. Los valores mínimo y máximo obtenidos fueron 0,075 ng/mL y 8,682 ng/mL, respectivamente. Sin embargo, se observaron diferencias en la distribución de la concentración de OTA en plasma según la edad y sexo de los individuos. El 72,8% de las muestras en global presentaron niveles de OTA inferiores a 1ng/mL, mientras que el 92,37% de los individuos presentó concentraciones de hasta 2 ng/mL de OTA en plasma. Las únicas personas en cuyo plasma se detectó OTA en concentraciones superiores a los 4 ng/mL fueron hombres del grupo A (7,69% de los mismos) y mujeres del grupo C, las cuales a su vez presentaron concentraciones de OTA superiores a los 6 ng/mL (8% de las mismas).

Otros estudios realizados en España indican la presencia de la OTA en las poblaciones de Granada (Pérez de Obanos y col. 2001), Madrid (Burdaspal y Legarda 1998) y Navarra (Jimenez y

col. 1998), con incidencias del 72%, 100% y 53,3% en personas sanas. Sin embargo, las incidencias dependen del límite de detección del método utilizado en cada laboratorio: 0,22 ng/mL, 0,02 ng/mL y 0,52 ng/mL, respectivamente.

#### **- Conclusiones**

Los resultados de este estudio muestran el alcance de la exposición de la población de Lleida a la OTA. Puesto que un 7,63% de la población presentó niveles mayores que 2 ng/mL de OTA en plasma, sería interesante relacionar las distintas concentraciones de OTA en plasma con los hábitos alimentarios de los individuos ensayados.

#### **- Referencias Bibliográficas**

Burdaspal P.A. y T.M. Legarda 1998. Datos sobre la presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria* 292:103-110.

Jimenez A.M., Lopez De Cerain A., Gonzalez-Peñas E., Bello J., Betbeder A.M., Creppy E.E. 1998. Exposure to Ochratoxin A in Europe: Comparison with a region of Northern Spain. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews* 17(4):479-91.

Pérez de Obanos A., López de Ceraín A., Jiménez A.M., González Peñas E., Bello J. 2001. Ochratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. *Revista de Toxicología* 18(1):19-23.

Petkova-Bocharova T., Castegnaro M. 1991. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC scientific publications* (115):135-7.

Smith J.E., Lewis C.W., Anderson J.G. and Solomons G.L. (1994). *Mycotoxins in Human Nutrition and Health*. European Commission: Agro-industrial Research Division.

Zimmerli B, Dick R. 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 666(1):85-99.

#### **- Agradecimientos**

Los autores agradecen al "Banc de Sang i Teixits" de Lleida su colaboración en la recolección de muestras.

## DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CRIBADO MULTIMATRIZ PARA LA DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS

Mata, L., Sanz, D., Razquin, P.

ZEU-Inmunotec, S.L., Zaragoza (España)

### Introducción y objetivos

Debido a sus repercusiones en la Salud Pública, así como sobre algunos procesos tecnológicos de fermentación, la detección de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos tiene una gran importancia (OMS, 2001). En su detección se suelen aplicar, en un primer paso, los denominados test microbianos de cribado o *screening*, dada la gran variedad de residuos que pueden encontrarse presentes en los alimentos de origen animal. Explorer es un test cualitativo, sencillo y rápido para la detección de antibióticos, desarrollado para el cribado de carnes frescas. La posibilidad de analizar distintas matrices alimentarias (vísceras, huevos, piensos..) con un mismo test, conferiría una gran versatilidad al kit, permitiendo al usuario aplicarlo a la matriz más adecuada en cada momento, y simplificando el coste del ensayo.

Los objetivos de nuestra investigación fueron:

4. Adaptar el protocolo de utilización de Explorer para su aplicación a otras matrices (huevos, hígado, riñón, piensos).
5. Evaluar la sensibilidad del test Explorer para cada una de las matrices citadas frente a distintos antibióticos.

### Material y métodos

**Muestras y patrones:** Los antibióticos en este estudio fueron suministrados por Sigma (tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, neomicina, gentamicina, tilosina, eritromicina, amoxicilina, cefalexina, lincomicina, florfenicol). En cada ensayo, a partir de soluciones madre (1 mg/ml) se prepararon las diluciones correspondientes de cada uno de los antibióticos utilizados. Se comprobó previamente la ausencia de residuos de antibióticos en las muestras de vísceras, huevos y piensos empleados en el estudio.

**Protocolos:** El protocolo optimizado para riñón consiste, básicamente, en un calentamiento de una porción de la víscera (5 g, incluyendo corteza y médula) durante 4 minutos al baño maría, centrifugar el fluido obtenido (3'-2000 g), obteniéndose la muestra lista para el ensayo. En el caso del hígado, una porción de unos 10 g se calienta durante 12 minutos al baño maría, seguido de una centrifugación (2000 g-3') y una dilución final con una solución especial de dilución (muestra:solución=2:1). Para analizar huevo, es preciso batir homogéneamente yema y clara, diluir con agua desionizada (huevo:agua=1:3) y calentar al baño maría (12'). Finalmente, en el caso del pienso, es preciso diluir el pienso con PBST (1g/20ml), homogenizar adecuadamente y centrifugar (2000 g-15').

**Procedimiento:** Explorer es un test basado en la inhibición del crecimiento microbiano, que se presenta en formato de placa microtiter, cuyos pocillos contienen un medio de cultivo específico con esporos de un bacilo termófilo y un indicador de óxido-reducción. Hay que aplicar en cada pocillo 100 µl de muestra, y difundir durante 30 minutos a 65°C. Es necesario realizar un lavado con agua desionizada tras la difusión, y posteriormente incubar a 65°C. Durante la incubación a 65°C, se produce el crecimiento del microorganismo, reduciendo el medio y provocando el viraje del indicador de un color azul a naranja. Si la muestra contiene una concentración de inhibidores superior al límite de detección del test, se inhibe el crecimiento del microorganismo, impidiendo de esta forma el viraje del colorante. Los resultados fueron interpretados con un criterio fotométrico ( $abs_{590\text{ nm}} - abs_{650\text{ nm}}$ ): se consideraron como positivas aquellas muestras cuya absorbancia fue superior a la del control negativo más un factor de 0,15. En todos los casos, se consideró como umbral de sensibilidad para cada antimicrobiano la menor concentración evaluada en la que al menos el 90% de sus réplicas eran consideradas como positivas (mínimo 8 réplicas en cada ensayo).

## Resultados y discusión

La sensibilidad de Explorer frente a distintos antimicrobianos en las distintas matrices evaluadas se ilustra en la tabla 1. Por lo que respecta a las vísceras, el test exhibió una excelente sensibilidad para la mayoría de antibióticos evaluados: Explorer detectó la presencia de concentraciones de estos antimicrobianos en los niveles exigidos por la legislación (LMR UE). En el caso de las tetraciclinas, el comportamiento fue heterogéneo: en el caso del hígado, sí que se detectaron concentraciones del nivel del LMR de doxiciclina, pero no así de tetraciclina y oxitetraciclina (umbral fue de 2xLMR); en riñón, por el contrario, todas las tetraciclinas evaluadas fueron detectadas a los niveles del LMR. Por tanto, Explorer podría ser utilizado como test de cribado para todos los antibióticos investigados en riñón, atendiendo a los requisitos de la (2002/657/CE).

En el caso de los huevos, el test mostró una adecuada sensibilidad para macrólidos y aminoglucósidos, detectando concentraciones del nivel del LMR; en cambio, resultó menos sensible a las tetraciclinas, no detectando los niveles exigidos por la legislación.

Finalmente, por lo que respecta al pienso, no se puede relacionar la sensibilidad del test con las exigencias legales, puesto que no existen LMR para piensos. Según algunos laboratorios, los test empleados deberían ser capaces de detectar concentraciones de 2-10 ppm de estos compuestos, cantidades que corresponden al 1-5 % de las menores dosis de antibióticos incorporadas en los piensos (~ 200 ppm). A la vista de los resultados observados, Explorer cubriría estas exigencias para la totalidad de antibióticos testados.

Actualmente existen técnicas muy diversas para la detección y cuantificación de residuos de quinolonas en distintas matrices alimentarias. Se han desarrollado técnicas microbiológicas de cribado/postcribado, más asequibles y sencillas, aunque en la práctica presentan una serie de inconvenientes: laboriosidad, difícil interpretación de los resultados, necesidad de mantener cultivos frescos, etc (Calderón y col., 1996).

## Conclusiones

EXPLORER se ha mostrado como un test sencillo y rápido para el cribado de antibióticos en diferentes matrices alimentarias (hígado, riñón, piensos y huevo). Su adecuada sensibilidad permite detectar en estas matrices la mayoría de los antibióticos testados en los niveles exigidos por la legislación. Además, en el caso del riñón, su excelente sensibilidad de acuerdo a los LMR establecidos hace posible su empleo como método oficial de cribado.

Su facilidad de uso, la posibilidad de interpretar fotométricamente los resultados, unido a su razonable sensibilidad y versatilidad convierten a Explorer en una útil herramienta para el cribado de antimicrobianos en distintas matrices alimentarias.

	HÍGADO		RIÑÓN		HUEVOS		PIENSO (*)
	bovino	LMR (UE)	bovino	LMR (UE)	gallina	LMR (UE)	
Tetraciclina	600	300	400	600	700	200	
Oxitetraciclina	600	300	400	600	700	200	8000
Doxiciclina	200	300	200	600			1500
Neomicina	200	500	400	5000	400	500	1000
Gentamicina	200	200	250	750			2000
Tilosina	50	100	50	100	100	200	1500
Eritromicina	75	200	100	200	100	150	2000
Amoxicilina	15	50					100
Cefalexina			600	1000			8000
Lincomicina	300	500	200	1500			4000
Florfenicol	3000	3000					

Tabla 1: Límites de detección (µg/Kg o ppb) de Explorer en hígado bovino, riñón bovino, huevos y pienso. (-): no hay LMR para esa matriz y ese compuesto; (\*) no hay LMR establecidos para pienso.

## Referencias Bibliográficas

- OMS. 2001. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups.
- Calderón, V., González, J., Díez, P., Berenguer, J. A. 1996. Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solutions of antimicrobials. Food Addit Contam 13(1), 13-9.
- Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23 del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados.

**ESTUDIO DE CAMPYLOBACTER EN CARNE Y PREPARADOS DE CARNE DE AVE A LO LARGO DE LA CADENA ALIMENTARIA EN LA COMUNIDAD DE MADRID (2005/2007)**

**Otero, C., García, S., Alonso, M., Jiménez, A.**

*Dirección General de Ordenación e Inspección. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid*

**Introducción**

La campilobacteriosis es actualmente la zoonosis más frecuente en humanos siendo el consumo de alimentos una de las principales vías de infección humana. Las aves constituyen el reservorio más importante de *Campylobacter*. Frecuentemente, las especies de *Campylobacter* se encuentran en la flora intestinal de aves comerciales, salvajes y de cría, sin que éstas presenten sintomatología clínica. El Real Decreto 1940/2004 <sup>1</sup>, incluye al *Campylobacter* como uno de los agentes zoonóticos causantes de zoonosis que se transmiten por los alimentos que deben ser objeto de vigilancia en las diferentes fases de la cadena alimentaria.

**Objetivo**

Estudiar la evolución de la prevalencia del *Campylobacter* en carne y preparados de carne de ave, elaborados y/o comercializados en la Comunidad de Madrid, en las distintas fases de la cadena alimentaria (desde los Establecimientos de Sacrificio y Faenado al comercio al por menor), durante el período 2005-2007.

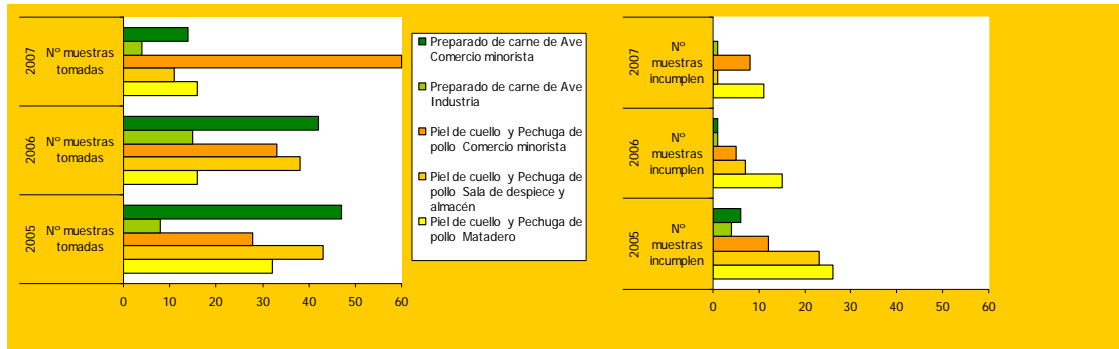
**Material y Métodos**

El estudio de la presencia de *Campylobacter* en carne de ave y preparados de carne de ave se incluye en el Programa de Vigilancia y Control de Contaminantes y Residuos en Alimentos de la Comunidad de Madrid, desde el año 2002 para carne de pollo y desde el año 2004 para preparados de carne de ave, a la vista de los altos porcentajes de implicación en brotes alimentarios.

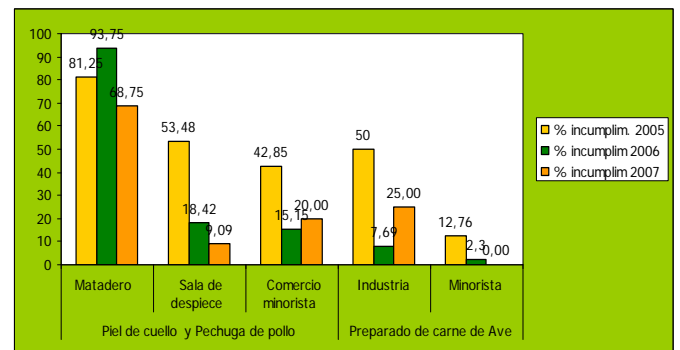
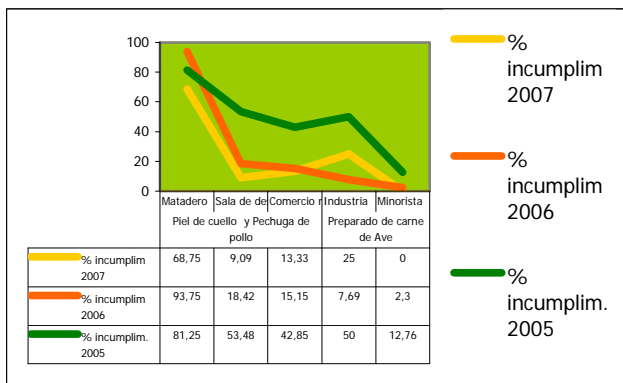
Ajustándonos al período de estudio 2005/2007, el muestreo realizado ha sido de tipo prospectivo con carácter de vigilancia:

- Carne de ave:
  - En el año 2005 se tomaron muestras de pechuga de pollo refrigerada en salas de despiece y comercio minorista, por los equipos de Áreas, con un plan de muestreo de  $n=1$ ,  $c=0$ , estando cada ejemplar de muestra formado por 150 gr. , y muestras de cuello de pollo en mataderos, por los equipos de Mataderos, con un plan de muestreo de  $n=1$ ,  $c=0$ , siendo cada ejemplar de muestra de 100 gr. (de cada canal se toman 10 gr. de piel del cuello y las muestras de 10 canales constituyen el ejemplar único de muestra).
  - En el año 2006, la única variación con respecto año anterior es que el plan de muestreo en mataderos pasa a ser  $n=5$ ,  $c=0$ .
  - En el año 2007, las modificaciones en relación al año anterior son que el plan de muestreo en salas de despiece pasa a ser  $n=5$ ,  $c=0$  y el muestreo en comercio minorista se realiza a través de un convenio con la Facultad de Veterinaria de Madrid, con el mismo plan de muestreo que en años anteriores ( $n=1$ ,  $c=0$ ).
- Preparados de carne de ave:
  - En el año 2005 las muestras se han tomado de preparados de carne de ave envasados de elaboración industrial, en industrias elaboradoras de la Comunidad de Madrid y en comercio minorista para productos elaborados fuera de la Comunidad de Madrid. Han sido tomadas por los equipos de Área, con un con un plan de muestreo de  $n=1$ ,  $c=0$ , estando el ejemplar de muestra formado por 150 gr.
  - En el año 2006 el plan de muestreo ha sido igual que en el año anterior, salvo en la cantidad que debe constituir la muestra, corresponde a 200gr.
  - En el año 2007 se mantiene el mismo plan de muestreo que en el año anterior, la única variación es que también se toman muestras en establecimientos minoristas elaboradores.

**Resultados**



**Discusión y Conclusiones**



En cada uno de los años, se observa que la presencia de *Campylobacter* en los alimentos muestreados tiene tendencia a disminuir según avanza la cadena de producción:

- Carne de pollo: matadero ► sala de despiece ► comercio minorista.
- Preparados de carne de ave: establecimiento elaborador/almacén ► comercio minorista.

No obstante, el año 2007 el muestreo de carne de pollo en comercio minorista revela un ligero incremento de la prevalencia respecto a la fase anterior, que podría deberse a un mayor número de muestras, aunque deben estudiarse los factores que hayan podido influir.

Se puede concluir que, aunque la carne de ave tiene una prevalencia elevada inicialmente en el eslabón primario de la cadena alimentaria, el nivel de contaminación va disminuyendo a medida que se acerca al consumidor final, debido, entre otras causas a la alta labilidad de este patógeno. Las condiciones ambientales ejercen un marcado efecto en la supervivencia del *Campylobacter*: el enfriamiento y mantenimiento de la cadena del frío lleva consigo una reducción considerable de la presencia este microorganismo.

**Referencias bibliográficas**

1 Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

European Food Safety Authority. Zoonoses in the European Union. 2005.

Internacional Comisión on Microbial Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods, 1. Their significance and methods of enumeration, 2ª ed. 2000. Toronto University.

Internacional Comisión on Microbial Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens. 1996. Blackie Academic & Professional.

**PREVALENCIA DE SALMONELLA ENTERICA EN HUEVOS FRESCOS PRODUCIDOS Y COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID. PERIODO 2005-2007.**

**Jiménez, A., Iñigo S., Estrada P.,Castro J.,**

*Dirección General de Ordenación e Inspección. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid*

**Introducción**

La Salmonella ha sido reconocida como un importante agente zoonótico con gran repercusión económica en personas y animales. Numerosas son las fuentes de transmisión de la Salmonella, pero una de las más frecuentes se produce a través del consumo de huevos frescos. Actualmente la Salmonella en huevos frescos no viene contemplada en la legislación vigente como criterio microbiológico específico para este tipo de alimento, sin embargo se realiza su vigilancia a través de lo establecido en el Real Decreto 1940/2004<sup>1</sup>.

**Objetivo**

Se pretende comparar la información obtenida de la prevalencia de Salmonella en los huevos producidos en nuestra Comunidad (muestreo realizado por los Servicios de Salud Pública de Áreas), con la prevalencia resultante en los huevos comercializados en la Comunidad de Madrid, pero producidos fuera de nuestro territorio en centros de embalaje ubicados en Comunidades Autónomas distintas a Madrid (muestreo realizado a través de Convenio con la Facultad de Veterinaria).

**Metodología**

**Estrategia de muestreo** Se ha seleccionado un *Plan de muestreo* según la *Clase y la Gravedad del peligro* que entraña el microorganismo, las *Condiciones previstas de manipulación y Consumo del producto*, según lo se establece el ICMSF<sup>2</sup> en su cuadro de casos. Existen 15 casos distintos de planes de muestreo cuyo rigor aumenta con la clase y el grado de peligrosidad. Teniendo en cuenta que la Salmonella en los huevos frescos supone un riesgo moderado al tratarse culinariamente, y tener además una posible dispersión por la contaminación cruzada durante su manipulación, se ha optado por un plan de muestreo por atributos de dos clases (n=5 c=0) específico para microorganismos patógenos con peligro grave o peligro moderado directo para la salud y posible propagación extensa, correspondiente al caso 10.

**Metodo de Muestreo:** Cada muestra se compone de tres ejemplares homogéneos, en los que se realiza la investigación tanto del contenido como de la cáscara. Cada muestra esta formada por 5 subunidades, y cada subunidad consta de un mínimo de 12 huevos.

**Muestreo realizado en Centros de embalaje de la Comunidad de Madrid:** Se analizan con esta metodología por tercer año consecutivo. Muestreo oficial de tipo prospectivo con carácter de vigilancia.

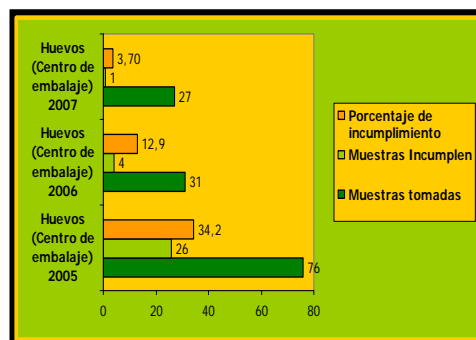
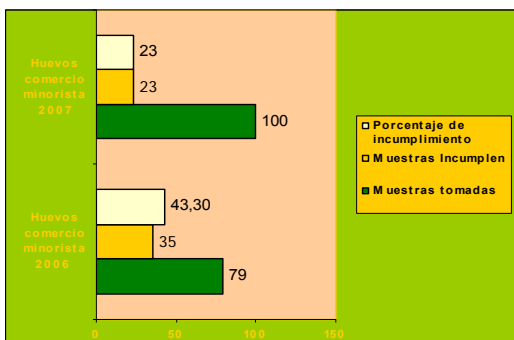
**Muestreo realizado en Comercio minorista:** se analizan por segundo año con carácter de vigilancia en comercio minorista en huevos procedentes de otras Comunidades Autónomas.

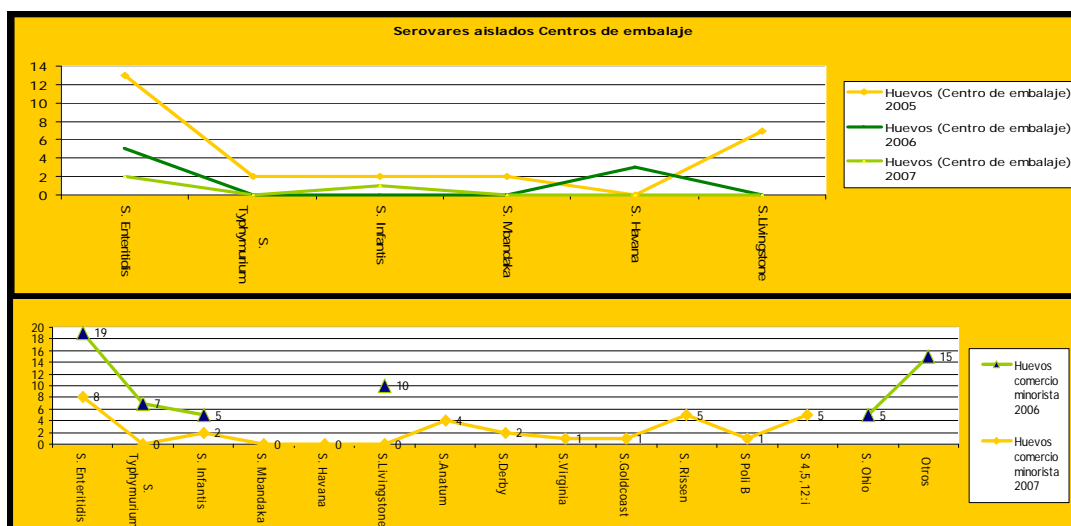
**Actuación ante Incumplimientos:**

Huevos procedentes de Centros de embalaje de la Comunidad de Madrid: Se realiza muestreo reglamentario, si éste confirma los resultados de la muestra prospectiva, se realizará la identificación de las cepas aisladas. Cuando se confirma la presencia de salmonelas zoonóticas patógenas para la salud humana se procedería a la retirada del mercado del lote de huevos impidiendo su comercialización para consumo humano directo.

Huevos procedentes de centros de embalaje de otras comunidades Autónomas: comunicación a la Autoridad competente de las Comunidad Autónoma correspondiente sobre los resultados obtenidos y la procedencia.

**Resultados**





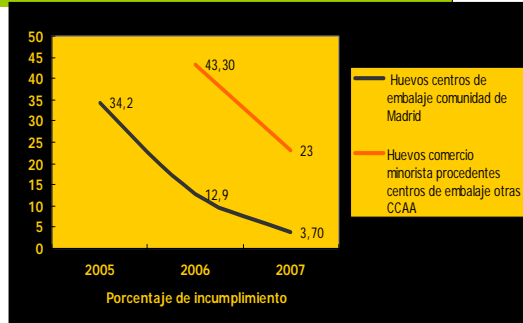
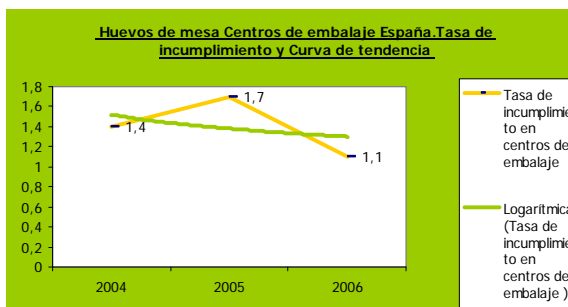
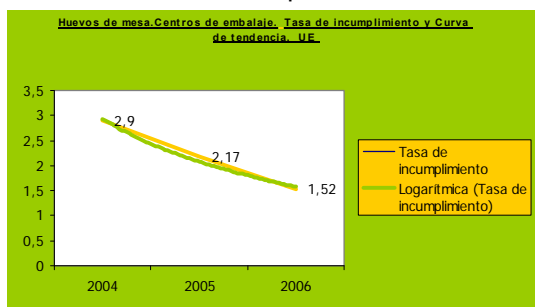
**Conclusiones**

Con las correspondientes reservas frente a la representatividad estadística por el pequeño tamaño de la muestra, se observa menor prevalencia de la Salmonella en los huevos frescos obtenidos en los centros de embalaje de la Comunidad de Madrid. Se observa un descenso de la prevalencia de la Salmonella tanto en los huevos procedentes de centros de embalajes de la Comunidad de Madrid como de los huevos procedentes de otros centros de embalaje y comercializados en nuestro territorio. El serovar más frecuente determinado corresponde en los dos casos a Salmonella enterica subespecie Enterica I, serotipo enteritidis. Curva de tendencia en disminución marcada y con comportamiento similar al informe nacional y comunitario para este microorganismo y producto.

**Discusión**

Plan de muestreo seleccionado.

Plan de inspección: plan de muestreo por atributos según porcentajes de aceptación de lotes conlleva diferentes niveles de inspección.



**Referencias bibliográficas**

1. Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
2. ICMSF (1986). Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis; principles and specific applications. T.A Roberts, F.L. Bryan, JHB Chisrtian, D. Kilsby, J.C. Olson, J.H. Siliker. University of Toronto Press, Toronto
3. Guidance Document on official controls, under Regulation (EC) N° 882/2004, concerning microbiological sampling and testing on foodstuffs.
4. The Community Summary Report on Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union, 2004,2005, 2006.
5. Codex. Directrices Generales sobre el muestreo.CAC/GL 50-2004

PREVALENCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN ALIMENTOS ELABORADOS Y  
COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID. PERIODO 2005-2007.

**Fernández M., Fernández C., Carbonero P., Jiménez A.**

*Dirección General de Ordenación e Inspección de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid*

## **Introducción**

El consumo de Alimentos Listos para el Consumo contaminados con *Listeria monocytogenes* puede constituir una fuente de infección para adquirir la Listeriosis. Esta bacteria está ampliamente distribuida en el medio ambiente pudiendo contaminar al alimento en cualquier etapa del proceso de elaboración. Su crecimiento depende del tipo de alimento así como de otros factores como tiempo y temperatura de conservación, escaso o nulo tratamiento térmico en alimentos listos para el consumo, etc.

## **Objetivo**

Conocer en distintos grupos de alimentos comercializados en la Comunidad de Madrid la prevalencia de *L. monocytogenes* y su evolución durante los años 2005, 2006 y 2007.

## **Material y Métodos**

El estudio se ha realizado comparando la tasa de incumplimientos observada en los grupos de alimentos siguientes: productos de la pesca (ahumados y anchoas en semiconserva), productos lácteos (leche pasteurizada y quesos blandos), frutas y verduras troceadas y alimentos muestreados en restauración comercial, social e industrial.<sup>1</sup>

En el año **2005** el muestreo se realizó con un plan de muestreo  $n=1$ , según normativa vigente aplicable a cada grupo de alimentos (Real Decreto 3484/2000 de comidas preparadas, Orden de 2 de agosto de 1991 de normas microbiológicas de productos de la pesca, Real Decreto 1679/94 de leche y productos lácteos y Proyecto de Reglamento de la Comisión, relativo a criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios)<sup>1</sup>.

En los años **2006 y 2007**, los muestreos fueron realizados conforme al Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión<sup>2</sup>. Los muestreos de productos de la pesca y de productos lácteos se llevaron a cabo en establecimientos elaboradores con planes de muestreo de  $n=5$  y  $c=0$ . En el grupo de frutas y verduras troceadas, se muestrearon tanto establecimientos elaboradores como no elaboradores, con planes de muestreo de  $n=5$ ,  $c=0$  y de  $n=1$ , respectivamente. Respecto al grupo de alimentos muestreados en restauración, el plan de muestreo fue de  $n=1$  en establecimientos de restauración comercial y social y en establecimientos industriales en general y fue de  $n=5$  y  $c=0$  para los establecimientos industriales de gran producción o con incumplimientos de gérmenes patógenos en años anteriores.

La aplicación del criterio microbiológico relativo a *L. monocytogenes* se ha realizado tanto en industria elaboradora como en fase de comercialización, atendiendo a las distintas categorías que establece el Reglamento 2073/2005, aplicando los límites de ausencia en 25g o 100 ufc/g.

---

<sup>1</sup> (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, Orden de 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura, Real Decreto 1679/94 por el que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos y Proyecto de Reglamento de la Comisión, relativo a criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).

<sup>2</sup> Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios

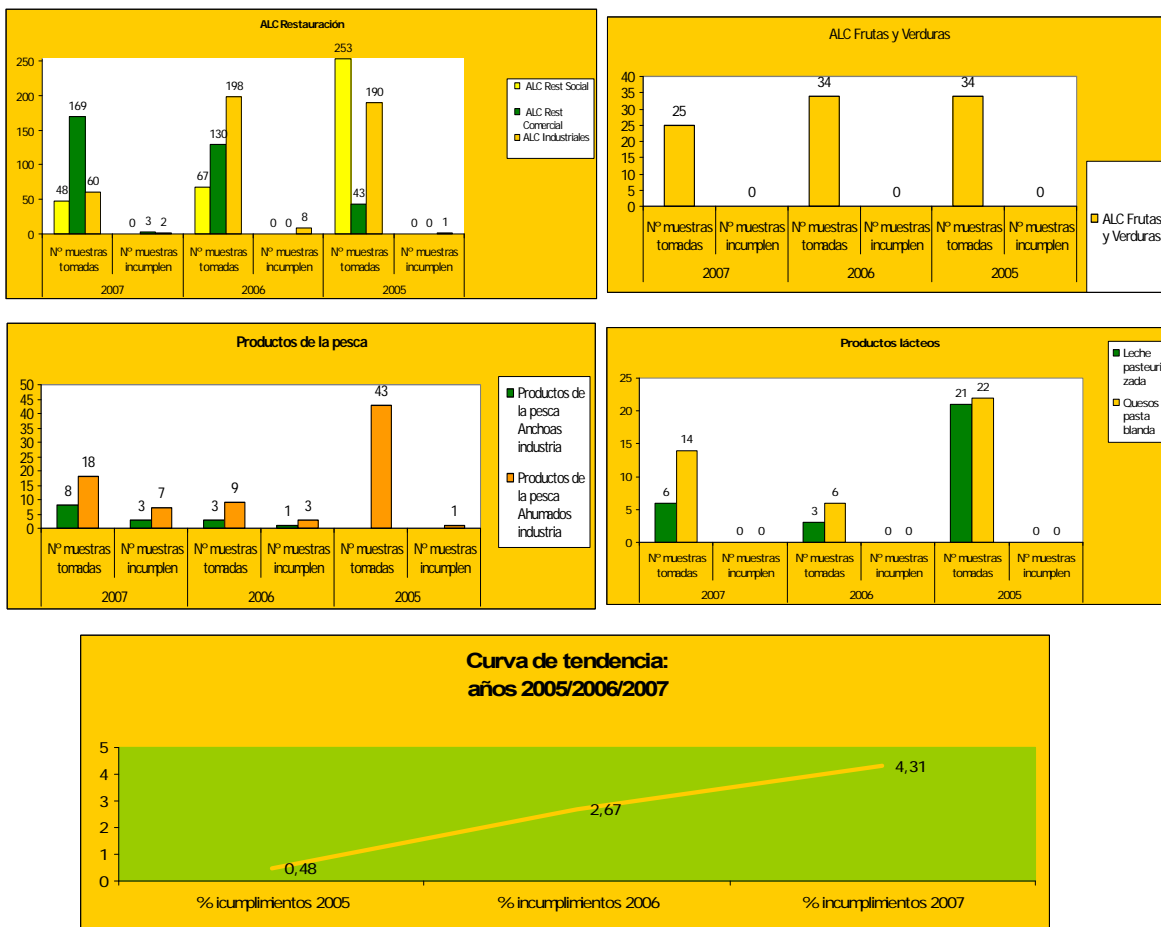
	Porcentaje incumplimiento Listeria monocitógenos	% icumplimientos 2005	% incumplimientos 2006	% incumplimientos 2007
Productos de la pesca	Anchoas industria	0	33,33	37,50
	Ahumados industria	2,33	33,33	38,89
ALC Restauración	ALC Rest Social	0	0	0
	ALC Rest Comercial	0	0	1,78
	ALC Industriales	0,49	4,04	3,33
Productos lácteos	ALC Frutas y Verduras	0	0	0
	Leche pasteurizada	0	0	0
	Quesos pasta blanda	0	0	0
	<b>TOTAL</b>	<b>0,48</b>	<b>2,67</b>	<b>4,31</b>

**RESULTADOS**

Tabla N°: Porcentajes de incumplimientos en los distintos grupos de alimentos por años.

**RESULTADOS**

Tabla N°: Porcentajes de incumplimientos en los distintos grupos de alimentos por años.



**Conclusiones**

- Los productos de la pesca (ahumados y anchoas en semiconserva) son los alimentos con mayor prevalencia de L. monocytogenes.
- De entre de alimentos muestreados en Restauración, la mayor tasa de incumplimientos de L. monocytogenes corresponde a muestras tomadas en los establecimientos industriales, lo que conlleva un riesgo añadido si se tiene en cuenta el continuo aumento del consumo de estos alimentos, por lo que se ha identificado la necesidad de identificar y profundizar en el motivo.
- Se comprueba una tendencia ascendente de la presencia de Listeria monocytogenes en la cadena alimentaria, que coincide con la observada en los informes nacionales y Europeos.

**Referencias bibliográficas:** Guidance Document on official controls, under Regulation (EC) N° 882/2004, concerning microbiological sampling and testing on foodstuffs.

ENTEROBACTERIAS EN PRODUCTOS DE CUARTA GAMA: AISLAMIENTO Y RESISTENCIA A ANTIMICTROBIANOS.

Rico H.<sup>1</sup>, Sebastiá C.<sup>2</sup>, Santos G.<sup>3</sup>, Soriano, J.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología i Ecología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. 46100, Burjassot, [Hortensia.Rico@uv.es](mailto:Hortensia.Rico@uv.es)

<sup>2</sup>Laboratorio de análisis clínicos, Pasaje Dr. Bartual Moret, 46010, Valencia

<sup>3</sup>Dpto de Medicina preventiva i Salut pública, Bromatología, Toxicología i Medicina legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. 46100, Burjassot.

**Introducción y Objetivos.** Con diez años de retraso con respecto a los mercados británico, alemán o francés, los productos de cuarta gama se dejaron ver en las estanterías de los supermercados españoles a partir de 1989. Marginal durante años, se estima que ya entran en la cesta de la compra de un 5% de las familias españolas y que el consumo anual alcanza las 13.000 toneladas. La clave de la seguridad de este producto se centra en la refrigeración y manipulación higiénica adecuada, tras garantizar una materia prima de calidad. Al abrir el envase, los vegetales pierden la protección de la atmósfera modificada, por lo que es posible la proliferación de contaminantes. Si esta se produce, el alimento no debería ser consumido, pero si accidentalmente se produce su ingesta, puede conducir al desarrollo de diferentes enfermedades de carácter gastrointestinal. Debido a ello y en nuestro propio beneficio, debe evitarse el desarrollo de resistencias, sobre todo por parte de los gérmenes más virulentos, a los antibióticos de amplio espectro, ya que perderíamos la protección que nos otorgan frente a la mayoría de los microorganismos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible presencia y nivel de contaminación de Enterobacterias en los productos vegetales frescos listos para consumir. Así se podría constatar si los únicos tratamientos que reciben eran suficientes para asegurar la estabilidad microbiológica del producto ya que supuestamente, no se necesita un lavado adicional u otro tratamiento complementario de manera previa a su ingestión. Por otra parte, también queríamos conocer el grado de resistencia de los microorganismos que pudiéramos aislar en dichos alimentos, a una batería seleccionada de antibióticos.

**Material y Métodos.** Se seleccionaron muestras de distintos centros comerciales, que contenían vegetales tales como zanahoria, rúcula, lechuga, etc., escogiendo siempre aquellas marcas que indicaran que el producto estaba listo para su consumo sin necesitar ningún lavado o tratamiento adicional. Estas muestras fueron procesadas para el estudio de coliformes totales y *Escherichia coli*. El recuento de coliformes totales fue determinado mediante la técnica del número más probable (NMP), inoculando por triplicado en caldo Lactosado Biliado al Verde Brillante (BGBL) A continuación, se resembró sobre agar Rapid *E. coli* con el fin de obtener colonias aisladas. Todas las colonias de bacilos Gram negativos oxidasa negativos se identificaron finalmente con la ayuda de las galerías "BBL crystal™ E/NF". Por último, a todas las Enterobacterias aisladas e identificadas a partir de los vegetales de cuarta gama se les realizó la prueba del antibiograma, siguiendo el método disco-placa (Bauer *et al.*, 1966). Los antibióticos testados en cada caso y las concentraciones de los mismos por disco fueron: amoxicilina-ácido clavulánico (30µg), ampicilina (10µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), cotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol) (25µg), estreptomina (10µg), gentamicina (10µg), nitrofurantoina (300µg) y tetraciclina (30µg).

**Resultados y Discusión:** Los resultados obtenidos tras procesar las muestras se recogen en la Tabla. Como se puede observar se aislaron varios microorganismos dentro de la categoría de coliformes totales destacando entre otros:

*Enterobacter cloacae*. Aislado en alfalfa, corazones de escarola, espinacas, espinaca baby, lechuga, rúcula y zanahoria rallada. Todas las especies de este género son patógenos oportunistas. En el estudio de Soriano *et al.* (2000) se refleja que los microorganismos *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter sakazakii* son especialmente significativos al proceso de desinfección. *Enterobacter sakazakii*. Aislado en espinacas. Es uno de los microorganismos que han cobrado un creciente interés por ocasionar muerte y/o meningitis en recién nacidos por consumo de leches artificiales. Su presencia se ha detectado en otros alimentos de origen vegetal, tales como lechuga (Soriano *et al.*, 2001). *Escherichia hermanii*. Se ha aislado sólo en la rúcula. Hasta la fecha se había detectado únicamente en heridas humanas y heces. *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*. Aislada en alfalfa, brotes de soja y rúcula. Es la primera vez que se ha aislado en este tipo de alimento. Este

microorganismo por lo general está muy difundido junto con *K. oxytoca* en diversos alimentos y aguas. *Kluyvera ascorbata*. Se ha detectado en lechuga iceberg, siendo la primera vez que se ha aislado de esta matriz. Se sugiere que pueden ser patógenos oportunistas del tracto respiratorio del hombre, pero carecen de significado clínico. *Pseudomonas aeruginosa*. Presente únicamente en los brotes de soja. Tiene gran interés por ser un patógeno oportunista, iniciando infecciones en individuos cuya resistencia es baja o inmunocomprometidos.

Muestra	Número de muestras	Rango de coliformes totales (NMP/g)	<i>E. coli</i>	Otras bacterias
Alfalfa	2	>1100	0/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
Berros	2	<3	0/0	Ausencia
Brotes de soja	4	>1100	0/4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Canónigos	10	<3-4	0/10	Ausencia
Escarola	4	<3-1100	0/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Corazón de escarola	4	<3-15	0/4	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
Escarola fina rizada	3	<3	0/3	Ausencia
Espinacas	4	3-15	0/4	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
Espinaca baby	2	<3-4	0/2	<i>Enterobacter cloacae</i>
Lechuga iceberg	8	<3-460	0/8	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Kluyvera ascorbata</i>
Lechuga	2	4	0/2	<i>Enterobacter cloacae</i>
Rúcula	12	<3-21	0/12	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia hermannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>
Zanahoria rallada	6	9->1100	0/6	<i>Enterobacter cloacae</i>

En resumen, se aislaron 26 cepas de microorganismos pertenecientes al grupo de las Enterobacterias que fueron testadas para la prueba del antibiograma. Los resultados demostraron que todas presentaron resistencias a algún antibiótico de los usados en el ensayo, de manera que las estadísticas reflejaron que: un 42% presentaron resistencias a 2 antibióticos (11/26), un 38% presentaron resistencias a 3 antibióticos (10/26), un 7,69% presentaron resistencias a 4 antibióticos (2/26), un 7,69% presentaron resistencias a 1 antibiótico (2/26) y un 3,8% presentaron resistencias a 7 antibióticos (1/26)

### Conclusiones

1. Se debe ejercer un estricto control sobre la calidad microbiológica de estos productos previamente a su venta, estableciendo límites para el rechazo o la aceptación de los mismos.
2. Normalizar y controlar el uso de aguas de corrientes altamente contaminadas para riego y lavado de productos de cuarta gama, ya que suele ser la fuente más importante de contaminación por Enterobacterias (cloración industrial).
3. Realizar estudios más profundos que comprendan el análisis de diferentes parámetros para conocer más acerca de la calidad de estos productos y su incidencia en la salud de la población, ya que son alimentos de muy reciente aparición en el mercado y se venden con la leyenda de "listos para su consumo".
4. Controlar la existencia de posibles cepas multirresistentes a antibióticos en estos productos ya que pueden transmitir mediante distintos mecanismos su fenotipo a otras especies incluidos gérmenes patógenos provocando con ello fracasos a nivel terapéutico.

### Referencias

- Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**: 493-6.
- Soriano, J.M., Rico, H., Moltó, J.C., Mañes, J. (2000). Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in university restaurants. *International Journal of Food Microbiology* **58**: 123-128.
- Soriano, J.M., Rico, H., Molto, J.C., Mañes, J. (2001). Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiology* **86** (3): 159-163.

## ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS COMIDAS ELABORADAS EN DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS ALIMENTARIOS

Serrano S.<sup>1</sup>, Sánchez J.A.<sup>1</sup>, Marfil R.<sup>2</sup> y Jodral M.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, mjodral@uco.es

<sup>2</sup>Dpto. de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Campus de la Cartuja, 18071, Granada.

### - Introducción y Objetivos

Alimentos preparados con anticipación excesiva, refrigeración insuficiente, contaminaciones cruzadas, manipuladores portadores, preparación de alimentos en grandes cantidades, cocción o recalentamiento insuficiente, platos enfriados con demasiada lentitud, utilización de sobras de alimentos, limpieza y desinfección insuficiente de utensilios, instalaciones o materiales de cocina, son las principales causas que dan lugar a la producción de brotes de toxiinfecciones de origen alimentario

El análisis microbiológico de un alimento permite conocer sus fuentes de contaminación, valorar las normas de higiene utilizadas en la elaboración y manipulación de alimentos, detectar la posible presencia de microorganismos patógenos y establecer en qué fases de la elaboración se producen fenómenos de alteración en los alimentos, con el fin de establecer su período de conservación.

En la actualidad el Reglamento (CE) 852/2004 y el Real Decreto 3484/2000 son, entre otras, las principales normas legales que regulan la elaboración de las comidas preparadas, definiendo la normativa española unos estándares microbiológicos con criterios de valoración.

Pese a todos los requisitos establecidos en la normativa actual, numerosos estudios demuestran que no todas las comidas preparadas en este tipo de establecimientos cumplen con los requisitos microbiológicos establecidos en la legislación vigente.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la calidad microbiológica de las comidas elaboradas en diferentes establecimientos alimentarios (bares, restaurantes, residencias de ancianos y catering); se determinan los parámetros establecidos en la normativa sanitaria vigente en comidas sometidas y no sometidas a tratamiento térmico, y las posibles diferencias entre las comidas elaboradas en cada establecimiento y entre tipo de tratamiento al que se han sometido.

### - Material y Métodos

Durante los años 2001 y 2007, se analizaron 1255 muestras procedentes de 3 catering (n=307), 14 restaurantes (n=698), 12 bares (n=144) y 4 residencias de ancianos (n=106). Las muestras se recogieron en envases estériles en el momento del servicio, a excepción de los catering, las cuales se tomaron antes de su distribución. Las muestras para su estudio se clasificaron en dos de los grupos que establece el R.D. 3484/2000: **Grupo A:** comidas preparadas sin tratamiento térmico y comidas preparadas con tratamiento térmico, que llevan ingredientes no sometidos a tratamiento térmico y **Grupo B:** comidas preparadas con tratamiento térmico. En los platos del grupo A se incluyeron, entre otros, arroz, pastas, guisos, fritos, caldos, horneados, purés, comidas a la plancha, tortillas, salsas calientes y en los del grupo B ensaladas, salsas frías, tapas y postres a base de fruta.

Los parámetros estudiados fueron los establecidos en el R.D. 3484/2000 y las técnicas utilizadas fueron: aerobios mesófilos totales (ISO 4833), *Enterobacteriaceae* lactosa positiva (ISO 4832), *Escherichia coli* (ISO 16649), *Staphylococcus aureus* (ISO 6888), *Salmonella* (ISO 6579) y *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2).

En el análisis estadístico de resultados se empleó la estimación por punto y los intervalos de confianza con un nivel de significación del 95%. La comparación entre grupo de alimentos y tipos de establecimientos se realizó a través de la prueba ji-cuadrado ( $\chi^2$ ), con corrección de Yates, según el caso, considerándose significativos valores de  $p < 0,05$ .

### - Resultados y Discusión

Del total de las comidas analizadas, 255 superaban uno o varios de los parámetros establecidos en la legislación vigente, lo que supone un 20,3% con un intervalo de confianza del 95%:  $I_{0,95}=[18,1; 2,5]$ . De los platos estudiados superaban los límites permitidos: 17 (6,7%) bacterias aerobias, 154 (60,4%) coliformes, 119 (46,7%) *Escherichia coli* y 17 (6,7%) *Staphylococcus aureus*. En ninguna de las muestras analizadas se aislaron *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

Atendiendo al tipo de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre los platos del grupo A y B, en los que 37 muestras (10,4%;  $I_{0,95}=[7,2; 13,6]$ ) de los

355 platos sin tratamiento térmico y 218 (24,2%;  $I_{0,95}=[21,4; 27,0]$ ) de los 900 platos con tratamiento superaban algún criterio.

En las comidas del grupo A, el mayor número de muestras positivas a microorganismos indicadores se encontraron en el intervalo  $10^3$ - $10^4$  ufc/g con 137 muestras (38,6%) para el recuento de bacterias aerobias y en el  $10$ - $10^2$  ufc/g con 79 muestras (22,3%) para el recuento de coliformes. Con respecto a los testigos de falta de higiene el mayor número de muestras se situaron fuera de los límites de detección (83,4% de las muestras para *E. coli* y el 87,6% para *S. aureus*), existiendo respectivamente un 8,1% y un 3,1% de las que superaban el límite insatisfactorio para ambos parámetros. Dentro de las 37 muestras que superaban uno o varios de los parámetros establecidos en la legislación vigente, 1 (2,7%) presentaba exceso de bacterias aerobias, 8 (21,6%) presentaba exceso de coliformes, 29 (78,4%) exceso de *E. coli* y 11 (29,7%) exceso de *S. aureus*.

En las comidas del grupo B, el mayor número de muestras positivas a los microorganismos indicadores se encontraron también en el intervalo  $10^3$ - $10^4$  ufc/g con 262 muestras (29,1%) para el recuento de bacterias aerobias y en el  $10$ - $10^2$  ufc/g con 141 muestras (13,9%) para el recuento de coliformes. Con respecto a los testigos de falta de higiene el mayor número de muestras se situaron fuera de los límites de detección (90% de las muestras para *E. coli* y el 94,7% para *S. aureus*), existiendo respectivamente un 10% y un 0,6% que superaban el límite insatisfactorio para ambos parámetros. Dentro de las 218 muestras que superaban unos o varios de los parámetros establecidos en la legislación vigente: 16 (7,3%) bacterias aerobias, 146 (70%) coliformes, 90 (41,3%) *E. coli* y 6 (2,8%) *S. aureus*.

Por tipos de establecimientos, se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0143$ ) al comparar en una tabla de contingencia el número de muestras que superaban los límites microbiológicos. En bares, 26 de las 144 muestras analizadas (18,1%;  $I_{0,95}=[11,7; 24,3]$ ) superaban algún criterio; en restaurantes, 158 de los 698 platos analizados (22,6%;  $I_{0,95}=[19,5; 25,7]$ ); en catering, 61 de 307 comidas (19,9%;  $I_{0,95}=[15,4; 24,3]$ ) y en residencias, 10 de 106 (9,4%;  $I_{0,95}=[3,90; 15,0]$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre establecimientos cuando únicamente se compararon comidas del grupo A ( $p=0,7832$ ), presentando unos niveles de muestras contaminadas del 9,4% ( $I_{0,95}=[1,6; 17,3]$ ) en bares, 11,4% ( $I_{0,95}=[7,3; 15,6]$ ) en restaurantes, 5,3% ( $I_{0,95}=[0,0; 12,4]$ ) en catering y 10,8% ( $I_{0,95}=[0,0; 20,8]$ ) en residencias.

Los resultados globales son similares a los obtenidos por otros autores. En este estudio, a diferencia de otros, se ha puesto de manifiesto la existencia de un mayor porcentaje de comidas del grupo B que incumplen alguno o varios de los parámetros establecidos en el R.D. 3484/2000, siendo los principales microorganismos implicados los coliformes y *E. coli*. Este tipo de contaminación puede deberse principalmente a tratamientos térmicos inadecuados, contaminaciones posteriores al tratamiento y prácticas poco higiénicas de los manipuladores de alimentos.

Por tipos de establecimientos, los restaurantes y las residencias de ancianos presentaron respectivamente unos porcentajes mayores y menores de platos contaminados. En restaurantes puede ser debido a un escaso espacio de manipulación, una baja capacidad de almacenamiento frigorífico y a una preparación anticipada de grandes cantidades de comida. Por otra parte, el bajo porcentaje obtenido en las residencias de ancianos puede deberse al mayor grado de concienciación de los manipuladores de alimentos al trabajar con población de alto riesgo. En las comidas del grupo A, los catering presentaron el porcentaje más bajo de platos contaminados. Esto se puede explicar, si lo comparamos con el resto de establecimientos, a la existencia en sus instalaciones de espacios independientes, climatizados y exclusivos para la realizar la manipulación de este tipo de comidas.

#### - Conclusiones

Las comidas elaboradas presentan un bajo riesgo de producción de toxiinfecciones alimentarias como consecuencia de la ausencia de gérmenes patógenos, sin embargo el elevado número de platos que muestran un exceso de microorganismos indicadores y testigos de falta de higiene indican que se han de mejorar las prácticas de manipulación, siendo necesario revisar los sistemas de autocontrol implantados. Los restaurantes fueron los establecimientos donde existe mayor grado de incumplimiento de criterios microbiológicos, por lo que se recomienda realizar además, una cuidadosa planificación de los menús en consonancia con su capacidad de producción (posibilidades de la cocina, equipos y personal).

#### - Referencias Bibliográficas

- Rey, J.C.; Aranda, C.; Pedrosa, M.; Conde, A.; Castilla, I. Médico de Familia (And), 2002, 2, 108-113.
- Gillespie, I.; Little, C.; Mitchell, R. Journal of Applied Microbiology 2000, 88, 467-474.
- Legnani, P.; Leoni, E.; Berveglieri, M.; Mirolo, G.; Alvaro, N. Food Control, 2004, 15, 205-211.
- Rego, P.; Gallardo, C.S.; Pombar, A.; Rodríguez, L.A. Alimentaria, 2005, 359, 38-43.

## RECuento AUTOMATIZADO DE MICROORGANISMOS MEDIANTE TRATAMIENTO DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS DIGITALES

Callejón S.<sup>1</sup>, Ferrer S.<sup>1</sup> y Pardo I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ENOLAB. Dpt. de Microbiología i Ecología, Universitat de València. 46100. Burjassot-Valencia. Sara.Callejon@uv.es

### - Introducción y Objetivos

La mayoría de métodos de recuento de microorganismos necesitan del cultivo de éstos para poder llevar a cabo la cuantificación, y de ahí se derivan varios problemas como por ejemplo que en ocasiones sólo se determinan las células viables o cultivables, perdiendo y sesgando entonces parte de las células vivas y de la biodiversidad presente en la muestra. Por ello se ha desarrollado un método automatizado de análisis de imagen para la cuantificación e identificación simultáneas en muestras de vino de los microorganismos presentes, especialmente útil para la técnica de hibridación fluorescente "*in situ*" (FISH). Esta técnica se puede aplicar directamente sobre la muestra sin necesidad de cultivo.

Las células teñidas se visualizan en el microscopio de epifluorescencia y tradicionalmente se cuantifican por recuento visual directo realizado contando 20 campos visuales y obteniendo el porcentaje de células contadas [2]. Este método tradicional es fiable pero requiere de tiempo para adquirir experiencia en la observación, y además está afectado por el sesgo del investigador que puede dar lugar a distintos recuentos según el observador que lo realice. Además el recuento visual directo sin captura de imagen debe ser rápido debido a la presta extinción de la fluorescencia.

Por ello, se ha adaptado a nuestras condiciones de trabajo un software gratuito de análisis de imagen automatizado llamado CellC® [3] para llevar a cabo dicha cuantificación de forma automática y evitar los problemas subyacentes a la subjetividad y fatiga del investigador. Este programa extrae datos cuantitativos de las fotos digitales obtenidas.

### - Material y Métodos

Como ejemplo del proceso de automatización hemos elegido una muestra con características difíciles: bacterias del vino de pequeño tamaño, fijadas e hibridadas sobre un filtro que tras el proceso presenta el mismo color que la muestra, y con una técnica el FISH que aporta ruido de fondo. Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron obtenidos directamente del vino de las variedades Cabernet-Sauvignon y Tempranillo obtenidos en la D.O. Somontano. Las muestras analizadas en este trabajo fueron tomadas en bodega desde final de la fermentación maloláctica (FML) hasta los seis meses de crianza, con un periodo de muestreo de dos meses desde su inicio.

En este trabajo se realizó la hibridación en filtro de las muestras de vino según [1] con dos sondas diferentes, una general para obtener un recuento de bacterias totales, en este caso con la EUB338 y otra específica de *O. oeni*, para determinar la proporción de bacterias que pertenecían a esta especie de interés, responsable de la FML. El resultado de las hibridaciones de las muestras se detectó por la fluorescencia emitida en el microscopio de epifluorescencia Leica DM 5000 B con un proveedor externo de potencia Leica CTR 5000 por el filtro I3 (blue light exciter BP 450-490 nm, beamsplitter RKP 510 nm, emitter LP 520nm). Se tomaron 10 fotografías en color con la cámara Leica DFC 300 FX, acoplada al microscopio y al programa Adobe Photoshop en las que se emplearon tiempos de exposición entre 10-120 s y se modificaron los niveles de brillo, contraste y color. Después se analizaron con el programa CellC® ajustando los parámetros tales como el nivel de la segmentación y la separación entre células hasta dejar estos parámetros fijados. Se analizaron las fotos obtenidas a partir de la imagen binaria (blanco y negro) automática generada por el programa (Fig2). Dicha imagen era idéntica a la obtenida en color, (Fig1) representando las bacterias de color blanco y el fondo negro, e incluía un recuento de las células. Se procedió a realizar la media de las 10 fotos obtenidas para cada muestra.

En la puesta a punto del programa para las condiciones particulares de nuestro trabajo se han modificado los siguientes parámetros; 1) Corrección de fondo, 2) Nivel de segmentación: en nuestro caso como las células son más brillantes que el fondo pero éste presenta el mismo color y los

artefactos; también se utilizó un nivel de segmentación controlado manualmente que permitiera distinguir cada célula individualmente del fondo. 3) Nivel de separación de las células dentro de un grupo o cadena: este programa ofrecía la posibilidad de asignar una mayor o menor separación en función de la cuantificación de células individuales o grupos respectivamente. Este parámetro fue fijado para el recuento de células individuales entre un 0.75-0.90%. 4) Límites de tamaño: el programa puede tomar como referencia para dejar fuera del rango de segmentación, partículas con un tamaño superior e inferior al de nuestras células, en este trabajo se fijó este parámetro.

#### - Resultados

Se ha logrado poner a punto un método automatizado de análisis de imagen para el recuento de bacterias lácticas presentes en vino, que reproduce fielmente los resultados obtenidos visualmente de forma rápida, evitando los problemas derivados del recuento visual.

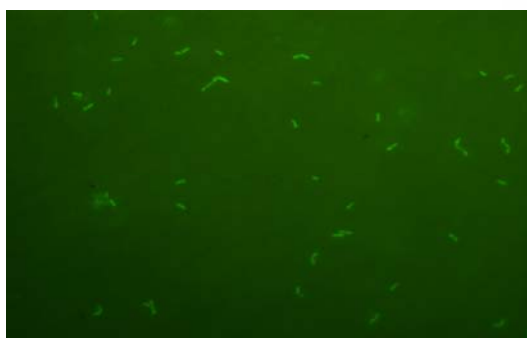


Fig. 1. Hibridación *in situ* con la sonda de *O. oeni*.



Fig. 2. Imagen obtenida de la anterior con CellC®

#### - Conclusiones

Este método es mucho más rápido y proporciona al proceso automatización, estandarización y soluciona problemas de ruido de fondo típicos en imágenes difíciles como las obtenidas con la hibridación sobre filtro, en la cual el propio filtro tiene el mismo color aunque menos intenso que las células hibridadas. Además tiene múltiples aplicaciones sobre otras muestras y microorganismos ajustando los parámetros según el tamaño de las células y tipo de imagen ya que este programa permite también el recuento de imágenes obtenidas con distintas técnicas microscópicas: contraste de fases, campo claro, campo oscuro, además de las obtenidas con fluorescencia. Se puede aplicar al recuento de viables, e incluso viables no cultivables a partir del Kit LIVE/DEAD ya que puede discriminar colores, permite comparar recuentos específicos con el recuento total. También se puede aplicar a estudios de morfología celular. Pero lo más importante de todo es que requiere menor experiencia para su manejo que otros programas como el ImageJ, ya que no es necesario el paso a escala de grises ni ajustar parámetros que implican un amplio conocimiento en análisis de imagen.

#### - Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT AGL2006-08495/ALI.

#### - Referencias Bibliográficas

- [1] BLASCO, L.; FERRER, S.; PARDO, I. 2003. **Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria.** *FEMS Microbiology Letters* 225: 115-123.
- [2] KEPNER, R.L.; Jr. And J.R. PRATT. 1994. **Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present.** *Microbiol. Rev.* 58: 603-615.
- [3] SELINUMMI, J.; YLI-HARJA, O.; PUHAKKA, J.A. 2005. **Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis.** *BioTechniques* 39: 859-863.

## WHOLE-CELL BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF BACTERIOPHAGES BY ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY

García-Aljaro C., Muñoz-Berbel X., and Muñoz F. X.

*Departament de Micro-nanosistemes, Biosensors i BioMEMs, Centre Nacional de Microelectrònica de Barcelona (CNM- IMB), CSIC. Esfera UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona, cristina.garcia@cnm.es*

### - Introduction y Objectives

Bacteriophage infection of starter cultures constitutes a major problem in the dairy fermentation industry, which may bring about important economic losses. The development of the sensor biotechnology in the last decades have improved and simplified the detection of multiple analytes in complex samples by the development of different electrochemical, piezoelectric, and optical biosensors. However, these have mainly focused on bacteria detection (Lazcka, et al., 2006) and little attention has been given to the detection of phages by these new technologic methods.

The aim of this work was to evaluate the use of a whole-cell biosensor based on the development of a bacterial biofilm on chip integrating gold and platinum microelectrodes to detect bacteriophages in aqueous media (PBS and milk) by using non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy (EIS). EIS is a powerful technique which is capable of detecting electrochemical changes occurring at the surface of the electrodes. It combines the analysis of both resistive and capacitive properties of materials deposited on the surface of the electrode at different frequencies. The obtained impedance spectra can be modelled by using an equivalent circuit composed by resistors and capacitors (for review, see Yang and Bashir, 2008).

In this study, the impedimetric changes occurring in the bacteria-coated electrode surface after bacteriophage infection were monitored. The bacteriophage PhiX174 was chosen as model bacteriophage and *E. coli* WG5 as host strain to conduct the study because of the easiness of manipulation. This study showed the suitability of this biosensor to detect rapidly specific bacteriophages as long as a specific host for the target phage is able to grow on the surface of the miniaturised electrodes.

### - Material y Methods

The microbial biosensor was constructed by incubation of gold and platinum working electrode/counter electrode (WE/CE) in a 500 mL glass reactor inoculated with *E. coli* WG5 (1:20) containing AB minimal medium (Balestrino et al., 2005), supplemented with glucose (0.2 %, v/v) and nalidixic acid (250 µg/mL). Bacteria were incubated with constant agitation and aeration for 6 days at 22°C to allow biofilm formation. Bacteriophage PhiX174 was used as model bacteriophage to validate the assay. Other bacteriophages used in this study were the bacteriophage T4, which infects *E. coli* WG5, and the bacteriophage SWP2, a *Pseudomonas putida* infecting bacteriophage isolated from sewage, which is not able to infect the *E. coli* strain.

A bacteriophage stock was prepared as previously described (Anonymous, 2000) and was serially diluted in PBS or milk. WE/CE chips containing the 6 day-mature *E. coli* biofilm were transferred to 5 ml of fresh modified Scholtens Broth culture media and inoculated 1/10 (v/v) with a different bacteriophage concentration.

Impedance measurements of the WE/CE chips were carried out at 22°C after different incubation times with an Autolab PGSTAT 12 (EcoChemie, BV, The Netherlands) containing a FRA-2 module. The chips were washed with PBS, and introduced together with an external Ag|AgCl electrode (Crison, Barcelona, Spain) in a 25 mL electrochemical cell containing sterile PBS. A 25 mV AC potential was applied at the cell with an open circuit potential of  $+0.26 \pm 0.05$  V vs Ag|AgCl, over a frequency range between 50 Hz and 100 kHz. Impedance spectroscopy spectra were recorded using the FRA-2 software (EcoChemie, BV). The Z-View modelling software (Scribner Associates Inc.) was used to fit impedance data to an equivalent circuit.

### - Results y Discussion

The equivalent circuit fitting the impedance spectra is shown in Fig.1. It was composed of a resistance ( $R_c$ ) and capacitance of the reference electrode ( $C_{elec}$ ) in parallel with the resistance of the solution ( $R_s$ ) and the biofilm capacitance ( $C_b$ ), the resistance of the biofilm pores ( $R_p$ ) and an interface

constant phase element ( $CPE_i$ ), which accounts for the double layer interactions. Accuracy of the impedance spectra fitting to the equivalent circuit was evaluated by the error value, which was less than 10% for each circuit component.

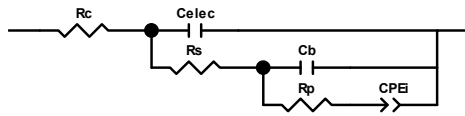


Figure 1. Equivalent electrical circuit used to fit the impedance spectra

Increase in  $CPE_i$  in the control sample, where no bacteriophages were added, was observed, what may be related to detachment of some bacteria from the most external layers of the biofilm and growing close or attached to a non-occupied electrode surface, since a biofilm is a dynamic structure (O'Toole et al, 2000). The contrary was seen after incubation of the biosensor in a sample containing bacteriophages, since most external biofilm bacteria were lysed, and those that were detached had no chance to attach to the electrode surface again because of bacteriophage attack.

As shown in Fig. 2 a significant change in the impedance spectra was shown after incubation of the biosensor in a solution containing different dilutions of the bacteriophage PhiX174 when compared to the obtained spectra after incubation of the biosensor in the same solution when no bacteriophages were added.

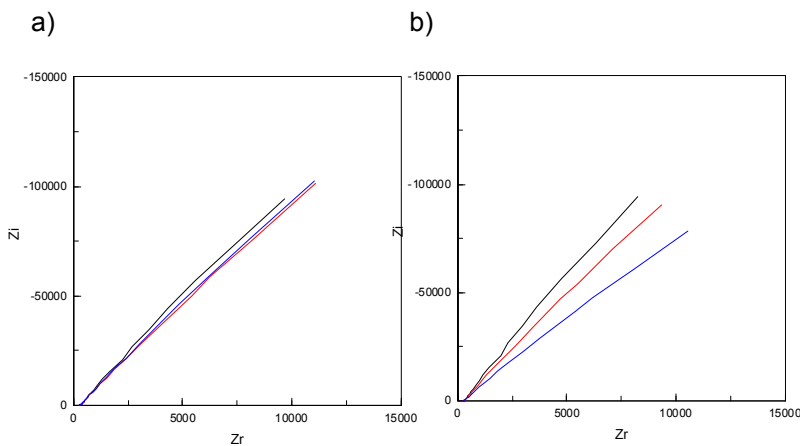


Figure 2. Nyquist Plots of impedance spectra after different incubation time of the *E. coli* WG5 biofilm biosensor in a bacteriophage PhiX174 doped milk sample containing  $10^2$  PFU/mL (a) compared to the incubation of the same biosensor to a milk sample containing no  $\phi\alpha$  (b).  
 — Time = 0 h  
 — Time = 4 h  
 — Time = 6 h

Analysis of  $|Z|$  at different frequencies showed a relative decrease in the control sample after 6 hours of incubation of the biosensor compared to the sample containing bacteriophages, where impedance value increased slightly.

A high sensitivity and specificity was achieved with this method for a bacteriophage concentration ranging between 1 and  $10^9$  PFU/mL in a 6-hour detection period.

## - Conclusion

In summary, the method presented here provide a new bioanalytical tool for bacteriophage detection which offers the possibility of miniaturization and fast analysis compared to the traditional methods. We believe that this microbial biosensor has wide applications for detection of bacteriophages in different fields being able to detect rapidly specific bacteriophages as long as a specific host for the target bacteriophage is able to grow onto the electrodes. Moreover, it has also proven useful for detection of bacteriophages even when plaques are not clearly visible by the traditional methods.

## - References

1. **Anonymous.** 2000. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages-part 2: Enumeration of somatic coliphages. ISO. Geneva, Switzerland.
2. **Laczka O. et al.** 2006. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosen. Bioelectron. 22:1205-1217.
3. **Yang and Bashir.** 2008 Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. Biotechnol. Adv. 26:135-150.
4. **Balestrino D. et al.** 2005. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation J. Bacteriol. 187:2870-2880.
5. **O'Toole G. et al.** 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54:49-79.

## CONFIRMACIÓN DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EN AGUAS MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

Martínez Reina, G.<sup>1,2</sup>, Sánchez Cánovas, A.M.<sup>1</sup>, Navarro de Haro, F.<sup>1</sup>, Barnés Campos, M.J.<sup>1</sup>, Vilella Martínez, M.D.<sup>1</sup> y Ruiz Hernández, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología. Consejería de Sanidad de Murcia. Ronda de Levante 11. 30008 Murcia. <sup>2</sup>mgracia.martinez@carm.es

### Introducción y Objetivos

*Cl. perfringens* es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza. Pertenece a la familia Bacillaceae, constituida por bacilos Gram positivos, capsulados, formadores de esporas, inmóviles y anaerobios estrictos. Producen SH<sub>2</sub> y diversos tipos de toxinas.

En el caso de las aguas de consumo público y las aguas envasadas, la legislación determina que para que éstas sean consideradas aptas, uno de los requisitos que deben cumplir es la ausencia de *Cl. perfringens*.

Su aislamiento en medio selectivo (nosotros utilizamos TSC) es relativamente sencillo y rápido, obteniéndose colonias negras que es preciso confirmar. El método más habitual es mediante pruebas bioquímicas. Hemos comprobado, sin embargo, que estos ensayos conducen, a menudo, a la obtención de falsos negativos. Además, frecuentemente se producen cambios de color que son difíciles de interpretar, y no resulta fácil asignar si una reacción ha sido positiva o negativa. Esto nos ha llevado a optar por confirmar las colonias mediante PCR (PCR convencional). Hemos utilizado un kit de reacción ya preparado (Kit de Confirmación por PCR para *Cl. perfringens*, Labaqua), aunque ha sido necesario estudiar la influencia de diversos factores que afectan al proceso (concentración de la muestra, presencia de sustancias inhibitoras, sensibilidad del equipo utilizado en la amplificación,...) a fin de lograr unas condiciones óptimas de extracción y amplificación del ADN.

### Material y Métodos

Se filtran 100 ml de muestra de agua (250 ml en el caso de aguas envasadas) mediante sistema de filtración por membrana, con filtro de 0,45 µm y 47 mm de diámetro. El filtro se coloca sobre la superficie de agar selectivo TSC. Se añade, a continuación, una capa muy fina de TSC, previamente licuado y atemperado a unos 45°C y se deja solidificar. Tras incubación a 37°C durante 24h en condiciones de anaerobiosis, se comprueba la presencia de colonias negras, sospechosas de ser *Cl. perfringens*. Se toma una pequeña porción de una de estas colonias con asa de cultivo (para ello hay que cortar y levantar previamente el agar situado justamente encima de la colonia con mucho cuidado) y se resuspende en 25 µl de agua destilada estéril. Esta suspensión se procesa del siguiente modo:

- \* Una alícuota se siembra en agar sangre, se incuba durante 24h a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Con este crecimiento procedente de una única colonia se realizan las pruebas bioquímicas correspondientes (API20A).
- \* Al resto de la suspensión, se le aplican 3 ciclos de choques térmicos de calor/frío (95°C/10 min; -20°C/10 min), para la extracción del ADN. Esto constituye lo que nosotros denominamos la muestra "Directa" o "D", que hemos tomado como referencia para optimizar el protocolo de la reacción. Se ha utilizado un termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany). Para la reacción se han utilizado 2 µl de muestra (o control positivo/negativo) y 38 µl de "mezcla de reacción" del kit de PCR. Como control positivo se ha utilizado una cepa de referencia de *Cl. perfringens* (CECT 376) aislada en placa y procesada del mismo modo que las muestras. Como control negativo se ha utilizado agua destilada. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94°C/4 min, 35 ciclos de 94°C/30 seg, 62°C/30 seg, 72°C/1 min y extensión final a 72°C/10 min. A los 40 µl de ADN amplificado se le agregaron 6 µl de una solución acuosa de xileno cianol 0,25% y sacarosa 40%, depositando 20 µl de esta mezcla en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X y adicionado con 0,2 µg/ml de bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis fueron: 80V/35 min. Como marcador de peso molecular se ha utilizado: φ174 DNA marker Hae III digest (Sigma) y para visualizar el gel se ha empleado un transiluminador E-box 1000/20M, de Vilbert Lourmat (Francia)

### Resultados y Discusión

Al iniciar los ensayos de confirmación de *Cl. perfringens* mediante PCR comprobamos que, tanto con muestras de agua como con cepa de referencia, a menudo no nos aparecía la banda de control interno. Ha sido necesario estudiar diversas variantes del protocolo de ensayo a fin de optimizarlo en nuestras condiciones específicas:

- a) Utilización de un agente quelante (Chelex 100 en lugar de agua destilada estéril).
- b) Concentración de la muestra: una porción de colonia disgregada en un menor volumen de agua (15  $\square$ l en lugar de 25  $\square$ l).
- c) Dilución de la muestra: a partir de la muestra "directa" se obtienen la dilución 1/10 (5  $\square$ l de la suspensión "D" más 45  $\square$ l de agua) y la dilución 1/100 (5  $\square$ l de la suspensión "1/10" más 45  $\square$ l de agua).

El chelex 100 es una resina que preferentemente captura iones metálicos polivalentes en soluciones. Dependiendo del material del que se extrae el ADN, puede haber sustancias inhibitoras que sean capturadas por esta resina, mejorando el proceso. En nuestro caso, no observamos ninguna diferencia entre ambas técnicas, por lo que se optó por seguir realizando la extracción con agua destilada estéril.

Es conveniente destacar que el agar puede interferir en la reacción de amplificación, por lo que es muy importante que la capa del agar TSC que se echa encima del filtro sea lo más fina posible, a fin de que cuando se coja la colonia para resuspender en agua, el arrastre sea mínimo.

La reacción de amplificación por PCR necesita que sustratos y enzimas estén en concentraciones adecuadas. Se produce una reducción considerable en la efectividad de la reacción tanto si la cantidad de ADN que extraemos, a partir de una porción de colonia, es excesiva (concentración muy alta) como si por el contrario, no es suficiente. En ambos casos es posible que las bandas sean muy débiles o incluso que no aparezcan. Por esta razón hemos ensayado tanto la concentración de la muestra como su dilución, para optimizar este parámetro.

En nuestro caso comprobamos que la concentración de la muestra (15  $\square$ l en lugar de 25 $\square$ l) no mejoró el proceso sino que, por lo general, dio lugar a bandas más débiles.

Al comparar la calidad de la extracción y amplificación de la muestra "directa" y sus diluciones "1/10" y "1/100" hemos constatado que no se debe efectuar la técnica con una sola concentración. En algunos casos la cantidad de colonia ensayada puede ser excesiva, por lo que en la muestra "directa" se inhibe parcialmente la reacción y se obtienen mejores resultados con la dilución 1/10. La dilución de la muestra también afecta en el sentido de que si hay inhibidores, éstos se diluirán y puede mejorar la efectividad de la reacción. Por el contrario, en otras ocasiones, la cantidad de colonia ensayada es adecuada y se obtienen buenos resultados con la muestra "directa", mientras que las bandas de la muestra diluida al 1/10 son más débiles e incluso pueden no verse. Si se utilizan ambas concentraciones será más factible que al menos con una de ellas obtengamos reacciones correctas (lo que se refleja en la aparición de la banda control). Sólo en el caso de que con ninguna de estas dos diluciones (muestra "directa" y dilución "1/10") nos salga, al menos, la banda de control interno, es preciso repetir la muestra llegando a la dilución 1/100.

Otra variante que se ha ensayado ha sido la concentración de la "mezcla de reacción". La casa comercial del kit (Labaqua) nos ha proporcionado esta mezcla a dos concentraciones distintas: la que suministra habitualmente y otra concentración más baja. En nuestras condiciones de trabajo hemos comprobado que la concentración más baja nos resulta más eficaz.

### **Conclusiones**

Para implantar la técnica de PCR en un laboratorio es necesario optimizar esta reacción en las condiciones específicas de ese laboratorio, incluso cuando se utiliza un kit comercial. Existen diversos factores que afectan a la reacción y que es preciso optimizar. En nuestro caso hemos comprobado que las condiciones más adecuadas han sido: disgregar la colonia en agua, en un volumen de 25  $\square$ l y efectuar la reacción con dos diluciones: la muestra directa y la dilución 1/10, descartando, en principio, la dilución 1/100. Sólo si no sale ninguna banda es preciso repetir la muestra llegando a la dilución 1/100. En nuestro caso también ha sido necesario optimizar la concentración de la mezcla de reacción del kit y todo ello nos ha permitido finalmente lograr encontrar las condiciones idóneas para el proceso.

### **Bibliografía**

- R.D. 1074/2002 de 18 de Octubre (B.O.E. 29/10/02) por el que se regula el "Proceso de Elaboración, Circulación y Comercio de Aguas de Bebidas Envasadas"
- R.D. 140/2003 de 7 de Febrero (B.O.E. 21/02/03) sobre los "Criterios Sanitarios de la Calidad del Agua de Consumo Humano"

**ALTERNATIVE METHODS FOR MICROBIOLOGICAL CONTROL IN POULTRY  
SLAUGHTERHOUSES: COMPARATIVE STUDY**

**Reiter M.G.R.<sup>2</sup>, López M.C.<sup>3</sup>, Jordano R.<sup>1</sup> y Medina L.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Food Science and Technology Department, University of Córdoba, Campus de Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain

<sup>2</sup>Technology Research Institute (IPT), Blumenau Regional University, SC Brazil

<sup>3</sup>Animal Production and Food Science Department, Cardenal Herrera-CEU University, E-46113 Moncada (Valencia), Spain

**- Introduction**

The sensitivity of different methods for the isolation and identification of *Campylobacter*, *Listeria* and *Salmonella* have been compared in order to assess their suitability for application in the microbiological quality control of a poultry slaughterhouse, and on naturally contaminated samples. The Vidas, Simplate, Reveal and VIP (Visual Immunoprecipitate Assay) systems have been used, together with the method habitually employed in traditional microbiology for these genera.

**- Material y Métodos**

The study was carried out in a slaughterhouse and in the poultry carving-up room. Samples of carcasses, viscera, different chicken parts, the water and the environment were analysed. After a first stage, in which the points with the greatest microbiological risk in the meat transformation and carving-up processes were detected, finally, and for each microbiological risk, some sampling points were selected, from which 120 samples were taken in order to evaluate comparatively the alternative methods employed.

The methods studied for each microorganism were: For the determination of *Campylobacter*, *Listeria* and *Salmonella*, the traditional method and the Vidas system were used to compare them to Simplate plates for *Campylobacter*, the Reveal system for *Listeria* and *Salmonella* and the VIP system for *Listeria*.

**- Results and Discussion**

***Campylobacter***. With the Vidas system, the presence of *Campylobacter* was detected in 35 samples, 26 of which were confirmed by the conventional method. It should be pointed out that the Vidas equipment detects this presence via immunofluorescence, whether the cell is viable or not, and it is not always possible to recover, for a culture, all the microbial cells present in a food whose industrial processing may cause some bacterial stress. Of these same samples only 19 were confirmed in Simplate plates, whereas by the traditional method only 11 samples were positive. The statistical analysis of the comparison of the methods used for the isolation and identification of *Campylobacter* spp. gave a  $\chi^2$  value of 35.3258, which showed the existence of significant differences ( $p < 0.05$ ) between the methods. The traditional method was seen to be less efficient in detecting it when compared to the Vidas system and in relation to the Simplate method. As was to be expected, no statistically significant differences were noted between the results of the Vidas system and its own plate confirmation ( $\chi^2 = 2.1469$ ).

The Vidas system and its subsequent confirmation when compared to the Simplate method showed significant differences. With the Vidas, the  $\chi^2$  was of 14.5868, and compared to the plate confirmation the  $\chi^2$  was 5.5803. These values indicated that there were differences between the methods, the traditional method being similar to the Simplate plates, and both different to the Vidas system with a confirmation on plates ( $p < 0.05$ ).

**Listeria.** In relation to the detection of *Listeria*, out of the 40 samples analysed, the traditional method detected 17 positive ones, while the Vidas, VIP and Reveal methods gave 28, 27 and 29 positive samples, respectively. These last values were statistically similar. The comparison of the methods for the determination of *Listeria* showed that the traditional method was less efficient when comparing it with the Vidas, VIP and Reveal systems, which behaved in the same way.

**Salmonella.** Results for *Salmonella* were the same between the traditional and Vidas methods, with 7 positive results for both cases. With the Reveal method, over twice as many positive samples, a total of 16, were found. In this case, the possible appearance of false-positives, already reported by Bird *et al.* (1999) should be considered.

When comparing the three methods used, significant differences appeared with a  $\chi^2$  of 7.200. The Reveal method was different and superior to the traditional one ( $\chi^2=0$ ) and to the Vidas system ( $\chi^2=4.9427$ ). At this point, the false-positives with the Reveal method cited by Bird *et al.* (1999) should be taken into account. The Reveal system had already been studied in a context of *Salmonella* prevalence, in comparison to VICAM and OSRT, together with the traditional method, on samples of abattoirs in Brazil, showing 5% positives compared to 33.3% with the classic method. However, more on the lines of our results, Feldsine *et al.* (2000) did not find any significant differences between VIP and the AOAC method for different types of foods contaminated naturally. However, Zhang *et al.* (2006), in 128 samples contaminated with *Salmonella* Enteritidis, obtained a statistically similar sensitivity between the classic FDA method and the Reveal system, with an improvement in results in the cases in which the enrichment was carried out in Rappaport-Vassiliadis broth.

#### - Conclusions

For the determination of *Campylobacter*, the Vidas system was seen to be more effective than the rest. In the case of *Listeria*, the conventional method gave less sensitive results than the alternative techniques, which were statistically similar to each other. For *Salmonella*, Reveal produced the results with the greatest sensitivity.

#### - References

- Aragon-Alegro L.C., Witann R.M., Padovani C.R., Landgraf M., Franco B.D. and Destro M.T. 2005. Detection of *Listeria* sp. in meat and meat products using TECRA *Listeria* Visual Immunoassay and biocontrol Visual Immunoprecipitate Assay for *Listeria* immunoassays and a cultural procedure. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, 13(3): 204-212.
- Bird C.B., Miller R.L., Miller B.M. 1999. Reveal for *Salmonella* Test System. *J. AOAC. Internat.* Vol. 82(3), 625-633.
- Borck B., Stryhn H., Ersboll A.K., Pedersen K. 2002. Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. *J. Appl. Microbiol.* 92(3), 574-82.
- Feldsine P.T., Lienau A.H., Leung S.C. and Mui L.A. 2002. Method extension study to validate applicability of AOAC official method 997.03 Visual Immunoprecipitate assay (VIP for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* spp. from environmental surfaces: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, 85(2): 470-478.
- Feldsine P.T., Mui L.A., Forgey R.L. and Kerr D.E. 2000. Equivalence of Visual Immunoprecipitate Assay (VIP for *Salmonella* for the detection of motile and nonmotile *Salmonella* in all foods to AOAC culture method: Collaborative study. *J. AOAC Int.*, 83(4): 888-902.
- Pinto J.P., Cataneo A., Landgraf M., Destro M.T. and Frano D.G. 2003. Use of three rapid detection systems to evaluate the prevalence and dissemination of *Salmonella* in a Brazilian poultry slaughterhouse. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, 11(4): 245-263.
- Zhang L., Yan Z.N. and Ryser E.T. 2006. Comparison of the reveal test, the US food and drug administration culture method, and selective media for recovery of *Salmonella* Enteritidis from commercial egg layer flock environments. *J. Food Prot.*, 69 (11): 2766-2769.

## ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CONSERVACIÓN Y RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS: SALMONELLA Y ENTEROCOCCUS.

Sánchez Cánovas, A.M.,<sup>1,2</sup>, Martínez Reina, G.<sup>1</sup>, Navarro de Haro, F.<sup>1</sup>, Vilella Martínez, M.D.<sup>1</sup>,  
Barnés Campos, M.J.<sup>1</sup>, Vivas Gil, A.M.<sup>1</sup> y Pacheco Martínez, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología. Consejería de Sanidad de Murcia. Ronda de Levante 11. 30008 Murcia. <sup>2</sup>ana.sanchez@carm.es

### **Introducción y Objetivos**

El control de calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica.

Para lograr resultados satisfactorios y deseados en el campo del control de calidad, es necesario disponer de microorganismos que sean capaces de facilitar y garantizar la calidad en el desarrollo del trabajo. Para poder utilizar dichos microorganismos es necesario conservar correctamente las cepas microbianas en el Laboratorio de Microbiología. Durante el tiempo de conservación hay que conseguir que sobreviva un elevado porcentaje de células y evitar que se produzcan contaminaciones (que el cultivo sea puro). Dependiendo del microorganismo concreto con el que se trabaje, el método de conservación más adecuado va a variar. En este trabajo se comparan distintas condiciones de conservación y recuperación para *Salmonella enterica* y *Enterococos faecium*.

### **Material y Métodos**

Se reconstituyeron dos cepas de la CECT: *Salmonella enterica* (CECT 4300) y *Enterococos faecalis* (CECT 795) en 100 ml de Caldo Nutritivo (Oxoid) y tras incubar 24h a 37°C se comprobaron sus concentraciones respectivas mediante la preparación de diluciones decimales seriadas en agua de peptona (desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) y siembra de 1 ml en agar nutritivo (siembra en profundidad). A partir de estas soluciones en Caldo Nutritivo ("Soluciones Madre") se han ensayado diversos métodos para conservar los microorganismos a fin de poder utilizarlos posteriormente en el control de calidad de nuestro Laboratorio:

- a) Preparación de una suspensión en Agua de Peptona, a la concentración adecuada. Distribución en alícuotas y congelación a -20°C. Esta suspensión se utilizó directamente tras descongelación.
- b) Preparación de una suspensión en Agua de Peptona, a la concentración adecuada, adicionada de un 15% de glicerol. Distribución en alícuotas y congelación a -20°C. Esta suspensión se utilizó directamente tras su descongelación.

En el caso de *Salmonella enterica* se ha ensayado, además, la obtención y utilización de criobolas. Para ello se sembró una alícuota de la "Solución Madre" en Agar Nutritivo, en superficie, y tras incubar a 37°C/24h, se utilizó una pequeña porción del crecimiento del cultivo puro, recogido mediante un asa de siembra, para la obtención de criobolas con el microorganismo. Las criobolas se mantuvieron en congelación a -20°C, hasta su utilización. Se han ensayado tres variantes para su utilización:

- c) Suspensión de una criobola en 9 ml de Agua Destilada e incubación a 37°C/24h. Esta suspensión se considera la cepa de trabajo. A partir de ella se elaboran, cada vez que se necesita la cepa, diluciones seriadas en Agua de Peptona (desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>).
- d) Diseminación de una criobola por la superficie de una placa de Agar selectivo (SS y SM2). Incubación a 37°C/24h. Del crecimiento obtenido (cepa de trabajo), se recoge suficiente cantidad de colonias y se resuspende en un tubo de agua destilada estéril, hasta conseguir una turbidez 1 de la escala MacFarland. A partir de esta suspensión, se realizan diluciones seriadas en agua destilada estéril (desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>).
- e) Suspensión de una criobola en 9 ml de Caldo Nutritivo e incubación a 37°C/24h (cepa de trabajo). A partir de ella se elaboran, cada vez que se necesita la cepa, diluciones seriadas en Agua de Peptona (desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) y se utiliza una alícuota que nos permita utilizar la concentración adecuada para el uso que se le vaya a dar a la cepa (generalmente se utiliza una alícuota de la dilución 10<sup>-5</sup> o de la 10<sup>-6</sup>).

Estas cepas de trabajo procedentes de las criobolas, se conservaron en refrigeración como máximo un mes.

### **Resultados y Discusión**

En el caso de *Salmonella enterica* y *Enterococos faecalis* se ensayó, inicialmente, la utilización de una suspensión de estos microorganismos en Agua de Peptona. Tras la descongelación de estas suspensiones se comprobó que, mientras que al sembrar una alícuota de *Salmonella* en los medios selectivos SS y SM2, no se produjo ningún crecimiento de la cepa (no resistió la congelación), la siembra de una alícuota de *Enterococos faecalis* en Chromocult enterococos sí que lo produjo, demostrando que este microorganismo era resistente a este método de conservación. De hecho, la suspensión de *Enterococos faecalis* se mantuvo relativamente estable durante unos 5 meses y a partir de entonces sus valores disminuyeron.

Se decidió preparar de nuevo las suspensiones de estos microorganismos en Agua de Peptona, pero añadiendo un crioprotector: glicerol al 15%. De este modo, se consiguieron recuperar algunos microorganismos en el caso de *Salmonella enterica*, aunque bastantes menos de la cantidad original. Así, tras 4 días de congelación, se cuantificó: en Agar SM2, un 14% de la masa inicial, y en SS, tan sólo un 6,5%. Y al aumentar el periodo de congelación, disminuyeron aún más estos valores: tras unos 7-8 días, la recuperación fue ya nula. *Enterococos faecalis* siguió ofreciendo buenos resultados de conservación en estas condiciones.

Dado los malos resultados obtenidos con *Salmonella* se prefirió optar por otro método de conservación: la utilización de criobolas. Este estudio se realizó solo con *Salmonella enterica*, ya que se realizaron tres variantes del método.

Se comprobó que en el crecimiento obtenido según el método (c): “siembra de la criobola en agua destilada”, las concentraciones podían ser bajas (en torno a 1000 ufc/ml) para algunas utilidades que queríamos darle a la cepa, mientras que con el procedimiento seguido en d: “siembra de la criobola en placa y obtención de suspensión con turbidez 1 de la escala MacFarland” los valores eran muy superiores (alrededor de 30.000 ufc/ml) y este último permitía además obtener concentraciones más altas si modificábamos la turbidez inicial. Sin embargo tampoco este método nos pareció óptimo ya que era poco reproducible: la preparación de la suspensión de turbidez 1 en la escala MacFarland conducía a resultados bastante diferentes cada vez que se preparaba. Por ello se optó por ensayar una tercera metodología con las criobolas: el método (e): “siembra de la criobola en agua de peptona”. que es el que finalmente nos ha parecido más adecuado. A diferencia del método “c” se pueden obtener recuentos altos y con respecto al procedimiento “d”, es bastante más repetitivo. La suspensión además es estable, mantenida en refrigeración, durante un mes. Hemos obtenido resultados similares con *Enterococos faecium*.

### **Conclusiones**

Se ha comprobado que los mejores resultados para la conservación y utilización de las cepas, de entre los métodos ensayados, se han obtenido mediante el uso de criobolas. Aunque cualquiera de las variantes ensayadas con ellas permite recuperar la cepa, la más reproducible y que permite obtener una escala mayor de concentraciones a ensayar es el sistema de incubación de la criobola en caldo nutritivo y utilización de esta suspensión como cepa de trabajo.

### **Referencias Bibliográficas**

- García MD, Uruburu F. “La conservación de cepas microbianas”. Act SEM. 2000; 30: 1-8.
- “Sistema para crioconservación de cepas microbianas. Manual de Usuario”. Vibakstore. Nirco.

**VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE ALIMENTOS MEDIANTE LOS ENSAYOS INTERCOMPARATIVOS SEILALIMENTOS**

***Sanchis J.<sup>1</sup>, Sanchez E.<sup>1</sup>, Rook N.<sup>1</sup>, Ajates, S.<sup>1</sup> y de la LLana A.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Laboratorios MICROKIT, S.L, Apdo. de correos 44, 28210-Valdemorillo (Madrid)  
microkit@laboratoriosmicrokit.com

- **Introducción y Objetivos**

Mediante la coordinación de los servicios intercomparativos SEILALIMENTOS de microbiología alimentaria, hemos tenido el privilegio de estudiar y conocer la mayor o menor efectividad de los distintos métodos analíticos oficiales implantados en los laboratorios participantes.

El objetivo de este artículo es mostrar a todos los interesados cuales son los puntos que se demuestran más críticos en la realidad del laboratorio de control, y cuyas optimizaciones se han plasmado en su totalidad en los Protocolos MICROKIT de análisis microbiológicos de alimentos.

- **Material y Métodos**

Comparamos los resultados de los 100 laboratorios participantes en SEILALIMENTOS en función de los métodos y medios de cultivo que utilizaban, durante 10 años (35 servicios), 730 muestras de todo tipo (35 clases) de matrices alimentarias, para los 14 parámetros microbiológicos incluidos.

- **Resultados y Discusión**

En la exactitud y precisión de los parámetros cuantitativos (*Bacillus cereus*, *E.coli*, Coliformes, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos, Hongos -levaduras y mohos-, Aerobios mesófilos y Enterobacterias) no se observan diferencias significativas mediante la herramienta z-scores, que se demuestra ineficaz para este tipo de estudios, al haberse observado que los recuentos de *Cl. perfringens*, Hongos y Enterobacterias son realmente conflictivos.

Sin embargo en las investigaciones cualitativas, la sensibilidad, especificidad y eficiencia demostradas en todos los parámetros comparados (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *E.coli*, *E.coli* O157, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos, *Staphylococcus spp.* coagulasa negativos, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, Hongos -levaduras y mohos- y Enterobacterias) para el protocolo optimizado por MICROKIT es prácticamente de un 100%, mientras que en la implementación de los protocolos oficiales por parte de los laboratorios participantes se detecta una eficiencia media de un 70,90% (casi 1 falso positivo o falso negativo cada 3 análisis). Los límites de detección son a menudo inadecuados en los métodos oficiales implantados (ej. 70 ufc/25 g) y se acercan mucho más a lo que resulta necesario (ej. 5 ufc/25 g), en los protocolos bien implantados y optimizados por MICROKIT.

Los alimentos demuestran así ser la matriz más complicada de cuantas conocemos, ya que en los estudios paralelos de intercomparación que ya hemos publicado de microbiología de aguas, la eficiencia se demuestra de un 80% y en los de productos cosméticos, de un 78% (casi 1 falso positivo o falso negativo de cada 5 análisis).

Achacamos la base principal de este problema a la no inactivación de los conservantes/inhibidores que contienen (añadidos, naturales o incluso desconocidos) muchos alimentos, ya que queda radicalmente optimizado en los laboratorios que, siguiendo nuestro consejo (1), han sustituido el Agua de Peptona Tamponada de la solución madre, por el caldo LPT Neutralizing Broth de MICROKIT, el mismo que se utiliza en microbiología cosmética con excelentes resultados por parte de los laboratorios que lo han implementado en sustitución del clásico Lethen Broth.

Por todo ello, los protocolos MICROKIT quedan validados como referente fundamental en microbiología de alimentos.

- **Conclusiones**

1-La proporción de resultados incorrectos (falsos positivos + falsos negativos) utilizando los métodos oficiales es muy elevada (29,1%), probablemente a causa de la falta de inactivación los de conservantes (conocidos o no) que hay en la mayoría de alimentos.

2-Los parámetros más conflictivos en microbiología alimentaria resultan ser:

PARÁMETRO	EFICIENCIA
1º <i>Staphylococcus aureus</i>	65 %
2º <i>Listeria monocytogenes</i>	66 %
3º Hongos (levaduras y mohos)	70 %
4º <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos	71 %
5º <i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	72 %
6º <i>Bacillus cereus</i>	75 %
7º <i>E.coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , y <i>Shigella spp.</i>	77 %
8º <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82 %
9º <i>E.coli</i> O157	90 %

Achacamos la ineficiencia de los estafilococos a la interpretación inadecuada de la coagulasa por buena parte de los laboratorios, sobre todo los que usan RPF y prescinden de los látex.

La ineficiencia en *Listeria monocytogenes* se ha visto muy minimizada en los últimos años gracias a la implantación de la addenda 2004 de la ISO 11290, en la que se promueve el uso del medio de aislamiento diferencial Ottaviani & Agosti (en concreto, los laboratorios que usan el Agar CHROMOCYTOGENES) y la sustitución del agar-sangre.

El problema de los hongos es que la mayoría de laboratorios desatienden nuestra recomendación de agitar inmediatamente antes de cada dilución o siembra, ya que sus esporas flotan en cuestión de segundos, por lo que las alícuotas de la mitad del tubo recuperan muy poco o nada si no está recién agitado. Se ve que los recuentos son más claros y sensibles en Rosa Bengala Caf. Agar (2).

Los Clostridios, sin ser tan problemáticos como en aguas (29% de eficiencia), demuestran que la siembra en profundidad con doble capa y sin agitación/oxigenación, es imprescindible aunque se utilicen atmósferas anaeróbicas bien controladas.

Un resultado tan mediocre en el microorganismo más buscado en el mundo (*E.coli*) y en dos de los más peligrosos (*Salmonella spp.* y *Shigella spp.*) nos alerta de que los medios clásicos han sido muy mejorados por algunos de los modernos medios, sean cromogénicos (en concreto el MUGPLUS Agar (3), el Chromocult-Coliform Agar y el CHROMOSALM Agar (4)) o no (SS Broth).

3-Las matrices más conflictivas son, por orden decreciente: soja, salchichas, carne en polvo, azúcar, sal, pimentón, huevo, leche en polvo, malta, harina de pescado, leche, harina de trigo, queso, mayonesa, arroz-judías, crema de cacao, levadura, mejillones, lactosa, hamburguesas, pollo, pescado y zumos. Vemos que no es un problema específico, sino general (23 de 35, 66% de las matrices).

4-Los medios cromogénicos para recuento de aerobios en placa, en concreto PCA-cromogénico de MICROKIT y Compact-Dry-Plates®-TC de Nissui pharma, obtienen resultados más cercanos a la realidad que el clásico PCA, a causa de que las colonias, rojas, destacan sobre el color del medio y sobre las partículas de muestra, de modo que el ojo es capaz de observar más colonias de tamaño pequeño y sin cansarse. También queda validada la adición a 45°C de TTC en el PCA.

5-Se observa que la siembra en masa por inclusión en agar caliente para el recuento de aerobios es un punto crítico más importante de lo que imaginábamos, ya que numerosos laboratorios confían en su tacto y no esperan a que el medio esté suficientemente frío, impidiendo así muy a menudo el crecimiento de parte de los microorganismos presentes. Estos falsos negativos (o recuentos bajos) se demuestra, también gracias a SEILALIMENTOS, que quedan totalmente descartados con métodos más modernos de siembra en masa sin calentamiento, como las Compact-Dry-Plates®.

#### - Referencias Bibliográficas

- (1)- 05/1998 Sanchis, J. XI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Pamplona Estudio Intercolaborativo entre los distintos caldos de cultivo generales.
- (2)- 05/1996 Sanchis, J. Técnicas de Laboratorio, Nº 211. Comparación entre los diversos medios comerciales para aislamiento de hongos (levaduras y mohos).
- (3)- 09/1999 Santos, C.J., Araujo, M., Gómez, M.J., Garrido, M.J. XVII Congreso de la S.E.M. Granada. Evaluación de medios de cultivo para la detección de *Escherichia coli* en aguas.
- (4)- 11/2002 Sanchis, J. Validación del medio cromogénico CHROMOSALM de MICROKIT para *Salmonella* mediante un estudio intercolaborativo. Técnicas de Laboratorio, Tomo XXV, Nº 281.

**DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN ALIMENTOS POR MÉTODOS CULTURALES, MÉTODOS INMUNOLÓGICOS Y PCR.**

***Solís I.<sup>1</sup>, Arnau A.<sup>1</sup>, Aznar, R.<sup>2</sup> y Elizaquivel, P.<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>IPROMA S.L. Apartado de correos 8106, 12080 Castellón, isolis@iproma.com

<sup>2</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)(CSIC). Apartado correos 73, Burjassot, 46100, Valencia, rosa.aznar@uv.es

**– Introducción y Objetivos**

*E. coli* O157:H7, pertenece al grupo de los *E. coli* entero – hemorrágicos (EHEC), y destaca entre los otros serotipos por su especial virulencia y por ser el causante de numerosos brotes epidémicos en los últimos 20 años. Actualmente está considerado como uno de los patógenos emergentes más importantes. Su principal reservorio es el intestino del ganado bovino y la dosis infectiva se estima en 10<sup>8</sup> ufc. En España, actualmente la legislación no contempla su análisis de forma obligatoria en ningún alimento, sólo en algunos casos de exportación y por petición del país al que llega el producto. No obstante, existe una norma oficial para el análisis de este microorganismo cuya referencia es UNE – EN ISO 16654 y que se basa en técnicas de cultivo, combinadas con un paso de inmunocentración. Se trata de un método que requiere de tiempos de análisis de hasta 5 días en caso de muestras positivas. Existen actualmente métodos alternativos que intentan acortar los tiempos de análisis basados principalmente técnicas de inmunoensayo como el VIDAS<sup>®</sup> y técnicas de PCR que mediante una DNA polimerasa termoestable y un par de cebadores específicos del patógeno a detectar, permite obtener un amplicón que determina la presencia del microorganismo diana. Se trata de un método independiente de cultivo y que puede aplicarse a poblaciones microbianas mixtas, por lo que resulta rápido, específico y sensible.

El objetivo de este trabajo es comprobar la incidencia de este patógeno en muestras reales de alimentos mediante el uso de las tres técnicas: método cultural (método UNE-EN ISO 16654), inmunológica (método VIDAS<sup>®</sup>) y Rti-PCR.

**– Material y Métodos**

En el estudio se han utilizado un total de 128 muestras (72 de productos cárnicos y 54 de vegetales). Independientemente de la técnica empleada, se parte una suspensión inicial formada por 25 g de muestra y 225 ml de caldo triptona soja modificado por la adición de novobiocina (m-TSB). En el caso del método cultural se sigue lo establecido en la norma UNE-EN ISO 16654 en cuanto a temperaturas y tiempos de incubación. Para realizar el método inmunoenzimático automatizado (VIDAS<sup>®</sup>) se sigue lo establecido en el procedimiento proporcionado por la casa comercial BioMérieux. Para la detección por PCR Se partió de 1 ml de cultivo de 18 horas en TSB. La extracción y purificación de DNA se realizó mediante el sistema DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). El DNA se eluyó en un volumen final de 100 µl y se utilizó 1 µl para amplificación por PCR. Para la amplificación se utilizaron los cebadores de *E. coli* O157:H7 uidAR383 (5'ACCAGACGTTGCCACATAATT3') y uidAF241 (5'CAGTCTGGATCGCGAAACTG3') y la sonda uidAP266 (5'NED-ATTGAGCAGCGTTGG3'), todos ellos dirigidos al gen *uidA* (número de acceso de la secuencia AF305917). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl que contenían 10 µl Master Mix, 1 µl de cada cebador (uidAR y uidAF), 0.1 µl de la sonda (uidAP), 5 µl de DNA molde y agua hasta completar el volumen. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturalización, seguidos de un paso de annealing de 1 minuto a 63°C. Para la amplificación y detección a tiempo real se utilizó el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

**– Resultados y Discusión**

Se han analizado un total de 128 muestras entre las que hay 72 muestras de productos cárnicos y 54 muestras de productos vegetales de cuarta gama. Las muestras de productos cárnicos pertenecían a carnes picadas preparadas en bandejas y de distintas marcas comerciales procedentes de vacuno, porcino, pollo y mezcla de varias procedencias. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Matriz	Nº muestras	ISO 16654		Vidas		RTi-PCR
		P/P <sup>1</sup>	P/C <sup>2</sup>	P/P	P/C	
Carne (vacuno)	35	2	2	2	2	5
Carne (porcino)	21	0	0	0	0	1
Carne (pollo)	8	0	0	0	0	0
Carne (vacuno + porcino)	8	0	0	0	0	0
Vegetales	38	0	0	0	0	2
Vegetales + hortalizas	16	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>P/P, Presunto positivo; <sup>2</sup>P/C, Positivo confirmado.

De las 72 muestras de cárnicos analizadas, 2 dieron positivas por las tres técnicas y 4 dieron positivas sólo por RTi-PCR. En estos 4 casos, no fue posible obtener colonias que confirmaran la existencia de células “viables y cultivables”. De las 54 muestras analizadas de vegetales de cuarta gama, sólo dos de ellas fueron positivas por RTi-PCR y en ningún caso se consiguió aislar colonias por los otros dos métodos. Tanto la técnica cultural como la técnica inmunológica dieron los mismos resultados positivos en las mismas muestras y sólo en el caso de la técnica de RTi-PCR se obtuvo un mayor número de positivos, aunque al no poder aislar las colonias y mostrar así la viabilidad de las bacterias, no podemos hablar de su posible poder infeccioso. Aún así destacar que estos resultados suponen la obtención de un 3,7 % de muestras positivas en el caso de vegetales y un 8,3 % en el caso de productos cárnicos, algo que pensamos es elevado y nos disponemos a analizar más muestras para ver si se mantiene el porcentaje o disminuye.

#### • Conclusiones

En las dos últimas décadas se ha producido un incremento en los casos de diarrea enterocolítica producida por *Escherichia coli* O157:H7. Aunque las infecciones causadas por este patógeno han sido fundamentalmente debidas a los productos de origen animal (sobre todo carne y leche de vacuno), el aumento creciente en el consumo de productos vegetales frescos, listos para el consumo, ha llevado a la aparición de brotes epidémicos con origen en productos vegetales. Las últimas aproximaciones para la detección de este patógeno emergente se basan en técnicas moleculares, inmunológicas o de PCR. Las inmunológicas incluyen la detección del antígeno somático (O157) y del antígeno flagelar (H7), mientras que las de PCR incluyen la detección de genes implicados en la virulencia de este serotipo como *stx1*, *stx2*, *eaeA* o el *uidA*. En este trabajo se ha realizado una comparación entre los métodos existentes actualmente para determinar este patógeno. Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que existen alternativas rápidas y fiables al método cultural tradicional establecido por la norma UNE-EN ISO 16654, tanto inmunológicas como moleculares. En el caso de las técnicas moleculares, se obtiene un resultado fiable entre 24 y 30 horas desde el inicio del análisis, lo que nos permite liberar o retirar producto del mercado en menos tiempo, lo que beneficia enormemente a la industria agroalimentaria garantizando la seguridad microbiológica.

#### – Referencias Bibliográficas

CEBULA *et al.*, (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:248-250.

FENG *et al.*, (1993). Identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNA probe specific for and allele of *uidA* gene. *Molecular and Cellular Probes* **7**:151-154.

GRANT *et al.*, (2006). Multiplex Real-Time PCR Detection of Heat-Labile and Heat-Stable Toxin genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* **69**:412-416.

JINNEMAN *et al.*, (2003) Multiplex Real-Time PCR Method To Identify Shiga Toxin Genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157:H7/H- Serotype”. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:6321-6333.

NATARO *et al.*, (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology* **11**:142-201.

SELMA *et al.*, (2007). Potential microbial risk factors related to soil amendments and irrigation water of potato crops. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

**ESTUDIO EVOLUTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROTIPO [4,5,12:i:-] MEDIANTE DIVERSAS TÉCNICAS DE PCR**

**J. Garaizar<sup>1</sup>, L. Laorden<sup>1</sup>, L. Kromidas<sup>1</sup>, J. Bikandi<sup>1</sup>, S. Herrera<sup>2</sup>, A. Echeita<sup>2</sup>, A. Rementeria<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Campus de Araba, Vitoria-Gasteiz, y Campus de Vizcaya, Leioa

<sup>2</sup>Sección de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda

### **1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La salmonelosis es una de las toxiinfecciones alimentarias transmitidas a través de productos y subproductos de origen animal más importante en los países desarrollados, siendo *Salmonella enterica* el principal microorganismo responsable. En la última década se han detectado cepas de *Salmonella* multiresistentes debido principalmente al abuso de antimicrobianos en las explotaciones animales. Estos hechos junto con su enorme difusión en múltiples ecosistemas motivan la necesidad del seguimiento y vigilancia de la difusión de cepas y el estudio epidemiológico de brotes epidémicos causados por *Salmonella*. Actualmente esta se realiza tanto a nivel regional como internacional mediante técnicas fenotípicas y pruebas genotípicas, pero se requiere de métodos de identificación y caracterización molecular que complementen y amplíen estas técnicas.

En 1997 se detectó en España la emergencia de una variante monofásica de *Salmonella*, identificada como *Salmonella enterica* subsp. I ser. 4,5,12:i:-, que se difundió con rapidez y se ha convertido en uno de los serotipos más frecuentemente aislados en nuestro país. Este serotipo también ha sido detectado más recientemente en otros países como EEUU y Canadá. Con el objetivo de conocer el origen de estas cepas, nuestro grupo de investigación caracterizó cepas de este serotipo mediante la tecnología de las micromatrices de ADN (microarrays), frente al genoma de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium cepa LT2, detectando cinco deleciones en el genoma y una amplificación. Entre las deleciones destaca la detectada en la sección genética responsable de la síntesis de los flagelos de segunda fase. Estas cepas del ser. 4,5,12:i:- se consideran pertenecientes al fagotipo U302 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium que han perdido el operón responsable del cambio de fase flagelar.

El objetivo principal de esta investigación es caracterizar la deleción hallada en el operón *fljAB* para intentar recavar información sobre el origen evolutivo de estas cepas y demostrar la eficacia de los iniciadores empleados en la PCR, como marcadores epidemiológicos de este nuevo serotipo.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se han analizado 60 cepas caracterizadas como *Salmonella enterica* serotipo [4,5,12:i:-]. Todas se obtuvieron del laboratorio de referencia de *Salmonella* del Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid). Como control negativo se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium cepa LT2 de la colección de la Facultad de Farmacia de la UPV/EHU. Las cepas fueron sembradas en placas con TSA (agar soja tripticaséina) y posteriormente fueron incubadas 24 horas a 37° C. La extracción de DNA se realizó por ebullición. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se diseñaron dos parejas de iniciadores específicos para amplificar la deleción. La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Sistemas Genómicos S.A., mediante la técnica *Big Dye Terminator*. El análisis y estudio de la secuencias se realizó mediante diversos programas informáticos.

### **4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

En todas las cepas analizadas se observa una deleción de 15 genes que incluyen el operón *fljAB*, desde el gen STM 2757 al gen *iroB* (STM 2774). En todos los casos se ha detectado la secuencia de inserción IS26 en el centro de la deleción. Sin embargo, el tamaño del fragmento delecionado es variable, afectando parcialmente al gen *iros* y el tamaño varía entre las cepas, permitiéndonos diferenciar las cepas en tres tipos. En base a estos hallazgos, podemos sugerir que la deleción sucedió en tres ocasiones diferentes en el ancestro común y que con el transcurso de los años no ha habido más variaciones importantes en las secuencias. Esta estabilidad nos hace proponer los iniciadores diseñados como eficaces marcadores epidemiológicos para la detección, control, diferenciación y seguimiento de este nuevo serotipo.

Dada la alta similitud entre *Salmonella enterica* serotipo [4,5,12:i:-] y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, consideramos que el posible origen de este serotipo se podría encontrar en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fagotipo U302. Este fagotipo posee el plásmido U302, en el que se

encuentran varias copias de la secuencia de inserción IS26. El salto de una copia de la secuencia de inserción IS26 al genoma podría haber provocado la delección y, como hemos comprobado, el evento genético habría sucedido al menos en 3 ocasiones diferentes. Actualmente estamos llevando a cabo diferentes técnicas que nos permitan reforzar esta teoría sobre el origen de éste nuevo serotipo.

#### **5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**-Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M.** 2002. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2074-8.

## DETECCIÓN DE SALMONELLA MEDIANTE DOS MÉTODOS DE PCR A TIEMPO REAL

***Santaolalla I.<sup>2</sup>, Perez F.<sup>2</sup>, Martínez-Ballesteros I.<sup>1</sup>, Lopitz F.<sup>3</sup>, Bikandi J.<sup>1</sup>, Rementeria A.<sup>1</sup>, Garaizar J.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco. Vitoria-Gasteiz.

<sup>2</sup>Laboratorios Bromatológicos Araba. Vitoria-Gasteiz.

<sup>3</sup>CIC Biogune. Parque Tecnológico de Zamudio. Bizkaia.

### - Introducción y Objetivos

*Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial, siendo en algunos lugares la causa principal de brotes e infecciones por causas alimenticias. Para poder disminuir la probabilidad de contagio a las personas es indispensable tener un buen control tanto de los alimentos distribuidos a los consumidores como de la calidad del agua consumida. Por eso, la capacidad de disponer de un método rápido, fiable y preciso que determine la presencia o ausencia de un patógeno en las muestras analizadas se está volviendo cada vez más necesaria para así poder asegurar de forma rápida la salud de las personas.

El objetivo de este estudio fue crear un método rápido y preciso de detección de *Salmonella* basado en técnicas de biología molecular, que permitiese reducir los tiempos empleados en la detección mediante métodos tradicionales de cultivo. Para ello se utilizó la PCR a tiempo real, una técnica cada vez más empleada por los laboratorios de investigación y se diseñó por un lado un método basado en la detección de *Salmonella* mediante el fluoróforo SYBR-Green y por otro lado un método con una sonda TaqMan.

### - Material y Métodos

Por un lado se diseñó un método basado en la detección utilizando el fluoróforo SYBR-Green. Se eligieron unos iniciadores descritos anteriormente en la literatura por Rahn y colaboradores dirigidos a amplificar una zona del gen *invA* de *Salmonella*. Se diseñó un control interno de amplificación siguiendo una estrategia análoga a la seguida por Hoofar y colaboradores, de este modo se diseñó un control interno quimérico utilizando ADN comercial de fago  $\lambda$ . Se analizaron un total de 47 cepas de *Salmonella* y otros microorganismos relacionados mediante este método de PCR a tiempo real.

Por otro lado se diseñó una sonda TaqMan marcada con un fluoróforo, a la que se denominó Invavitwo, y sus correspondientes iniciadores flanqueantes dirigidos como en el caso del SYBR-Green a amplificar una zona del gen *invA* de *Salmonella*. Siguiendo la misma estrategia que para el diseño del control interno del SYBR-Green, se diseñó un control interno quimérico para este otro método, pero en este caso, se tuvo que diseñar una segunda sonda marcada con un fluoróforo diferente al de la sonda Invavitwo, para poder así detectar el control interno en la reacción de PCR y poder diferenciarlo del fragmento específico de *Salmonella*. Se realizaron dos tipos de análisis con este método: la detección de ADN de *Salmonella* y la detección de ARN de *Salmonella* para detectar células viables. Se analizaron diferentes cepas de *Salmonella* de distintos serotipos además de otros microorganismos relacionados.

### - Resultados y Discusión

Mediante el método diseñado de detección con SYBR-Green se pudieron detectar todas las salmonelas analizadas y no se generó ningún falso positivo. Se comprobó que el control interno funcionaba bien debido a que aparecía su señal en los casos en los que el resultado para *Salmonella* debía ser negativo, pudiendo comprobar de este modo que no eran falsos negativos.

A la hora de detectar el ADN de *Salmonella* mediante la sonda Invavitwo, se pudieron detectar todas las cepas analizadas menos una *Salmonella* del serotipo Montevideo. En la detección del ARN, no pudieron ser detectadas 4 de las 44 cepas de *Salmonella* analizadas. El control interno funcionó correctamente, pudiendo descartar posibles inhibiciones de la reacción en los resultados negativos para las salmonelas.

**- Conclusiones**

Ambos métodos, debido a su rapidez y fiabilidad, resultan de gran interés para su aplicación en la detección de *Salmonella*. Se han diseñado pensando en ofrecer una alternativa más rápida a las técnicas convencionales de las que se disponen hoy en día para detectar *Salmonella*. La utilización, en ambos casos, de un control interno de amplificación permite detectar posibles inhibiciones de las PCRs, generando de este modo resultados fiables en las mismas.

**- Referencias Bibliográficas**

Csordas, A.T., Barak, J.D., Delwiche, M.J. (2004) Comparison of primers for the detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 39, 187-193.

Hoorfar, J., Ahrens, P., Rasdström, P. (2000) Automated 5' nuclease assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3429-3435.

Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., Bunge, C., Dorn, C., Helmuth, R. (2003b) Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology* 89, 241-249.

Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galán, J.E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C.L. (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6, 271-279.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *ASPERGILLUS TUBINGENSIS* PRODUCTORAS DE OCRATOXINA A EN VINO

López-Mendoza M.C.<sup>1</sup>, Martínez-Navalón B.<sup>2</sup> y Martínez-Culebras P.V<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Producción Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad CEU Cardenal Herrera. Edificio Seminario s/n, 46113. Moncada (Valencia). [clopez@uch.ceu.es](mailto:clopez@uch.ceu.es).

<sup>2</sup>Centro de Salud Pública de Alzira. Conselleria de Sanidad. C/ Pau, s/n, 46600 Alzira (Valencia)

<sup>3</sup>Dpto. Medicina Preventiva. Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100 (Valencia)

## Introducción y objetivos

El vino se ha identificado como la segunda fuente de ingesta de ocratoxina A (OTA) en la población europea después de los cereales. Ello ha motivado que la Comisión Europea (Reglamento CE N° 123/2005) haya establecido un máximo tolerable de OTA de 2 ppb, en vino y en otros productos derivados de la uva. Los últimos estudios demuestran que las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (*Aspergillus* negros) son la principal fuente de contaminación del vino por OTA (Battilani et al., 2006). Aunque *Aspergillus carbonarius* es el mayor responsable de la contaminación de los vinos por OTA, la gran incidencia de las especies que forman el agregado *Aspergillus niger* y su capacidad para producir OTA, sugieren una importante contribución a la contaminación de los vinos por OTA por parte de estas especies. Entre ellas destaca *Aspergillus tubingensis*, la especie del agregado *A. niger* que registra el mayor porcentaje de aislamientos en uvas (Martínez-Culebras and Ramón, 2007). La taxonomía de las especies que forman el agregado *A. niger* es muy compleja y la mayoría de las especies son morfológicamente indistinguibles, por lo que es difícil conocer su distribución e incidencia en la naturaleza (Abarca et al., 2004; Samson et al., 2004). Este trabajo tiene por objetivo generar un protocolo que permita diferenciar entre cepas de la especie *A. tubingensis*.

## Materiales y Métodos

**Aislamientos.** Se analizaron un total de 46 cepas de *A. tubingensis* procedentes de 22 parcelas localizadas en las provincias de Valencia y Alicante, y que representan 9 variedades de uva y tres denominaciones de origen (Valencia, Alicante y Utiel-Requena). De cada parcela se recogieron 10 muestras aleatorias (un solo racimo de uva) a lo largo de las dos diagonales. En el laboratorio, de cada racimo se eligieron 5 granos de uva de manera aleatoria y se colocaron en placas petri de medio de cultivo Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol medium (DRBC). Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Posteriormente los hongos aislados se repicaron en medio de extracto de malta (MEA). También se analizaron otras cepas del agregado *A. niger* así como un importante número de cepas de referencia.

**Extracción de DNA.** La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de 100 mg de micelio crecidos en placas con medio MEA y se llevó a cabo con el "kit" de extracción EZNA (Omega bioteck) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor.

**PCR y digestiones con enzimas.** Se amplificó mediante PCR un fragmento de 844 pb del dominio acil transferasa (AT) de la enzima poliquetido sintasa (PKS). Los productos amplificados por PCR se digirieron con los enzimas de restricción *Bccl*, *HaeIII*, *HpaII*, *Mbol* y *TaqI* (Fermentas Life Science) y los productos resultantes se separaron en geles de agarosa al 3% en tampón TAE.

## Resultados y Discusión

En este trabajo se ha identificado un total de 46 cepas de *A. tubingensis* aisladas de uvas. La identificación se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de un fragmento del dominio AT de la PKS, una enzima implicada en la síntesis de OTA (O'Callagan et al., 2003) y posterior digestión de dicho fragmento con las enzimas de restricción *Bccl*, *HaeIII*, *HpaII*, *Mbol* y *TaqI*, previamente seleccionadas mediante un análisis de restricción "in silico" de secuencias AT de especies de referencia de *Aspergillus* negros. Los patrones de restricción de cada una de las enzimas se

denominaron con las letras A, B, C y la combinación de éstos dio como resultado 5 patrones (I, II, III, IV y V) que se corresponden con diferentes cepas de *A. tubingensis*. Tres de estos patrones presentan una incidencia bastante alta. Un total de 26 aislados (56.5%) se identificaron como tipo I, 9 aislados (20.6%) tipo II, 9 aislados (20.6%) tipo III y sólo 1 aislado (2.5%) para los tipos IV y V. La utilización de esta técnica molecular es una herramienta alternativa a la taxonomía morfológica en este grupo de hongos. Además, la rapidez en la identificación mediante esta técnica permitiría analizar un gran número de muestras y llevar a cabo estudios de distribución en la naturaleza de las diferentes cepas de la especie *A. tubingensis*.

### **Bibliografía**

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J., 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 33–49.

Battilani P., Magan N. and Logrieco A. (2006). European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 111: S2-S4.

Martínez-Culebras P.V. and Ramón D. (2007). An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 113: 147-153.

O'Callaghan J., Caddick M.X. and Dobson A.D.W. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149: 3485–3491.

Samson R.A., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M. and Frisvad J.C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45-61.

SESIÓN II. 16/09/08. HORA: 11.00-12.00

## PRODUCTOS FERMENTADOS.

- APLICACIÓN DE UN MODELO PRIMARIO QUASI-CHEMICAL EN EL ESTUDIO DE FERMENTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA.** (PAG 245)  
J. BAUTISTA-GALLEGO; F.N. ARROYO-LÓPEZ; R. ECHEVARRÍA. A. GARRIDO-FERNÁNDEZ.
- ESTUDIO DE CEPAS DE MICROCOCCACEAE Y STAPHYLOCOCCACEAE, AISLADAS DE EMBUTIDOS TRADICIONALES, COMO PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS.** (PAG 247)  
A. CACHALDORA; S. FONSECA; J.M. LORENZO; I. FRANCO; J. CARBALLO.
- INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR AUTÓCTONO SOBRE LA HIDROLISIS DE LAS PROTEÍNAS CÁRNICAS DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DE SALCHICHONES.** (PAG 249)  
R. CAQUETE PALENCIA; M.J. BENITO BERNÁLDEZ; A. MARTÍN GONZÁLEZ; F. PÉREZ NEVADO; S. RUIZ-MOYANO SECO DE HERRERA; M. FERNÁNDEZ GARCÍA; M.G. CÓRDOBA RAMOS.
- SELECCIÓN DE AISLADOS LIPOLÍTICOS DE LEVADURAS PARA SU POSIBLE EMPLEO COMO CULTIVOS ADJUNTOS EN LA FABRICACIÓN DE QUESOS GALLEGOS ARZÚA-ULLOA Y TETILLA.** (PAG 251)  
J.A. CENTENO; M. ATANASSOVA; C. FERNÁNDEZ-OTERO; P. RODRÍGUEZ-ALONSO; J.I. GARABAL.
- PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS POR PARTE DE CEPAS DE ENTEROBACTERIACEAE AISLADAS DE EMBUTIDOS TRADICIONALES.** (PAG 253)  
S. FONSECA; A. CACHALDORA; J.M. LORENZO; I. FRANCO; J. CARBALLO.
- INFLUENCIA DE LA GRADUACIÓN TOTAL DE UN VINO DE MONTILLA-MORILES SOBRE LA VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE.**  
C. JIMÉNEZ OT; I.M. SANTOS DUEÑAS; J.E. JIMÉNEZ HORNERO; S. BAENA RUANO; M.A. MARTÍN SANTOS; J.L. BONILLA VENCESLADA. (PAG 255)
- EVOLUCIÓN MICROBIANA DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO TRADICIONAL ASTURIANO CASÍN.** (PAG 257)  
B. MAYO; P. ÁLVAREZ-MARTÍN; N. SACRISTÁN; T. KAFILI; R. RODRÍGUEZ.
- PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO FERMENTADO DE SOYA (GLYCINE MAX) TIPO TEMPEH CON RHIZOPUS ORYZAE.** (PAG 259)  
R. MUNGUÍA PÉREZ; A. ESPINOSA TESIS; E. CASTAÑEDA ROLDÁN; M. REYES MATÍAS; F. GONZÁLEZ SALOMÉ; N. MELGOZA PALMA.
- DISEÑO DE UN MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA DIFERENCIACIÓN DE LA CEPA PG222 DE PENICILLIUM CHRYSOGENUM.** (PAG 261)  
F. NÚÑEZ; M.A. ASENSIO; B. SÁNCHEZ; A. RODRÍGUEZ; E. BERMÚDEZ.
- POTENCIAL DE CEPAS DE ENTEROCOCCUS FAECIUM AISLADAS DE LECHE MATERNA COMO CULTIVOS BIOPROTECTORES O ADJUNTOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS.**  
J.M. RODRÍGUEZ; C. REVIRIEGO; R. ARROYO; L. FERNÁNDEZ. (PAG 263)
- CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE LACTOBACILLUS AISLADOS DE QUESOS ARTESANALES D. O. "MANCHEGO" PARA SU USO COMO ADJUNTOS DEL STARTER.** (PAG 265)  
L. CABEZAS REDONDA; P. NIETO ARRIBAS; J.M. POVEDA COLADO; M.I.L. PALOP HERREROS.
- APTITUD TECNOLÓGICA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS DEL QUESO DE TENERIFE PARA SU USO COMO CULTIVO INICIADOR PARA QUESOS.** (PAG 267)  
V. ZÁRATE MACHADO; L. GONZÁLEZ BATANERO.

## MICROORGANISMOS ALTERANTES

- APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA MEJORA DE LA VIDA COMERCIAL DE UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO.** (PAG 269)  
F. PÉREZ RODRÍGUEZ; A. RIVERA ZAMORANO; R.M. GARCÍA-GIMENO; A. VALERO; E. CARRASCO; G. ZURERA.
- EFFECTO DE LA ANAEROBIOSIS SOBRE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE ENDOSPOROS DE BACILLUS SPP. DAÑADOS TÉRMICAMENTE.** (PAG 271)  
V. ANTOLINOS; M. ROS-CHUMILLAS; L. GUEVARA; M. MUÑOZ; P.S. FERNÁNDEZ.
- CHARACTERIZATION OF A BACILLUS SUBTILIS ISOLATE CAUSING DISCOLORATION DEFECTS IN BREADED MEAT.** (PAG 273)  
A. DE BENITO ARMAS; P. SETLOW; S. MARCO AGUILAR; D. TOMÁS FORNÉS.

**DETERIORO DE YOGURES ECOLÓGICOS POR LEVADURAS: ANTIGUOS PROBLEMAS PARA NUEVOS ALIMENTOS. (PAG 275)**

P. WRENT; M.J. VALDERRAMA; J.M. PEINADO; M.L. DE SILÓNIZ.

**RESISTENCIA AL CALOR DE BACILLUS SPOROTHERMODURANS SOMETIDO A TRATAMIENTOS ISOTÉRMICOS Y NO ISOTÉRMICOS EN TAMPÓN Y ALIMENTOS. (PAG 277)**

A. PALOP GÓMEZ; M.D. ESTEBAN MAESTRE.

**EVOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES EN FILETES DE DORADA (SPARUS AURATA), ENVASADOS AL VACÍO, DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN HIELO. (PAG 279)**

M.S.P. SANTAELLA PASCUAL; M.J. PERIAGO CASTÓN; C. MARTÍNEZ GRACIÁ; P. PESO ECHARRI; G. MARTÍN-POZUELO DEL POZO.

**DIAGNÓSTICOS ACEPTABLES PERO EQUIVOCADOS: EL CASO DE PICHIA BURTONII. (PAG 281)**

J. RINCÓN MOYA; M.I. DE SILÓNIZ JIMÉNEZ; J.M. PEINADO; M.J. VALDERRAMA CONDE.

**DESCRIPCIÓN DE LA CINÉTICA DE DETERIORO DE LA ENSALADA MÍNIMAMENTE PROCESADA. (PAG 283)**

R. VIRTO RESANO; K. BUSCA ARENZANA; M. JOVER CORNEJO; C. GONZÁLEZ NAVARRO

**BACTERIOCINAS**

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENTEROCINA AS-48 A PARTIR DE UN SUSTRATO DERIVADO DEL LACTOSUERO. (PAG 285)**

S. ANANOU; A. MUÑOZ; M. MARTÍNEZ-BUENO; M. MAQUEDA. E. VALDIVIA.

**EECTO ANTIBACTERIANO DE LA ENTEROCINA AS-48 EN PRODUCTOS DE PASTELERÍA.**

P. MARTÍNEZ VIEDMA; H. ABRIOUEL; N. BENOMAR; E. VALDIVIA; R. LUCAS LÓPEZ; M.

MARTÍNEZ CAÑAMERO. (PAG 287)

**EFICACIA DE LA ENTEROCINA AS-48 SOLA Y EN TRATAMIENTOS COMBINADOS FRENTE A LISTERIA MONOCYTOGENES EN ENSALADILLAS. (PAG 289)**

A. COBO MOLINOS; H. ABRIOUEL; R. LUCAS LÓPEZ; E. VALDIVIA; N. BEN OMAR; A. GÁLVEZ.

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS RESPONSABLES DE FALLOS TECNOLÓGICOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA. (PAG 291)**

M. FERNÁNDEZ; B. MARTÍNEZ; M.A. ÁLVAREZ.

**EFFECT OF A BACTERIOCIN PRODUCED BY PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI IN SPANISH DRY FER-MENTED SAUSAGES AND FRANKFURTERS. (PAG 293)**

J.I. REGUERA-USEROS; J.C. NIETO-LOZANO; G. SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO; M.C. PELÁEZ-MARTÍNEZ

**PROBIÓTICOS**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE BIFIDOBACTERIAS AISLADAS DE HECES DE LACTANTES.**

M. MEDINA; D. BRAVO; A. PEIROTÉN; R. RODRÍGUEZ; E. RODRÍGUEZ. (PAG 295)

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS. (PAG 297)**

M. NÁCHER-VÁZQUEZ; P. ELIZAKUÍVEL BÁRCENAS; R. AZNAR NOVELLA.

**PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE BIFIDOBACTERIAS AISLADAS DE HECES DE LACTANTES. (PAG 299)**

E. RODRÍGUEZ; R. RODRÍGUEZ; P. GAYA; M. MEDINA

**GENÓMICA DE MICOORGANISMOS**

**CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO PRS5 DE PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS Y UTILIZACIÓN COMO VECTOR DE CLONACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE USO ALIMENTARIO.**

M.T. ALEGRE ARRIBAS; M.C. RODRÍGUEZ PÉREZ; J.M. MESAS MESAS. (PAG 301)

**ENOLOGÍA**

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PH Y CONCENTRACION INICIAL DE AZÚCARES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS VÍNICAS CON INTERÉS PARA EL SECTOR INDUSTRIAL.**

F.N. ARROYO LÓPEZ; S. ORLIC; C. BELLOCH; E. BARRIO; A. QUEROL. (PAG 303)

**APLICACIÓN DE SISTEMAS MINIATURIZADOS PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS (PAG 305) BACTERIANAS EN ENOLOGÍA.**

C. BERBEGAL; I. PARDO; S. FERRER.

- CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIFENOLES DE LA MALVASÍA DE SITGES Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE.** (PAG 307)  
R. CARBÓ; F. LÓPEZ; N. ANDREO; M.P. ALMAJANO.
- PRESENCIA DE LEVADURAS COMERCIALES EN FERMENTACIONES VÍNICAS ESPONTÁNEAS.** (PAG 309)  
M. CHACÓN; M.J. ORTIZ; N. BARRAJÓN; A. BRIONES.
- REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS BIOINMOVILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS DULCES.** (PAG 311)  
T. GARCÍA-MARTÍNEZ; R.A. PEINADO; J. MORENO; J.C. MAURICIO.
- MICROORGANISMOS ENOLÓGICOS PRESENTES EN EL AIRE DE DISTINTAS ZONAS DE UNA BODEGA COMERCIAL EN ÉPOCA DE INACTIVIDAD.** (PAG 313)  
E. OCÓN SÁENZ; E. LÓPEZ OCÓN; S. SANZ CERVERA; C. OLARTE MARTÍNEZ; A.R. GUTIÉRREZ VIGUERA; R. LÓPEZ MARTÍN; P. SANTAMARÍA AQUILUÉ.
- EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN AUTÓCTONA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN UNA BODEGA DE LA D.O.CA. RIOJA EN SUS 10 PRIMEROS AÑOS DE FUNCIONAMIENTO.** (PAG 315)  
P. SANTAMARÍA; R. LÓPEZ; P. GARIJO; A.R. GUTIÉRREZ.
- MÉTODO RÁPIDO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS VÍNICAS CON DISTINTAS TÉCNICAS MOLECULARES.** (PAG 317)  
M. MAQUEDA GIL; E. ZAMORA DE ALBA; M.L. ÁLVAREZ FRANCO; M. RAMÍREZ FERNÁNDEZ.
- EFICACIA DE LA MICROFILTRACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE VINOS EMBOTELLADOS: IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICROBIANAS MÁS FRECUENTES.** (PAG 319)  
I. POLO; S. FERRER; I. PARDO.
- OFF-ODOR DEVELOPMENT IN NON-AMENDED CORK MATRICES BY ISOLATED BACTERIA AND FUNGI.** (PAG 321)  
C. PRAT; R. TRIAS; E. ANTICÓ; I. BAÑERAS.
- INFLUENCIA DEL MANEJO DEL SUELO SOBRE LA PRESENCIA DE LEVADURAS FERMENTATIVAS EN EL VIÑEDO.** (PAG 323)  
M. RAMÍREZ FERNÁNDEZ; A. MUÑOZ GONZÁLEZ; A. LÓPEZ PIÑEIRO.
- POLIMORFISMO CROMOSÓMICO DE LAS LEVADURAS DE FLOR DE UN VINO FINO ECOLÓGICO.** (PAG 325)  
M. SANCHO PRIETO; E.D. SANCHO PUEBLA.
- EVOLUCION DE LAS LEVADURAS COMERCIALES EN EL AMBIENTE. PRIMER AÑO DE ESTUDIO.** (PAG 327)  
A. SERRANO; T. ARROYO; G. CORDERO; E. VALERO
- OTRA**
- VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE RECUENTO DE E.COLI b-GLUCURONIDASA POSITIVO Y COLIFORMES EN ALIMENTOS.** (PAG 329)  
A. ARRANZ; S. ORTOLÁ; C.L. GÓMEZ.
- LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL CLUSTER DE PRODUCCIÓN DE UN EXOPOLISACÁRIDO (EPS) EN LACTOBACILLUS PENTOSUS LPS26.** (PAG 331)  
A.B.CAMPELO; B. MARTÍNEZ; A. RODRÍGUEZ.
- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DE USO EN INDUSTRIA PANADERA.** (PAG 333)  
R. DUEÑAS SÁNCHEZ; A.C. CODÓN; A.M. RINCÓN; T. BENÍTEZ.
- LA CECT, CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS MICROBIANOS AL SERVICIO DE LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.** (PAG 335)  
R.M. GIMÉNEZ; B. PINTO; E. GARAY.
- ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS CLUSTERS DE PRODUCCIÓN DE TIRAMINA Y PUTRESCINA EN EL GÉNERO ENTEROCOCCUS.** (PAG 337)  
V. LADERO; E. SÁNCHEZ; M.M. CALLES; M. FERNÁNDEZ; M.A. ÁLVAREZ.
- CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EXISTENTES EN LA CECT.** (PAG 339)  
M.C. MACIÁN; T. LUCENA; B. PINTO; E. GARAY.
- UTILIZACIÓN SE SUBSTRATOS POSTCULTIVO DE HONGOS (SPCH) COMO TIERRA DE COBERTURA EN CULTIVO DE CHAMPIÑÓN. EFECTOS SOBRE LA MICROBIOLOGÍA.** (PAG341)  
F. SAN JOSÉ BARRERO; M. PÉREZ CLAVIJO; C. URBINA SÁENZ; R. LÓPEZ VÁZQUEZ

## APLICACIÓN DE UN MODELO PRIMARIO QUASI-CHEMICAL EN EL ESTUDIO DE FERMENTACIONES DE ACEITUNAS DE MESA

***Bautista-Gallego J.<sup>1</sup>, Arroyo-López F.N.<sup>1</sup>, Echevarria, R.<sup>2</sup>, Garrido-Fernández A.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa, CSIC. Avda. Padre García Tejero, nº 4, 41012, Sevilla, [joaquinbg@ig.csic.es](mailto:joaquinbg@ig.csic.es).

<sup>2</sup>Departamento de Ecuaciones Diferenciales y Análisis Numérico. Facultad de Matemática. Universidad de Sevilla. c/ Tarfia, s/n, 41012, Sevilla.

### Introducción y Objetivos

El mercado de la aceituna de mesa tiene una gran importancia en los países mediterráneos y especialmente en España, donde su producción y venta genera unos importantes ingresos económicos (Garrido-Fernández et al., 1997). Durante la elaboración de este producto tiene lugar una fermentación llevada a cabo fundamentalmente por levaduras y bacterias lácticas, aunque otros grupos de microorganismos como las enterobacterias también pueden estar presentes.

Gran parte de los trabajos desarrollados en microbiología predictiva se centran exclusivamente en la fase de crecimiento de los microorganismos, pero recientemente nuevos modelos se han empezado a considerar para contemplar también la fase de muerte. Durante el transcurso de una fermentación ocurre el crecimiento y posterior muerte de los microorganismos (debido a la aparición de sustancias inhibitoras o al consumo de los nutrientes), por lo que la utilización de modelos matemáticos que contemplen todas las etapas (latencia, crecimiento, estacionaria y muerte) puede resultar de gran utilidad.

El objetivo del presente trabajo es valorar la utilización de un modelo primario de tipo quasi-chemical para estudiar la respuesta de las poblaciones de microorganismos durante el proceso de fermentación de aceitunas de mesa.

### Material y Métodos

Un diseño de mezclas generado con el programa informático Design Expert v 6.0 fue utilizado para estudiar el efecto de diferentes combinaciones de metabisulfito sódico (MS) (0 – 1,5 g/l), ácido ascórbico (AA) (0 – 15 g/l) y cloruro sódico (NaCl) (60 – 150 g/l) sobre el crecimiento y muerte de las poblaciones de levaduras y bacterias lácticas presentes en fermentaciones de aceitunas de la variedad Manzanilla-Aloreña.

Utilizamos un modelo primario de tipo quasi-chemical (revisado por Ross et al., 2005) para deducir los parámetros cinéticos de crecimiento/muerte de los microorganismos en cada una de las experiencias contempladas en el diseño experimental. Este modelo divide el ciclo de vida de los microorganismos en cuatro etapas (fase de latencia, exponencial, estacionaria y muerte), cada una de ellas con sus correspondientes ecuaciones diferenciales y constantes cinéticas. Se utilizó el programa informático MATLAB para programar el modelo y obtener los siguientes parámetros biológicos: tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ), fase de latencia ( $\lambda$ ), máximo crecimiento de la población alcanzado ( $R_g$ ) y tasa de muerte específica máxima ( $\gamma_{max}$ ).

Posteriormente se aplicó un modelo secundario de superficie de respuesta para evaluar los efectos del MS, AA y NaCl sobre los parámetros biológicos deducidos con el modelo quasi-chemical. Para tal fin se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_1 MS + \beta_2 AA + \beta_3 NaCl + \beta_{12} MS*AA + \beta_{13} MS*NaCl + \beta_{23} AA*NaCl + \beta_{123} MS*AA*NaCl + \epsilon$$

### Resultados y Discusión

Durante el tiempo que duraron las fermentaciones ( $\approx 2$  meses) ocurrió un crecimiento y muerte de las poblaciones de levaduras y bacterias lácticas, demostrándose la utilidad de utilizar un modelo de este tipo para combinar ambos procesos.

El crecimiento de la población de levaduras comenzó muy rápidamente (corta fase de latencia) y resultó ser muy elevado, encontrándose los mayores  $\mu_{\max}$  en ausencia de metabisulfito sódico. Sin embargo el crecimiento de la población de bacterias lácticas tuvo lugar después del de las levaduras (mayor fase de latencia) y resultó ser además más lento, estando afectado negativamente por las altas concentraciones de NaCl.

No todos los parámetros pudieron ser modelados correctamente. Solo las superficies de respuesta para  $\mu_{\max}$  (en el caso de levaduras y bacterias lácticas) y  $\gamma_{\max}$  (bacterias lácticas) pudieron ser ajustadas. Los coeficientes significativos de dicho análisis se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Coeficientes significativos de las superficies de respuestas obtenidas para  $\mu_{\max}$  (levaduras y bacterias lácticas) y  $\gamma_{\max}$  (bacterias lácticas, LAB).

Parámetro	Metabisulfito sódico (MS)	Ácido ascórbico (AA)	Cloruro sódico (NaCl)	AA*NaCl	Prob>F
$\mu_{\max}$ levaduras	1.29±0.16	2.08±0.16	1.55±0.16	-	0.027
$\mu_{\max}$ LAB	0.36±0.15	1.06±0.15	0.41±0.15	-	0.021
$\gamma_{\max}$ LAB	-0.280±0.026	-0.660±0.028	-0.200±0.028	0.340±0.140	0.007

Como se puede deducir de la Tabla 1, el ácido ascórbico fue la variable con una mayor importancia sobre la máxima velocidad de crecimiento tanto para las levaduras como para bacterias lácticas.

### Conclusiones

El modelo quasi-chemical ha demostrado ser de utilidad a la hora de obtener los parámetros biológicos de crecimiento/muerte de los microorganismos presentes en las fermentaciones de aceitunas de mesa, mostrando unos resultados comparables (solo en la fase de crecimiento) a los obtenidos con otros modelos primarios como Gompertz o Baranyi (Arroyo López et al., 2005). Por lo tanto este modelo puede ser considerado como otra alternativa en modelización primaria, con la ventaja de poder integrar en el mismo modelo crecimiento y muerte, como es habitual encontrar en la mayoría de fermentaciones o envasados de alimentos.

### Referencias Bibliográficas

Arroyo, F.N., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A. 2005. Evaluation of primary models to describe the growth of *Pichia anomala* and study of temperature, NaCl and pH effects on its biological parameters by response surface methodology. J. Food Protection 68, 562-570.

Garrido Fernández, A., Fernández Díaz, M.J., Adams, R.M. 1997. Table Olives. Production and Processing. Chapman & Hall, London, UK.

Ross, E.W., Taub, I.A., Doona, C.J., Feeherry, F.E., Kustin, K. 2005. The mathematical properties of the quasi-chemical model for microorganism growth-death kinetics in foods. Int. J. Food Microbiol. 99, 157-171.

ESTUDIO DE CEPAS DE *MICROCOCCACEAE* Y *STAPHYLOCOCCACEAE*, AISLADAS DE EMBUTIDOS TRADICIONALES, COMO PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS

Cachaldora A., Fonseca S., Lorenzo J.M., Franco I. y Carballo J.

Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus Universitario, s/n., 32004 Ourense, aicachaldora@alumnos.uvigo.es

## Introducción y Objetivos

En la elaboración de los embutidos crudo-curados la producción de aminas biógenas es importante debido a las condiciones favorables para este proceso: la materia prima (magro) es un producto fundamentalmente proteico y la degradación proteica conduce a la formación de aminoácidos libres; los embutidos son sometidos, además, a procesos de fermentación y maduración durante los cuales se desarrollan una gran variedad de microorganismos, tienen lugar procesos proteolíticos y se produce una ligera acidificación que favorece la formación de aminas biógenas. La formación de aminas biógenas en productos cárnicos madurados es un proceso complejo en el que influyen variables tales como la cinética de crecimiento de los microorganismos, los procesos proteolíticos que tienen lugar en el transcurso de la maduración y la actividad decarboxilasa de la microbiota presente en el alimento.

La importancia de las *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* en los procesos bioquímicos que tienen lugar en la maduración de los productos cárnicos, y en el desarrollo del color y aroma de estos productos, es bien conocida. Sin embargo, la producción de aminas biógenas por parte de estos microorganismos es un fenómeno a considerar y controlar.

El presente estudio tiene como finalidad evaluar la capacidad para producir aminas biógenas "in vitro" por parte de cepas de *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* aisladas de embutidos tradicionales. Esta investigación tiene con fin último articular medidas eficaces de inhibición de la producción de estas sustancias en embutidos tradicionales elaborados a escala semiindustrial y contribuir a una correcta selección de las cepas potencialmente utilizables como cultivos iniciadores.

## Material y Métodos

En el presente estudio se partió de 34 cepas aisladas de Botillo (13 de *Staphylococcus saprophyticus*, 7 de *Micrococcus* spp., 6 de *Staph. xylosus*, 3 de *Staph. lentus*, 2 de *Staph. capitis*, 1 de *Staph. epidermidis*, 1 de *Staph. cohnii cohnii* y 1 de *Staph. sciuri*) y 54 cepas aisladas de Androlla (25 de *Staphylococcus xylosus*, 19 de *Micrococcus luteus*, 3 de *Staph. epidermidis*, 2 de *M. lylae*, 2 de *Staph. equorum*, 1 de *Staph. saprophyticus*, 1 de *Staph. capitis* y 1 de *Kocuria varians*). Las cepas se identificaron por métodos clásicos (García Fontán y cols., 2007a y b), confirmando con posterioridad su identidad con ayuda de las Galerías API 32 STAPH.

En cada cepa se ensayó inicialmente la capacidad de producir "in vitro" histamina (actividad histidina decarboxilasa), tiramina (tisorina decarboxilasa), cadaverina (lisina decarboxilasa) y putrescina (ornitina decarboxilasa) utilizando el método descrito por Joosten y Northolt (1987).

Para ensayar la producción de putrescina y cadaverina a lo largo del crecimiento de las cepas y determinar los puntos de producción máxima, de entre las cepas que resultaron positivas al análisis cualitativo se tomaron 2 cepas de *Staphylococcus saprophyticus*, 2 de *Micrococcus* spp., 2 de *Staph. xylosus*, 2 de *Staph. lentus*, 2 de *Staph. capitis*, 1 de *Staph. epidermidis*, 1 de *Staph. cohnii cohnii* y 1 de *Staph. sciuri*, de entre las aisladas de Botillo, y 2 de *Staphylococcus xylosus*, 2 de *Micrococcus luteus*, 2 de *Staph. epidermidis*, 2 de *M. lylae*, 2 de *Staph. equorum*, 1 de *Staph. saprophyticus*, 1 de *Staph. capitis* y 1 de *Kocuria varians*, de entre las aisladas de Androlla. En cada una de estas cepas se construyó la correspondiente curva de crecimiento sembrando en caldo (medio descrito por Joosten y Northolt, 1987, sin adición de agar ni de púrpura de bromocresol) y leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm cada tres horas durante 96 horas. Seguidamente, cada una de estas cepas se sembró en el mismo medio conteniendo cada uno de los dos aminoácidos precursores (ornitina y lisina) por separado. En cada cepa, y para cada uno de los aminoácidos precursores, tras la inoculación del medio de cultivo se realizaron lecturas de absorbancia a 650 nm, y se cuantificaron las aminas biógenas correspondientes (putrescina o cadaverina), a las 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas de incubación. La cuantificación de las aminas se llevó a cabo por técnicas de HPLC siguiendo el procedimiento descrito por Eerola y cols. (1993).

Finalmente al tiempo de incubación en el que se habían fijado los máximos de producción de putrescina y cadaverina en cada especie, se determinaron las cantidades de estas aminas biógenas producidas en el resto de las cepas que no habían sido utilizadas en la prueba de producción a lo largo del crecimiento.

## **Resultados**

Todas las cepas aisladas de Botillo presentaron actividad histidina decarboxilasa, salvo las dos de *Staph. capitis*. A su vez, todas presentaron actividad lisina decarboxilasa, salvo una cepa de *Staph. capitis* y la cepa de *Staph. sciuri*. Todas presentaron actividad ornitina decarboxilasa. La actividad tirosina decarboxilasa fue más variable, resultando positivas todas las cepas de *Staphylococcus saprophyticus* y de *Staph. xylosum*, las cepas de *Staph. epidermidis* y de *Staph. cohnii cohnii*, 6 de las 7 cepas de *Micrococcus* spp., 2 de las 3 cepas de *Staph. lentus* y 1 de las 2 cepas de *Staph. capitis*.

De las cepas aisladas de Androlla, presentaron actividad histidina decarboxilasa todas las cepas ensayadas, con excepción de 6 de las 25 de *Staph. xylosum*, 4 de las 19 de *Micrococcus luteus*, 1 de las 2 de *Staph. equorum*, y la cepa de *Staph. saprophyticus*. Todas las cepas presentaron actividad lisina decarboxilasa y ornitina decarboxilasa salvo 2 cepas de *Micrococcus luteus*. Estas dos cepas fueron las únicas que no presentaron actividad tirosina decarboxilasa, conjuntamente con una cepa de *Staph. equorum*.

En el estudio de evolución de la producción de putrescina y cadaverina a lo largo del crecimiento de las cepas pudo observarse que la máxima acumulación de ambas aminas se produjo al inicio de la fase estacionaria, en torno a las 16 horas de cultivo en las cepas de *Micrococcus luteus* y alrededor de las 72 horas en las cepas del resto de las especies.

La producción máxima de putrescina resultó ser muy baja (< 2,5 ppm) en todas las cepas ensayadas, salvo en las de *Staph. lentus* (1030-1050 ppm) y en las de *Staph. xylosum* aisladas de Androlla (8-22 ppm). La producción máxima de cadaverina también resultó muy baja (< de 5 ppm) en todas las cepas ensayadas, salvo en las de *Staph. lentus* (35-38 ppm).

## **Conclusiones**

Si bien la casi totalidad de las cepas de *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* aisladas de embutidos tradicionales presentaron capacidad de producir histamina, tiramina, putrescina y cadaverina, las cantidades máximas producidas de putrescina y cadaverina resultaron muy bajas. Únicamente *Staph. lentus* fue capaz de producir cantidades elevadas de putrescina.

## **Agradecimientos**

Trabajo financiado por la Xunta de Galicia, proyectos PGIDIT05PXIB38303PR y 07TAL021383PR.

## **Referencias Bibliográficas**

- Eerola, S., Hinnkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T.K. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*, 76: 575-577.
- García Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2007a). Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT*, 40: 1610-1622.
- García Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I., Carballo, J. (2007b). Microbiological characteristics of Androlla, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*, 24: 52-58.
- Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41: 259-280.

**INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR AUTÓCTONO SOBRE LA HIDRÓLISIS DE LAS PROTEÍNAS CÁRNICAS DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DE SACHICHONES**

**Casquete, R., Benito M.J., Martín, A., Pérez Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., Fernández, M., Córdoba, M.G**

*Nutrición y Bromatología. Universidad de Extremadura. Badajoz.*

**Introducción y Objetivos**

Durante el proceso de maduración de los productos cárnicos curados tiene lugar una hidrólisis de las proteínas cárnicas que repercute en la formación de pépticos y aminoácidos libres influyendo en el sabor y aroma del producto acabado. La escasa actividad proteolítica que tiene lugar en los productos crudos curados se debe fundamentalmente a la acción de enzimas tisulares que pierden actividad durante el procesado. La utilización de un cultivo iniciador con alta actividad proteolítica (Martín y col. 2007; Benito y col. 2007), podría contribuir a la proteólisis y, por otro lado, podría incrementarla antes de que ocurra la desnaturalización proteica observada en este tipo de productos durante la maduración lo que aceleraría e incrementaría la formación de los compuestos responsables del aroma. Además el incremento de la proteólisis ayudaría a la generación de compuestos bioactivos en forma de pequeños péptidos de gran importancia para la salud. Por otro lado, algunos microorganismos también podrían generar metabolitos indeseables derivados de la hidrólisis protéica, como son las aminas biógenas.

Con el presente trabajo se pretende estudiar la evolución de la hidrólisis de las proteínas cárnicas en salchichones de cerdo ibérico inoculados con cepas de bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus* previamente seleccionadas de productos cárnicos de elaboración tradicional en varias industrias extremeñas (Martín y col. 2007; Benito y col. 2007, 2008a, 2008b).

**Material y Métodos**

Para la realización del presente trabajo, se elaboraron cuatro lotes de salchichones. Tres lotes se inocularon con un cultivo iniciador formado por una cepa de *Staphylococcus vitulus* y una diferente para cada lote de *Pediococcus acidilactici* (184, 198 y 200). El cuarto fue el lote control. Se embutieron en tripa natural y se maduraron durante 90 días. Para los análisis las muestras fueron tomadas por triplicado a los 0, 1, 3, 27, 62, y 90 días de maduración. Se determinó proteínas totales por el método de Bradford (1976) y se analizaron por el método SDS-PAGE, nitrógeno no protéico (NNP), nitrógeno aminoacídico (NA), aminoácidos libres analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la producción de aminas biógenas, su análisis se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

**Resultados y Discusión**

La concentración de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares disminuyeron ( $P < 0,05$ ) a lo largo de la maduración en todos los lotes. Se observó una mayor proteólisis en los salchichones tratados con cepas frente a los del lote control siendo esta diferencia significativa en las primeras tomas de muestra de los días 1 al 27 (figura 1). En cuanto a la concentración de NNP, se observaron diferencias significativas desde los primeros días de procesado, mostrándose valores mayores en los salchichones madurados con los cultivos frente al control (figura 2). La evolución del NA fue paralela, mostrando un aumento claro a partir de los 27 días de maduración para después disminuir al final del procesado.

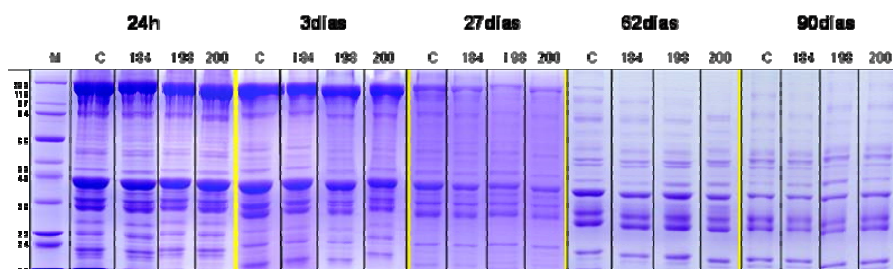


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilaamida al 12% de las proteínas miofibrilares de los salchichones control (C) y tratados con las diferentes cepas (184,198,200) a los diferentes días de maduración

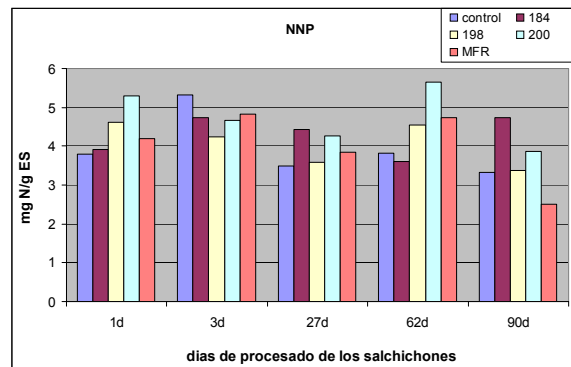


Figura 2. Contenido en NNP de los salchichones inoculados con los diferentes cultivos iniciadores frente al control a diferentes tiempos de maduración

Los aminoácidos libres también aumentaron paralelamente al aumento del NA y de forma significativamente diferente entre los controles y las muestras inoculadas. Los aminoácidos que alcanzaron mayores concentraciones en las muestras inoculadas con los cultivos fueron alanina, tirosina y lisina entre otros. Además ninguna de las cepas inoculadas produjo aminas biógenas derivadas de los aminoácidos formados.

### Conclusiones

Los lotes adicionados con cultivo iniciador mostraron mayor grado de proteólisis con valores significativamente inferiores de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas y mayores de las diferentes fracciones nitrogenadas, siendo el lote inoculado con la cepa 200 el que mostró una mayor proteólisis. Ninguna de las cepas inoculadas mostró formación de aminas. Así pues es este lote el que presentó mayor incremento de los compuestos responsables del aroma y sabor en los productos cárnicos curados.

### Referencias Bibliográficas

- Benito MJ, Martín A, Aranda E, Pérez-Nevado F, Ruiz-Moyano S, Córdoba MG. (2007). Characterization and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iberian Dry-Fermented Salchichón and Chorizo Sausages. *M: Food Microbiology and Safety*.
- Martín A, Colín B, Aranda E, Benito MJ, Córdoba MG. (2007). Characterization of *Micrococaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science*, 75, 696-708.
- Benito MJ, Serradilla MJ, Ruiz-Moyano S, Martín A, Pérez-Nevado F, Córdoba MG. (2008a). Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, DOI: 10.1016/meatsci.2008.03.002.
- Benito MJ, Serradilla MJ, Martín A, Aranda E, Hernández A, Córdoba MG. (2008b). Differentiation of Staphylococci from Iberian dry fermented sausages by protein fingerprinting. *Food Microbiology*, DOI: 10.1016/j.fm.2008.03.007.

## SELECCIÓN DE AISLADOS LIPOLÍTICOS DE LEVADURAS PARA SU POSIBLE EMPLEO COMO CULTIVOS ADJUNTOS EN LA FABRICACIÓN DE QUESOS GALLEGOS ARZÚA-ULLOA Y TETILLA

**Centeno J. A.<sup>1</sup>, Atanassova M.<sup>2</sup>, Fernández-Otero C.<sup>2</sup>, Rodríguez-Alonso P.<sup>2</sup> y Garabal J. I.<sup>\*2</sup>**

<sup>1</sup>Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. Campus de Ourense, 32004, Ourense

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia, Apdo. 10, 15080 A Coruña, jose.ignacio.garabal.sanchez@xunta.es

### Introducción y Objetivos

Los quesos gallegos tradicionales de buena calidad sensorial elaborados con leche cruda presentan unas características de "flavor" (aroma y sabor) marcadamente diferentes de aquellas observadas en las actuales producciones industriales (Centeno y col., 2008). Para las variedades Arzúa-Ulloa y Tetilla se ha observado una mayor diversidad y abundancia de compuestos volátiles en los quesos de leche cruda, confirmándose la importancia de los procesos lipolíticos y de los aromas derivados de los mismos (ácidos grasos, ésteres, metilcetonas) en este grupo de quesos (Rodríguez-Alonso y col., 2008a). La formación de estos compuestos de aroma ha de relacionarse, además de con la posible acción de la lipoproteína lipasa de la leche, con las actividades metabólicas de la microbiota autóctona o nativa presente en estos productos. Dentro de esta microbiota, las levaduras se encuentran presentes en niveles del orden de 6-8 log ufc/g en la superficie de los quesos, habiéndose descrito en el análisis sensorial de estos productos matices de aroma presumiblemente atribuibles a las actividades lipolíticas de estos microorganismos (Centeno y col., 2008).

El objetivo del presente estudio es la selección de un grupo de aislados de levaduras obtenidas de quesos Arzúa-Ulloa y Tetilla de leche cruda que presenten actividades lipolíticas de interés para la constitución del aroma característico de estas variedades tradicionales, y que en un futuro pudieran ser empleados como cultivos adjuntos en su fabricación.

### Material y Métodos

#### *Origen, aislamiento y conservación de los aislados*

Se partió de un total de 97 aislados de levaduras obtenidos de 20 quesos Arzúa-Ulloa y Tetilla de leche cruda (15 días – 2 meses de maduración) procedentes de diferentes explotaciones y seleccionados de acuerdo con su calidad sensorial, evaluada por un grupo de cinco conocedores de estos productos tradicionales. Los aislamientos se llevaron a cabo en los agares Rosa de Bengala (Pronadisa, Madrid), Patata Glucosa (PDA) (Pronadisa) y Glucosado de Sabouraud (Pronadisa). Se seleccionaron al azar entre tres y seis colonias de las placas correspondientes a las mayores diluciones que originaron crecimiento. Las colonias se purificaron mediante subcultivo, conservándose los aislados viables en un medio a base de leche desnatada y glicerol (30%).

#### *Selección inicial de los aislados (crecimiento y aromas producidos en leche pasteurizada)*

La selección inicial de los aislados se realizó de acuerdo con los aromas y modificaciones producidos en leche entera (100 mL; 3,8% grasa) pasteurizada (100±1°C, 15 min) inoculada al 1% con cultivos de 48 h en leche desnatada. Los aromas se percibieron mediante olfacción a las 24 y 48 h de incubación a 30±1°C, siendo evaluados por un panel de siete jueces de acuerdo con la metodología descrita en un estudio previo (Rodríguez-Alonso y col., 2008b). La prueba se realizó por duplicado, seleccionándose únicamente aquellos cultivos que originaron matices de lipólisis (rancio, queso de oveja curado, butírico, picante, ensilado) característicos de los quesos de leche cruda, combinados o no con otras notas lácteas, fermentativas o de proteólisis no desagradables. Se descartaron aquellos cultivos que produjeron gas en la leche después de la incubación.

#### *Caracterización de actividades lipolíticas y producción de compuestos volátiles en leche*

La actividad lipolítica exocelular de los cultivos seleccionados se evaluó en Agar Tributirina (1%) (Durlu-Ozkaya y col, 2001) y en Agar Tween 80 (1%) (Slifin, 2000), durante diferentes períodos de incubación comprendidos entre 48 h y 10 días a temperaturas de 30±1 °C y 10±1 °C. Para el análisis de los compuestos volátiles producidos en leche se empleó leche entera (12 mL) pasteurizada

(100±1 °C; 15 min), que se inoculó al 1% (v/v) con un cultivo en leche desnatada de 72 h, incubándose a 30±1 °C durante 24 h y 7 días (dos tubos por cada aislado). A continuación se mezclaron 10 g del cultivo en leche y 50 µL de una solución de borneol 0,013M (Panreac, Barcelona), que se usó como estándar interno, en un tubo adaptable al equipamiento instrumental. Las muestras se analizaron empleando un aparato de espacio de cabeza dinámico (Purga y Trampa) conectado a un Cromatógrafo de Gases – Espectrómetro de Masas. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: temperatura inicial, 35 °C durante 7 min; 6 °C/min hasta 180 °C; 10 °C/min hasta 225 °C; y mantenimiento durante 2 min (tiempo total de análisis: 36 min). La prueba se realizó por duplicado.

#### Identificación de los aislados seleccionados

La identificación de los aislados seleccionados se llevó a cabo mediante PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 del gen rRNA (cebadores ITS1 y ITS4) (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Los fragmentos de PCR se digirieron con 1 Unidad de las endonucleasas *Hae* III, *Hinf* I y *Cfo* I (Takara Shuzo Co., Otsu, Shiga, Japón) durante 2 h a 37±1 °C. Los productos de restricción se separaron en un gel de agarosa 3%, y la clasificación de las levaduras se realizó mediante comparación de los fragmentos obtenidos con los publicados en bases de datos y con los correspondientes a cepas control.

### Resultados y Discusión

#### Selección inicial de los aislados

Del total de 97 aislados de levaduras, 33 originaron notas aromáticas de lipólisis en los cultivos en leche entera pasteurizada, de los cuales 11 produjeron gas en cantidades apreciables y fueron por tanto descartados para su estudio posterior.

#### Actividades lipolíticas exocelulares y producción de compuestos volátiles en leche entera

Catorce de los 22 aislados seleccionados mostraron actividad lipolítica exocelular sobre el Tween 80 (éster del ácido oleico) a 30 °C, originando halos con espesores comprendidos entre 1,5 y 8 mm al final del período de incubación. De este total, 11 exhibieron actividad a 10 °C, llegando a formar halos de 7 mm. Todos los aislados mostraron actividad lipolítica sobre la tributirina a 30 °C, y 20 del total de 22 lo hicieron igualmente a 10 °C, originando halos de hasta 7 mm de espesor.

Once de los 22 aislados seleccionados (incluyendo 4 cepas identificadas como *Yarrowia lipolytica* y 2 identificadas como *Pichia guilliermondii*) han sido objeto de análisis de los volátiles producidos en leche entera. Este grupo de aislados originó en la leche, después de 24 h de incubación a 30 °C, un 84% de alcoholes, un 8% de cetonas y un 4% de aldehídos, en tanto que a los 7 días produjo un 80% de alcoholes, un 17% de ésteres y un 2% de aldehídos. En los cultivos de 24 h el alcohol mayoritario fue el etanol (abundancia relativa media de 1462,4 unidades arbitrarias, UA), destacando en menor medida el propanol (18,8 UA), el butanol (56,3 UA) y los alcoholes ramificados 2 metilpropanol (12,3 UA) y 3 metilbutanol (26,4 UA). Dentro del grupo de las cetonas, la más abundante después de 24 h fue la acetona (103,8 UA), seguida de la 2-heptanona (20,2 UA), la 2-pentanona (11,0 UA), y la 2-nonanona (7,6 UA). Por último, después de 7 días de incubación el grupo de ésteres estuvo representado mayoritariamente por el acetato de etilo (3188,3 UA) y por el butanoato de etilo (1273,6 UA), encontrándose en menores proporciones los acetatos de propilo (47,9 UA) y 3-metilbutilo (32,1 UA), el octanoato de etilo (22,4 UA), y el hexanoato de etilo (16,7 UA).

### Conclusiones

Los resultados preliminares del presente estudio sugieren la importancia de las levaduras en la formación de aromas de lipólisis típicos de los quesos Arzúa-Ulloa y Tetilla de leche cruda. En función de los datos obtenidos hasta el momento actual, nos parecen de especial interés dos aislados (LEV49 y LEV53) de *Yarrowia lipolytica* y otros dos (LEV118 y LEV128) aún no asignados a un taxón particular, que esperamos ensayar próximamente en elaboraciones experimentales.

### Referencias Bibliográficas

Centeno y col. (2008). Industrias Lácteas Españolas. En prensa; Durlu-Ozkaya y col. (2001). *J Appl Microbiol* 91, 861-870; Esteve-Zarzoso y col. (1999). *Int J Syst Bacteriol* 49, 329-337; Rodríguez-Alonso y col. (2008a). *LWT – Food Sci Technol*. Pendiente de aceptación; Rodríguez-Alonso y col. (2008b). *Ital J Food Sci*. En prensa; Slifin (2000). *J Clin Microbiol* 38, 4626-4628.

**Agradecimientos:** Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (proyecto RTA 2005-00222) y por la Xunta de Galicia (proyecto PGIDIT06PXIC503085PN). P. Rodríguez-Alonso y M. Atanassova agradecen la recepción de becas del INIA y de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) durante la realización del presente trabajo.

**PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS POR PARTE DE CEPAS DE *ENTEROBACTERIACEAE* AISLADAS DE EMBUTIDOS TRADICIONALES**

**Fonseca S., Cachaldora A., Lorenzo J.M., Franco I. y Carballo J.**

Área de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. Campus Universitario, s/n., 32004 Ourense, [sofonseca@alumnos.uvigo.es](mailto:sofonseca@alumnos.uvigo.es)

### **Introducción y Objetivos**

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados básicos formados normalmente por decarboxilación de sus aminoácidos precursores. Esta decarboxilación puede ser llevada a cabo por enzimas de la propia carne, pero en mayor medida lo es por enzimas de origen microbiano

La formación de aminas biógenas en los alimentos es importante no sólo por sus efectos desfavorables sobre las características organolépticas, sino también desde el punto de vista de la salud del consumidor. Las aminas biógenas afectan a la presión sanguínea y una cantidad excesiva en los alimentos puede provocar migrañas, problemas gástricos e intestinales y respuestas alérgicas en personas sensibles. Estas sustancias son especialmente peligrosas en pacientes que están siendo tratados con inhibidores de la enzima monoaminooxidasa.

Las enterobacterias presentes en los embutidos son consideradas generalmente microorganismos con elevada capacidad decarboxilasa, particularmente en relación con la producción de putrescina y cadaverina.

El presente estudio tiene como finalidad evaluar la capacidad para producir aminas biógenas "in vitro" por parte de cepas de *Enterobacteriaceae* aisladas de un embutido tradicional, realizando en primer lugar un test cualitativo. Se pretende, además, en las cepas con resultado positivo a dicho test determinar por técnicas de HPLC la producción de diferentes aminas a lo largo de su crecimiento y las cantidades máximas producidas de cada una de ellas. Esta investigación tiene como fin último articular medidas eficaces de inhibición de la producción de estas sustancias en embutidos tradicionales elaborados a escala semiindustrial.

### **Material y Métodos**

Se utilizaron 79 cepas de *Enterobacteriaceae* (41 de *Hafnia alvei*, 17 de *Serratia liquefaciens*, 5 de *Enterobacter cloacae*, 4 de *Citrobacter braakii*, 2 de *Proteus vulgaris*, 2 de *Proteus mirabilis*, 2 de *Providencia stuartii*, 2 de *Klebsiella terrigena*, 1 de *Rahnella aquatilis*, 1 de *Salmonella arizonae*, 1 de *Citrobacter youngae* y 1 de *Escherichia coli*) aisladas de Botillo, un embutido tradicional del noroeste de España. Las cepas se identificaron por métodos clásicos (García Fontán y cols., 2007), confirmando con posterioridad su identidad con ayuda de las Galerías API 20E.

En cada cepa se ensayó inicialmente la capacidad de producir "in vitro" histamina (actividad histidina decarboxilasa), tiramina (actividad tisorina decarboxilasa), cadaverina (actividad lisina decarboxilasa) y putrescina (actividad ornitina decarboxilasa) utilizando el método descrito por Joosten y Northolt (1987).

Para ensayar la producción de putrescina y cadaverina a lo largo del crecimiento de las cepas y determinar los puntos de producción máxima, de entre las cepas que resultaron positivas al análisis cualitativo se tomaron 2 cepas de *Hafnia alvei*, 2 de *Serratia liquefaciens*, 2 de *Enterobacter cloacae*, 2 de *Citrobacter braakii*, 2 de *Proteus vulgaris*, 2 de *Klebsiella terrigena*, 1 de *Rahnella aquatilis*, 1 de *Salmonella arizonae*, 1 de *Citrobacter youngae* y 1 de *Escherichia coli*. En cada una de estas cepas se construyó la correspondiente curva de crecimiento sembrando en caldo (medio descrito por Joosten y Northolt, 1989, sin adición de agar ni de púrpura de bromocresol) y leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm cada tres horas durante 72 horas. Seguidamente cada una de estas cepas se sembró en el mismo medio conteniendo cada uno de los dos aminoácidos precursores (ornitina y lisina) por separado. En cada cepa, y para cada uno de los aminoácidos precursores, tras la inoculación del medio de cultivo se realizaron lecturas de absorbancia a 650 nm, y se cuantificaron las aminas biógenas correspondientes (putrescina o cadaverina), a las 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 y 72 horas de incubación. La cuantificación de las aminas se llevó a cabo por técnicas de HPLC siguiendo el procedimiento descrito por Eerola y cols. (1993).

Finalmente al tiempo de incubación en el que se habían fijado los máximos de producción de putrescina y cadaverina en cada especie, se determinaron las cantidades de estas aminas biógenas

producidas en el resto de las cepas que no habían sido utilizadas en la prueba de producción a lo largo del crecimiento.

## Resultados

Todas las cepas de *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella terrigena*, *Rahnella aquatilis*, *Salmonella arizonae* y *Citrobacter youngae* presentaron actividad histidina decarboxilasa; en el caso de *Hafnia alvei* resultaron positivas 39 de las 41 cepas ensayadas. Las cepas de *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* y *Escherichia coli* no presentaron actividad histidina decarboxilasa.

Todas las cepas ensayadas presentaron actividad lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa y tirosina decarboxilasa, salvo las pertenecientes a las especies *Proteus mirabilis* y *Providencia stuartii* que no mostraron ninguna de estas tres actividades.

En el estudio de la evolución de la producción de putrescina a lo largo del crecimiento pudo observarse que el máximo de producción (acumulación en el medio de cultivo) se produjo a las 24 horas de incubación en las cepas de *Serratia liquefaciens* y *Escherichia coli* y a las 72 horas en las cepas de *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella terrigena*, *Rahnella aquatilis*, *Salmonella arizonae* y *Citrobacter youngae*.

En el estudio de la evolución de la producción de cadaverina a lo largo del crecimiento se observó el máximo de producción alrededor de las 12 horas de incubación en las cepas de *Hafnia alvei*, a las 16 horas en la cepa de *Salmonella arizonae* y a las 72 horas en las cepas de *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella terrigena*, *Rahnella aquatilis* y *Citrobacter youngae*.

La producción máxima de putrescina fue muy variable en las cepas de *Hafnia alvei* (oscilando entre 169 y 7325 ppm), de *Serratia liquefaciens* (entre 266 y 2586 ppm) y de *Proteus vulgaris* (139-1682 ppm), y más constante en las cepas de *Enterobacter cloacae* (entre 1015 y 2387 ppm) y *Klebsiella terrigena* (407-1006 ppm). *Citrobacter braakii* no produjo cantidades importantes de putrescina (entre 206 y 606 ppm). Destacó la baja producción de putrescina de la cepa de *Citrobacter youngae* (100 ppm) y de la cepa de *Rahnella aquatilis* (18 ppm), y la alta producción de la cepa de *Escherichia coli* (2821 ppm) y de la cepa de *Salmonella arizonae* (4372 ppm).

En cuanto a la producción máxima de cadaverina, ésta fue muy similar en las cepas de *Hafnia alvei* (entre 1600 y 1847 ppm) y un poco más variable en las cepas de *Serratia liquefaciens* (entre 1020 y 1935 ppm). La producción máxima de esta amina fue también importante en las cepas de *Klebsiella terrigena* (1688-1745 ppm) y en la cepa de *Escherichia coli* (1471 ppm), y escasa en las cepas de *Enterobacter cloacae* (31-192 ppm) y *Citrobacter braakii* (46-68 ppm), y en la cepa de *Citrobacter youngae* (34 ppm) y en la de *Rahnella aquatilis* (30 ppm).

## Agradecimientos

Trabajo financiado por la Xunta de Galicia, proyectos PGIDIT05PXIB38303PR y 07TAL021383PR.

## Referencias Bibliográficas

- Eerola, S., Hinnkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T.K. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *Journal of AOAC International*, 76: 575-577.
- García Fontán, M.C., Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2007). Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT*, 40: 1610-1622.
- Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41: 259-280.

## INFLUENCIA DE LA GRADUACIÓN TOTAL DE UN VINO MONTILLA-MORILES SOBRE LA VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE

Jiménez C.<sup>1</sup>, Santos I.<sup>1</sup>, Jiménez J.<sup>2</sup>, Baena, S.<sup>1</sup>, Martín M.A.<sup>1</sup>, Bonilla, J.L.<sup>1</sup> y García, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias; <sup>2</sup>Dpto. de Informática y Análisis Numérico. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14071, Córdoba, isidoro.garcia@uco.es

### Introducción y Objetivos

El vinagre es uno de los condimentos y conservantes más antiguos que se conoce, aporta aroma y sabor a los alimentos y mejora sus características de conservación.

En la industria actual del vinagre coexisten procesos tradicionales con los tecnológicamente muy avanzados. Normalmente, los primeros implican un cultivo superficial, mientras que los segundos se llevan a cabo mediante un cultivo sumergido en biorreactores que aumenta mucho la productividad del proceso (Emde, 2006). Estos últimos, siguen un modo semi-continuo de trabajo muy dependiente de diversas variables operacionales así como de las características de la materia prima que se emplee.

En la elaboración de vinagre de vino, una de las variables que se pueden modificar, dentro de cierto margen, es la graduación total del vino: suma de los grados alcohólicos y acéticos.

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la graduación total sobre la velocidad de acetificación y la productividad (Jiménez-Ot, 2008).

### Material y Métodos

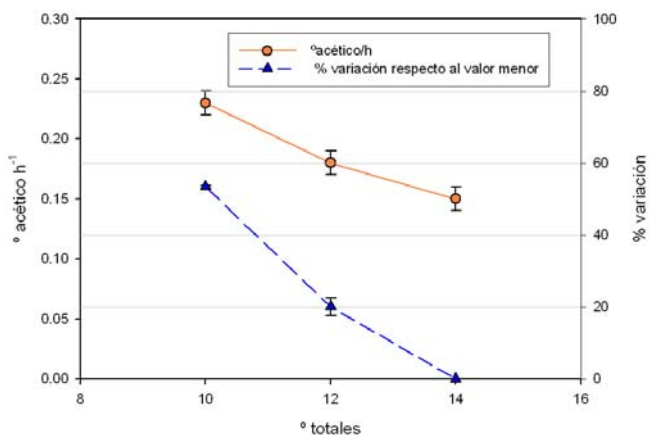
Para la realización de los experimentos se ha utilizado un sistema lo más parecido posible, salvo en la escala, al industrial. El equipo trabaja de forma automatizada (Jiménez-Hornero, 2007).

Se ha empleado un reactor Frings de 10 L de capacidad funcionando en modo semi-continuo. Al final de cada ciclo se descarga la mitad del medio de fermentación cuando la concentración de etanol alcanza un valor de 0.5°GL, actuando el volumen restante como inóculo para la siguiente carga. Las bacterias empleadas provienen de un tanque industrial en plena actividad.

Se ha investigado el efecto de unas graduaciones totales de 14, 12 y 10°. Para ello, se ha evaluado la velocidad global de producción de ácido acético y la producción de éste (García-García, 2007), así como la viabilidad celular a lo largo del ciclo (Baena-Ruano, 2006).

### Resultados y Discusión

En la Figura 1 se recogen los resultados obtenidos para la velocidad de acetificación. Como se observa, se produce un aumento de la velocidad a medida que disminuye la graduación total del vino empleado. Utilizando como referencia el caso para el que la velocidad es menor (graduación total de 14°), el aumento llega a ser hasta un 53% cuando la graduación total empleada es de 10°.



Por otro lado, en la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos para la producción. De manera similar, ésta también experimenta un importante aumento que, en este caso, llega a ser de un 58%. Dado que en todos los casos, se ha realizado la descarga cuando se alcanza una concentración de etanol de 0.5°GL, la principal diferencia entre las condiciones experimentales investigadas está en la

Figura 1.- Velocidad de acetificación y porcentaje de variación respecto al valor

más bajo en función de la graduación total del vino empleado.

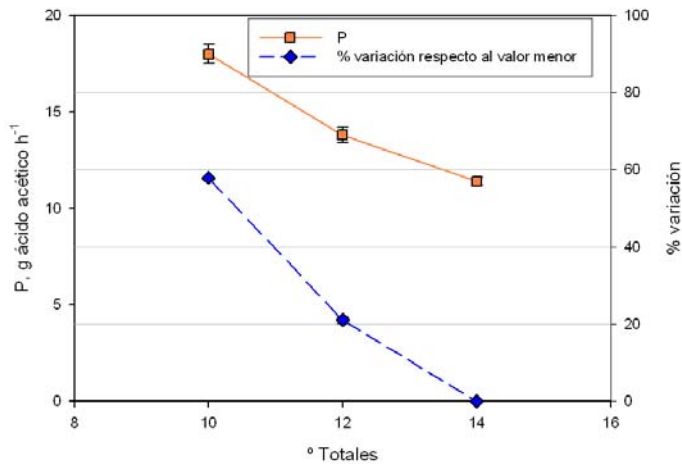


Figura 2.- Producción de ácido acético y porcentaje de variación respecto al valor más bajo en función de la graduación total del vino empleado.

Como se puede observar, la concentración de células viables es mayor a medida que disminuyen los grados totales de la materia prima empleada, es decir, a medida que aumenta la acidez media en el caldo de fermentación.

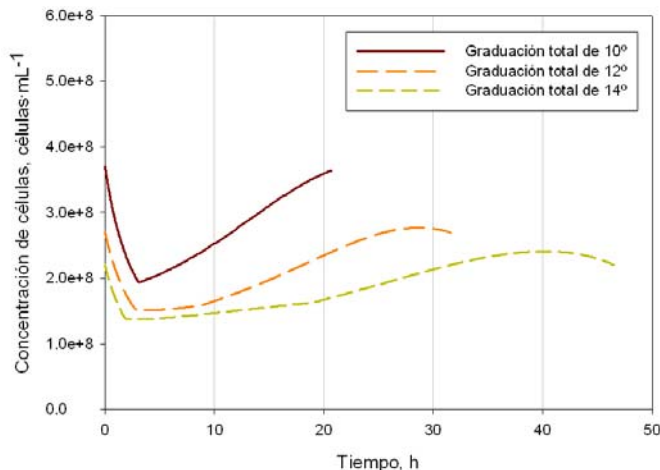


Figura 3.- Evolución de la concentración de células viables en función de la graduación total del vino empleado.

acidez media a lo largo del ciclo y, desde luego, en la acidez en el momento de la descarga. En efecto, la acidez en la descarga, varía desde, aproximadamente, 13.5, 11.5 y 9.5 °acético cuando la graduación total es de 14, 12 y 10 °totales respectivamente. Por tanto, se pone claramente de manifiesto un efecto inhibitor del ácido acético sobre el comportamiento de las bacterias responsables del proceso. Una confirmación adicional de esto se puede encontrar si se analiza la evolución de la concentración de células viables para los casos estudiados; en este sentido, en la Figura 3 se representan estos resultados.

## Conclusiones

La graduación total de un vino, cuando se desea un alto aprovechamiento del etanol, tiene una influencia muy importante sobre la velocidad de reacción y la producción de un biorreactor para la elaboración de vinagre. Al disminuir aquella se producen aumentos muy importantes en ambos términos. Este comportamiento se puede justificar por la influencia que el ácido acético tiene sobre la actividad y concentración celular.

## Referencias Bibliográficas

- Baena-Ruano, S.; Jiménez-Ot, C.; Santos-Dueñas, I.M.; Cantero-Moreno, D.; Barja, F. y García-García, I. (2006). "Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process". *Process Bioch* 41, 1160-1164.
- Emde, F., (2006). State of the art technologies in submersible vinegar production. *Proceedings, García-García I. (Ed.), Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production. I. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Cordoba, Spain, pp. 101-109. ISBN: 84-7801-816-6.*
- García-García, I.; Cantero-Moreno, D.; Jiménez-Ot, C.; Baena-Ruana, S.; Jiménez-Hornero, J.; Santos-Dueñas, I.M.; Bonilla-Venceslada, J. y Barja, F. (2007). "Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during a semi-continuous vinegar production cycle". *J Food Eng* 80, 460-464.
- Jiménez-Hornero, J.E. (2007). "Contribuciones al modelado y optimización del proceso de fermentación acética". Tesis doctoral. Madrid.
- Jiménez-Ot, C. (2008). "Optimización de la fabricación de vinagre de vino. Influencia de la concentración de etanol en la descarga". Tesis doctoral. Córdoba.

EVOLUCIÓN MICROBIANA DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO TRADICIONAL ASTURIANO CASÍN

Mayo, B., Álvarez-Martín, P., Flórez, A.B., Sacristán, N., Kafili, T., y Llanos, R.R.

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)-CSIC, Carretera de Infiesto s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, baltasar.mayo@ipla.csic.es

**Introducción y Objetivos**

Entre los muchos quesos tradicionales de Asturias, el *Casín* es sin duda uno de los quesos con mayor originalidad. Varios documentos escritos mencionan el queso *Casín* ya en el Siglo XIII, de forma que también es uno de los quesos tradicionales asturianos más antiguos. El *Casín* es un queso de gran contenido graso, sin corteza y con un sabor fuerte y picante. Se elabora de forma artesanal en el concejo de Caso y, en menor medida, en los de Sobrescobio y Piloña. Originariamente la leche se calentaba hasta los 35°C y se coagulaba empleando leche de vaca recién parida conservada durante ocho días en “*butiellu*”, estómago de cerdo. En la actualidad, la cuajada se produce con una coagulación mixta en la que predomina la coagulación enzimática (cuajo animal). Después se escurre en un “*zube*”, paño blanco de lienzo, hasta que suelta todo el suero. Tras el desuerado, al cabo de 2 ó 3 días, la “*torta*” de cuajada se amasa y se sala dándole forma de “*gorollo*”, piezas compactas y picudas que se dejan reposar en lugar fresco y húmedo. Cada semana, los *gorollos* se amasan a mano o utilizando la específica máquina de “*rabilar*”, entre cuyos rodillos se hacen pasar; siendo el sabor más fuerte cuanto más veces se repita la operación.

El trabajo que se presenta tiene dos objetivos principales: la descripción microbiana del *Casín* y la identificación y selección de cepas con propiedades tecnológicas deseables como fermentos.

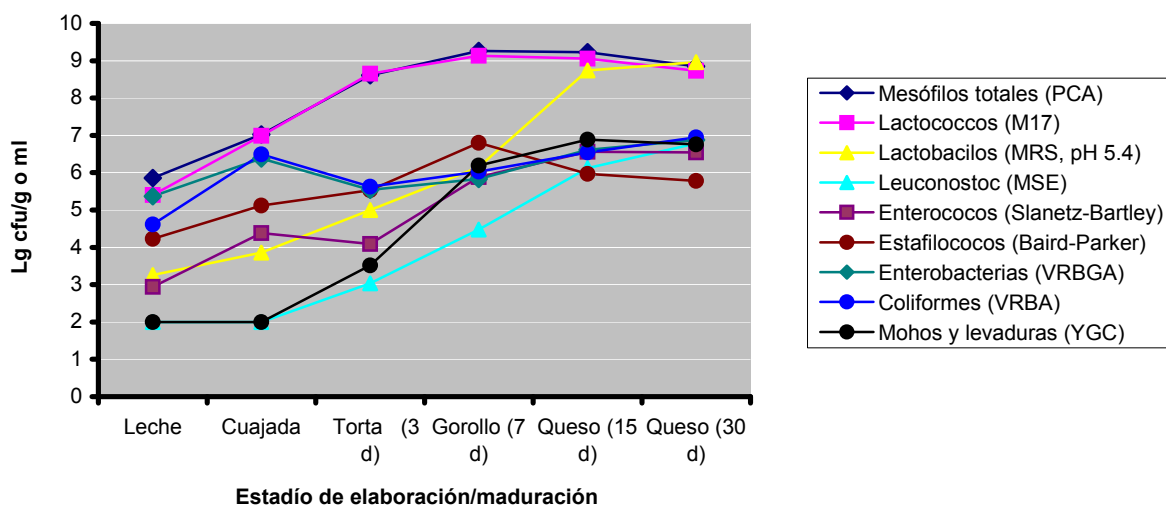
**Material y Métodos**

La caracterización microbiana del *Casín* se lleva a cabo con técnicas tradicionales de cultivo y la técnica independiente de cultivo DGGE. Se han analizado las muestras de leche, cuajada, *torta* (3 días), *gorollo* (7 días) y quesos de 15 y 30 días de maduración. La identificación de los microorganismos se llevó a cabo por secuenciación parcial del gen que codifica el ARNr 16S. Las bandas de DGGE se compararon con bandas patrón o se identificaron mediante secuenciación.

**Resultados y Discusión**

La evolución microbiana se estudió en dos elaboraciones de dos productores distintos. La microbiología del *Casín* es compleja, como corresponde a quesos elaborados con leche cruda sin fermento. Los microorganismos totales alcanzan su máximo a los siete días de elaboración (en la fase de “*gorollo*”), iniciando después un lento descenso (Figura 1).

Figura 1.- Evolución de las poblaciones microbianas de queso Casín (Prieres)



Con el ánimo de caracterizar lo mejor posible las poblaciones mayoritarias, se estudió la recuperación de microorganismos en cinco medios de cultivo no selectivos y utilizando distintas condiciones de incubación (Tabla 1). El número de microorganismos viables revivificables que se recuperan depende, como se observa, del medio y las condiciones de cultivo.

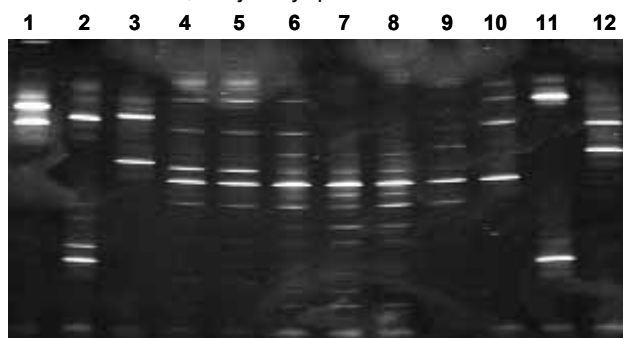
**Tabla 1.-** Recuperación de microorganismos totales del *Casín* en varios medios de cultivo.

<i>Medio de cultivo</i>	<b>Condiciones de cultivo (5 días a 32°C)</b>		
	<b>Aerobiosis</b>	<b>Anaerobiosis</b>	<b>Microaerofilia</b>
PCA	8.45	8.39	8.34
Agar Brucella	8.54	9.17	8.87
Agar Sangre	8.82	9.14	8.97
Brain Heart Infusion	8.44	9.21	8.38
Reinforced Clostridium Medium	8.36	9.09	8.76

Se han identificado microorganismos en dos puntos clave de la producción: el final de la acidificación y el queso maduro. Para ello, se han purificado 50 colonias de cada muestra de las placas de PCA, Agar Brucella y Agar Sangre de las que se han identificado 182 (86 de torta y 96 de queso). *Lactococcus garvieae* es mayoritario en la torta, mientras que en el queso el mayoritario es *Lactococcus lactis* subps. *lactis*. Algunas enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.) aparecen también como mayoritarias en la torta, pero no en el queso. En la muestra de 30 días, en concordancia con los resultados de la Figura 1, se han identificado varias colonias de *Lactobacillus plantarum*. La secuencia 16S de un organismo mayoritario en torta (15 aislados) pertenece a una actinobacteria sin representantes cultivados.

En cuanto a los resultados de la DGGE, por el momento solo se han realizado ensayos utilizando los oligonucleótidos específicos de bacterias GC-F357 y R518. En la Figura 2 puede verse la evolución de las poblaciones microbianas del *Casín* con esta técnica (calles 4 a 9). Las bandas se identifican por comparación con una escalera de amplicones de cepas conocidas (calles 1, 2, 3, 10, 11, y 12), o mediante la recuperación de ADN de las bandas, reamplificación con oligonucleótidos sin pinza GC, secuenciación y comparación de las secuencias con las de las bases de datos.

**Figura 2.-** DGGE de muestras de leche, cuajada y queso *Casín* de distintas fases de maduración.



**Conclusiones:**

- 1.- Se ha iniciado la caracterización microbiana del queso tradicional asturiano Casín por medio de técnicas convencionales de cultivo y técnicas de microbiología independientes de cultivo.
- 2.- Los lactococos parecen ser dominantes en todas las fases de elaboración y maduración, aunque parece haber un reemplazamiento de la especie *Lactococcus garvieae*, mayoritaria en leche y cuajada, por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, mayoritaria en queso.
- 3.- Los lactobacilos, representados por la especie *Lactobacillus plantarum*, aumentan a lo largo de la maduración hasta situarse entre las poblaciones dominantes.
- 4.- Se han recuperado en cultivo microorganismos sin representantes cultivados que pudieran ser esenciales para generar las características organolépticas típicas del queso.

## PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO FERMENTADO DE SOYA (*GLYCINE MAX*) TIPO TEMPEH CON *RHIZOPUS ORYZAE*

Munigua-Pérez R<sup>1</sup>, Espinosa-Texis A<sup>1</sup>, Castañeda-Roldán E<sup>1</sup>, Reyes-Matías M<sup>2</sup>, González-Salome F<sup>3</sup>, Melgoza-Palma N<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. [lewimx@yahoo.com.mx](mailto:lewimx@yahoo.com.mx)

<sup>2</sup>Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas Bioquímica-Alimentos; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

### Introducción y Objetivos

Los productos fermentados han sido el sustento de culturas milenarias (Cuacher, 2001). El tempeh es un producto de soya fermentada por hongos del género *Rhizopus*, que se elabora de forma artesanal en Indonesia (Beltrán 1994). En México la producción de soya (334,600 ton. INEGI.2006) va en aumento; solo un bajo porcentaje es empleado para la alimentación humana. Por ello la elaboración de estos productos es una opción para el aprovechamiento de la misma. El objetivo de éste trabajo fue elaborar un producto fermentado de soya con *Rhizopus oryzae* tipo tempeh, determinando su composición fisicoquímica y su aceptabilidad en población adulta.

### Material y Métodos

Preparación del sustrato. Las semillas de soya se sometieron a un remojo en soluciones de ácido láctico grado alimenticio por 12h en a diferentes concentraciones (0.50, 0.75, 1.5%), después de este tiempo se descascarilló frotándola sobre mayas de acero inoxidable y manualmente. Posteriormente se realizó una cocción del frijol en olla de presión a diferentes tiempos (10, 15, 20 minutos).

Preparación del inóculo. Se empleó una cepa tipo de *Rhizopus oryzae* NRRL 2700, crecida en agar dextrosa Sabouraud. Ajustándose el inóculo a una concentración de  $84 \times 10^4$  conidios por mililitro.

Proceso de fermentación. Se colocó el frijol en bolsas plásticas estériles con cierre hermético, depositándose 5 mL del inóculo distribuyéndolo con movimientos circulares y haciendo presión para compactarlo, las bolsas se dividieron en grupos para incubarlo a diferentes temperaturas (26, 28, 30°C), por diversos tiempos (12, 24, 36h), finalizada la fermentación se realizó el salado del producto sumergiéndolo en una solución de NaCl al 7%, se escurrió y frió en aceite comestible (Figura 1).

Análisis proximal. Al producto se le determinaron carbohidratos, proteínas, extracto etéreo, humedad, cenizas, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (ELN)

Evaluación sensorial. Se realizó con la participación de 80 panelistas no entrenados, a los cuales se les proporcionó una boleta para evaluar la aceptabilidad o rechazo del producto. También se realizó una prueba discriminativa de comparación múltiple para encontrar diferencias en los distintos atributos (color, textura, apariencia, sabor y aroma)

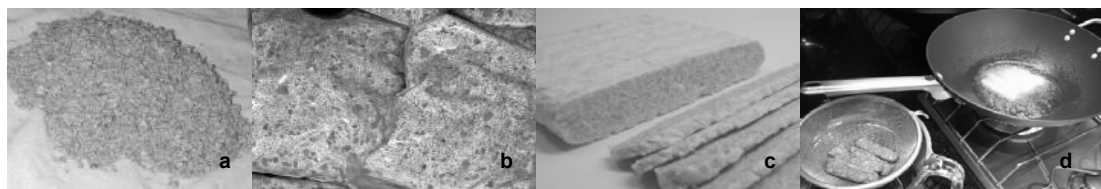


Figura 1. Etapas de producción del producto fermentado de soya tipo tempeh: a) Soya después del proceso de maceración y descascarillado. b) Fermentación de la soya. c) Segmentación del producto después del proceso de fermentación. d) Freído del producto.

### Resultados y Discusión

De los 81 ensayos resultantes se determinó que: La concentración óptima de ácido láctico es de 0.5% ya que permite un desarrollo abundante del hongo. El mejor método para realizar el descascarillado fue el manual; observándose además que el remojo facilita este proceso. El tiempo de cocción que permitió que el color y la textura fueran las más aceptables fue el de 15 minutos.

Se obtuvo una fermentación óptima en condiciones a 30°C durante 24h., debido a que las características sensoriales fueron las más aceptables por los consumidores.

Análisis proximal. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos y la comparación con el sustrato. La soya fermentada contiene un porcentaje menor tanto de proteínas como de grasa debido a los procesos hidrolíticos presentes durante la fermentación. Se observó que la humedad se incrementó durante el proceso. El contenido de cenizas disminuyó durante la fermentación ya que el microorganismo utiliza parte de estas en su metabolismo. Los hidratos de carbono solubles fueron disminuidos mediante el proceso de fermentación ya que estos azúcares fueron utilizados como la principal fuente de energía para el hongo. La acidez en el producto es resultado de la adición inicial a la materia prima además de la producción de ácido láctico durante la fermentación, el cual tiene la función de preservación en el alimento.

Tabla 1. Resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico del tempeh (frito) en 100g de muestra (% base húmeda) y composición fisicoquímica del frijón de soya.

Determinación	Resultados tempeh (%)	*Frijol de soya (%)
Proteínas	27	40
Grasa	8.8	20
Humedad	35	10
Cenizas	2.6	5
Fibra cruda	7.7	5
E.L.N.	18.9	20
Acidez	6.5	-
pH	6.6	-
V.E. (valor energético)	289kcal	422kcal

\*Fuente: U.S. Soyfoods 2005.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial fueron: Una aceptación general del 70%. Los resultados de la evaluación de los atributos es: color 77%, textura 75%, apariencia 75%, sabor 72%, aroma 71%. De acuerdo a los resultados obtenidos se determina que la mayor aceptación es para el atributo color, el cual fue adquirido durante el proceso de freído del producto. Se determinó que la textura del producto fue aceptada por los panelistas ya que la fermentación mejoró considerablemente la misma, dando como resultado un producto suave y firme. La apariencia del producto tuvo una buena aceptación, lo que indica que la apariencia es un punto decisivo en la aceptación o rechazo de un alimento. El sabor fue el atributo de menor aceptación por los panelistas debido a que en nuestro medio no se está acostumbrado a alimentos de este tipo. El aroma alcanzó el menor porcentaje debido a la desnaturalización de proteínas, genera aromas característicos de estos productos.

### **Conclusiones**

Se obtuvo un producto óptimo bajo las siguientes condiciones: 12 h de remojo, 0.5% de ácido láctico, descascarillado manual, 15 minutos de cocción, 24 h de fermentación a 30°C de temperatura.

El análisis fisicoquímico del producto reveló la disminución del contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Se demostró la aceptabilidad general del producto en un 70%.

La prueba discriminativa de comparación múltiple mostró la aceptabilidad de los atributos en un 74.6%

### **Referencias Bibliográficas**

**Beltrán G. A. Fermentaciones alimenticias. Editorial Acribia–Zaragoza. 1994.**

**Cuacher Malapor P. Alimentos fermentados indígenas de México. Editorial México. D.F. UNAM Dirección general de Publicaciones. 2001.**

INEGI. Anuario estadístico de producción agrícola SAGARPA. 2006

U. S. Soyfoods. Indiana soybean development, copyright 2005

## DISEÑO DE UN MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA DIFERENCIACIÓN DE LA CEPA PG222 DE *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

Núñez F., Asensio M.A., Sánchez B., Casado E.M. y Bermúdez E.

Higiene y Seguridad Alimentaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. Universidad s/n, Apto. correos 643, 10071, Cáceres, [fnunez@unex.es](mailto:fnunez@unex.es)

### Introducción y Objetivos

Durante el procesado del jamón curado, crece en su superficie una abundante población fúngica que puede tener efectos positivos sobre la maduración debido a su actividad antioxidante y a la producción de lipasas y proteasas (Rodríguez y col., 1998), pero que también puede tener efectos indeseables, principalmente la formación de micotoxinas (Núñez y col., 2007). La utilización de cultivos iniciadores adaptados al jamón es una de las estrategias más apropiadas para garantizar que no se desarrollen los mohos indeseables durante el proceso de obtención del jamón y embutidos, favoreciendo al mismo tiempo la actividad de aquellos con efectos deseables.

La cepa de *Penicillium chrysogenum* Pg222, aislada de jamón curado muestra una gran capacidad hidrolítica frente a proteínas miofibrilares (Benito y col., 2003a) y a partir de ella ha sido purificada la proteasa EPg222 (Benito y col., 2002) activa en lomo y embutidos crudos madurados (Benito y col., 2003b, 2004). Esta cepa produce en jamón y lomo curado un aumento en la proteólisis, en la concentración de aminoácidos libres (Martín y col., 2004) y en la generación de compuestos volátiles derivados del catabolismo de aminoácidos (aldehídos ramificados y pirazinas) (Martín y col., 2006).

Sin embargo para utilizar esta cepa como cultivo iniciador en productos cárnicos es aconsejable disponer de un método para diferenciarla de otras de su especie y que permita hacer un seguimiento de su implantación y su desarrollo cuando sea inoculada en productos cárnicos.

El objetivo del presente trabajo ha sido diseñar un método de PCR en tiempo real que permita la detección específica de la cepa Pg222 de *P. chrysogenum*.

### Material y Métodos

Para realizar el experimento se utilizó la cepa de *P. chrysogenum* Pg222, y otras 15 cepas pertenecientes a la misma especie, incluyendo tanto aislados de productos cárnicos como procedentes de colecciones de cultivos tipo.

El ADN se extrajo de acuerdo con un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Sánchez y col., 2008) a partir de 50 mg de micelio de los mohos cultivados en Agar Extracto de Malta a 25°C durante 4 días. Tras una digestión durante 35 min a 60°C con proteinasa K y una incubación overnight a 30°C con liticasa, se procedió a triturar el micelio en un mortero con nitrógeno líquido. El extracto se trató con ARNasa A durante 1 h at 37°C y posteriormente el ADN se extrajo con el equipo semiautomático ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystem).

Se probaron 5 parejas de cebadores para PCR en tiempo real (RT-PCR) diseñados a partir de la secuencia específica que codifica el enzima EPg222 (Benito y col., 2006), para comprobar su especificidad en la detección de la cepa Pg222. La RT-PCR se llevó a cabo en el equipo 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystem), utilizando SYBR® Green como marcador. En primer lugar se procedió a optimizar las condiciones de la PCR, utilizando diferentes concentraciones de cebadores y de ADN procedente de la cepa Pg222. Posteriormente se realizó el estudio incluyendo todas las cepas de *P. chrysogenum* en dichas condiciones: 40 ciclos 95°C 15 s y 60°C 1 min, tras una desnaturalización inicial a 95°C 10 min.

### Resultados y Discusión

Los mejores resultados para la RT-PCR se obtuvieron utilizando 3  $\mu$ l de cada cebador (5  $\mu$ M) con 5  $\mu$ l del ADN diana (aproximadamente 1 ng/ $\mu$ l). Utilizando estas condiciones se obtuvieron

resultados satisfactorios con dos de las parejas de cebadores diseñados, siendo los mejores los conseguidos con la pareja RTEPg1-F y RTEPg1-R (Figura 1).

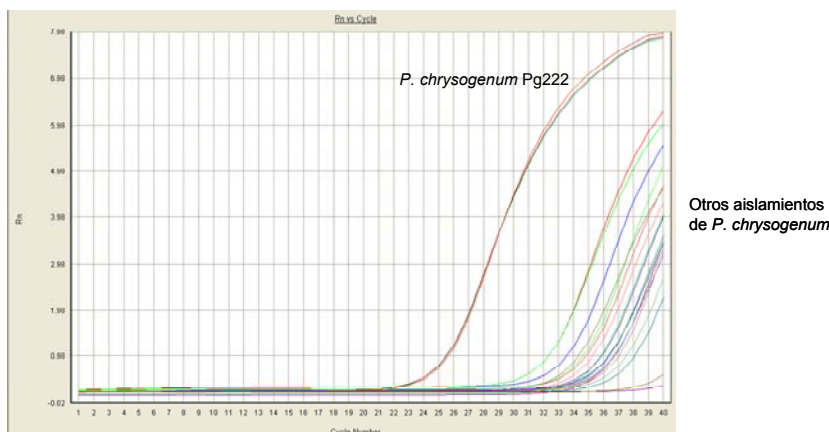


Figura 1. Resultado de amplificación por RT-PCR del ADN de las diferentes cepas de *P. chrysogenum* utilizando los cebadores RTEPg1-F y RTEPg1-R.

Como puede observarse, con estos cebadores diseñados a partir de la secuencia que codifica el enzima EPg222 se consigue amplificar el ADN de la cepa Pg222 con una  $C_T$  de 21, y no el de las otras pertenecientes a la especie *P. chrysogenum*, incluyendo diferentes cepas aisladas de productos cárnicos (que poseían valores de  $C_T$  superiores a 30).

Por lo tanto utilizando estos cebadores es posible la detección de la cepa *P. chrysogenum* Pg222 a partir de ADN extraído de colonias aisladas, aunque sería conveniente probar su utilidad con preparaciones de ADN obtenidas a partir de muestras recogidas directamente de la superficie de productos cárnicos en los que puede existir una población fúngica muy diversa.

## Conclusiones

El método de RT-PCR diseñado permite la detección específica de la cepa *P. chrysogenum* Pg222. En consecuencia los cebadores RTEPg1-F y RTEPg1-R pueden ser útiles para el seguimiento de la implantación y desarrollo de esta cepa cuando se utilice como cultivo iniciador en productos cárnicos.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto RM2006-00013-00-00 del INIA (Ministerio de Educación y Ciencia y FEDER).

## Referencias Bibliográficas

- Benito, M.J., M. Rodríguez, F. Núñez, M.A. Asensio, M.E. Bermúdez y J.J. Córdoba (2002). *Appl. Environm. Microbiol.* 68, 3532-6.
- Benito, M.J., J.J. Córdoba, M. Alonso, M.A. Asensio y F. Núñez (2003a). *Int. J. Food Microbiol.* 89, 155-61
- Benito, M.J.; M. Rodríguez, R. Acosta y J.J. Córdoba (2003b). *Meat Sci.* 65, 887-84
- Benito, M.J.; M. Rodríguez, A. Martín, E. Aranda y (2004). *Meat Sci.* 67, 497-505.
- Benito, M.J.; I.F. Connerton y J.J. Córdoba (2006). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 356-65.
- Martín, A., J.J. Córdoba, F. Núñez, M.J. Benito y M.A. Asensio (2004). *Int. J. Food Microbiol.* 94, 55-66
- Martín, A., J.J. Córdoba, E. Aranda, M.G. Córdoba y M.A. Asensio (2006). *Int. J. Food Microbiol.* 110, 8-18.
- Núñez, F., C.D. Westphal, E. Bermúdez y M.A. Asensio (2007). *J. Food Prot.* 70, 2829-36.
- Rodríguez, M., F. Núñez, J.J. Córdoba, M.E. Bermúdez, y M.A. Asensio (1998). *J. Appl. Microbiol.* 85: 905-12.
- Sánchez, B., M. Rodríguez, E. Casado y J.J. Córdoba (2008). *J. Food Prot.* (En prensa).

## POTENCIAL DE CEPAS DE *Enterococcus faecium* AISLADAS DE LECHE MATERNA COMO CULTIVOS BIOPROTECTORES O ADJUNTOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS

Rodríguez J.M., Reviriego C., Arroyo R. y Fernández L.

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Avda. 28040, Madrid, jmrodrig@vet.ucm.es

### Introducción y Objetivos

La leche materna es el alimento ideal para los recién nacidos ya que satisface todos sus requerimientos nutritivos y les protege frente a infecciones. En un estudio previo se observó que este fluido biológico es una buena fuente de enterococos para el intestino infantil (Martín et al., 2003). El hecho de que los enterococos estuvieran presentes en un sustrato lácteo, poseyeran una notable actividad antimicrobiana y fueran seguros para una población especialmente sensible, como los neonatos (Reviriego et al., 2005), sugería una posible aplicación como agentes bioprotectores por parte de la industria quesera. En consecuencia, se procedió a la evaluación de su actividad anti-*Listeria* y de diversas propiedades tecnológicas relevantes para la elaboración de quesos.

### Materiales y Métodos

En este trabajo se ha empleado una colección de siete cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de tres muestras de leche materna (Reviriego et al., 2005). La capacidad anti-*Listeria* de las cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna se evaluó mediante la técnica de Magnusson y Schnürer (2001) empleando como bacterias indicadoras *Listeria monocytogenes* ScottA, Ohio, CA y SLR1, y *Listeria innocua* RdC y TFD1. Paralelamente, se investigó si la posible actividad inhibidora era debida a la producción de bacteriocinas mediante un ensayo de difusión en agar. La actividad acidificante de las distintas bacterias se evaluó midiendo el cambio del pH y la acidez titulable en leche desnatada a las 6, 12 y 24 h de incubación a 32°C. La actividad proteolítica se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico basado en el empleo de OPA (*o*-phthaldialdehído). La actividad aminopeptidásica de los extractos intracelulares se ensayó utilizando los sustratos L-alanina *p*-nitroanilida (Ala-*p*NA), L-leucina *p*-nitroanilida (Leu-*p*NA), L-lisina *p*-nitroanilida (Lys-*p*NA), L-prolina *p*-nitroanilida (Pro-*p*NA) y ácido L-glutámico *p*-nitroanilida (Glu-*p*NA) y la actividad dipeptidásica con glicil- L-prolina *p*-nitroanilida (Gly-Pro-*p*NA). Para la determinación de las actividades esteárica y lipásica se emplearon seis derivados  $\alpha$ -naftil ( $\alpha$ -NA) de los ácidos acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4), caproico (C6), palmítico (C16) y esteárico (C18) siguiendo el método descrito por Abeijón et al. (2006). Los extractos intracelulares se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-agarosa y tras añadir como sustrato el derivado  $\alpha$ -NA del ácido acético, propiónico o butírico se visualizaron en el gel las bandas con actividad esterásica. Finalmente, se procedió a la evaluación de la capacidad anti-*Listeria* de los enterococos en quesos experimentales. Los quesos se elaboraron a partir de leche pasteurizada de la forma descrita por Rodríguez et al. (2005). En cada ensayo, la leche se distribuyó en 5 cubas. Dos se inocularon con un cultivo en leche de *E. faecium* LJx4. Otras dos cubas con la cepa enterocócica y con *L. innocua* SA1 (concentración final: 4 log UFC/ml). La cuba restante se inoculó únicamente con *L. innocua* SA1. A partir de cada cuba se obtuvo un queso (~190 g). Antes del prensado, se tomaron dos muestras (2 g) de cuajada de cada cuba. Después, se tomaron muestras en los días 1, 7, 14, 21 y 28. Los recuentos de *L. innocua* se determinaron en placas de agar PALCAM. En este trabajo se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Duncan de comparaciones múltiples *post hoc*.

### Resultados y Discusión

Las 7 cepas de *E. faecium* mostraron actividad antimicrobiana frente a todas las listerias empleadas como indicadoras. Sin embargo, no se pudo detectar actividad bacteriocinogénica. En cuanto a la actividad acidificante de las cepas de *E. faecium*, el pH inicial de la leche fue 6,57. Al cabo de 6 h de crecimiento a 32°C, todas las cepas habían disminuido el pH de los cultivos en leche a valores que oscilaban entre 6,06 y 6,11. Al cabo de 24 h a 32°C, el pH de ninguno de los cultivos había descendido por debajo de 5,0. La cantidad de ácido láctico producido por las cepas después de 6 h osciló entre 0,06 y 0,08 g 100 mL<sup>-1</sup>. No se observaron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) al cabo de 12 (0,09-0,14 g 100 mL<sup>-1</sup>) ó 24 h (0,18-0,21 g 100 mL<sup>-1</sup>) a 32°C. Por lo tanto, deben

considerarse con escasa capacidad acidificante, ya que la cantidad de ácido producida fue muy inferior a la necesaria para la coagulación de la leche. Ninguna de las cepas de *E. faecium* tuvo una actividad proteolítica detectable, excepto las cepas Lc4 y LJx4, que liberaron una pequeña cantidad de grupos amino ( $DO_{340}$   $0,018 \pm 0,002$  y  $0,009 \pm 0,001$ , respectivamente). Las cepas mostraron actividad aminopeptidásica frente a Glu-, Ala-, Leu- y Lys-pNA, pero no frente a Pro-pNA. El nivel de actividad observada con los sustratos Ala-, Leu- y Lys-pNA fue similar (entre 4 y 16 nmol  $mg^{-1}$  proteína  $h^{-1}$ ) y unas diez veces inferior al obtenido al emplear Glu-pNA (entre 50 y 113 nmol  $mg^{-1}$  proteína  $h^{-1}$ ). Ninguna mostró actividad dipeptidásica con Gly-Pro-pNA como sustrato. Se detectó actividad esterásica en los extractos intracelulares de todas las cepas ensayadas. En todos los casos, el valor más alto de actividad esterásica siempre se obtuvo con los derivados del ácido propiónico (entre 85,24 y 114,22  $\mu$ moles de  $\alpha$ -NA  $mg^{-1}$  proteína  $h^{-1}$ ) y el ácido butírico (entre 65,61 y 99,64  $mg^{-1}$  proteína  $h^{-1}$ ). La actividad esterásica con los derivados del ácido acético (entre 17,91 y 28,73  $\mu$ moles de  $\alpha$ -NA  $mg^{-1}$  proteína  $h^{-1}$ ) y caprílico (entre 16,70 y 23,28  $\mu$ moles de  $\alpha$ -NA  $mg^{-1}$  proteína  $h^{-1}$ ) fue bastante menor. En ningún caso se observó actividad lipolítica apreciable empleando como sustratos los derivados  $\alpha$ -NA de los ácidos grasos palmítico ni esteárico. Todos los enterococos mostraron una única banda electroforética ( $R_f$  de 0,34) con actividad frente a los tres sustratos ensayados, los derivados de los ácidos acético, propiónico y butírico. La actividad anti-*Listeria* de *E. faecium* LJx4 se evaluó en quesos inoculados con *L. innocua* SA1. En los quesos que contenían el enterococo, los valores de pH oscilaron entre 4,94 y 4,99 en el día 1 y entre 4,66 y 4,67 al final del periodo de maduración. Por otra parte, el pH de los quesos que únicamente se inocularon con *L. innocua* SA1 varió de aproximadamente 6,18 (día 1) a 4,95 (día 28). En los quesos control, los recuentos de *L. innocua* SA1 fueron de 7,40 log UFC/g en el día 1 y disminuyeron durante la maduración hasta alcanzar 6,35 log UFC/g en el día 28. La presencia de *E. faecium* LJx4 provocó una reducción significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) en los recuentos finales de *L. innocua*, que fueron 3,64 log menores que los observados en los quesos control tras 28 días de maduración.

En este trabajo, se han estudiado la actividad anti-*Listeria* y distintas propiedades tecnológicas en cepas de *E. faecium* procedentes de leche materna para determinar su posible aptitud para la elaboración de productos lácteos fermentados. Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas tuvieron un comportamiento similar con relación a casi todas las propiedades tecnológicas ensayadas. Globalmente, las cepas de enterococos aisladas de leche materna evaluadas en este estudio tienen una elevada actividad anti-*Listeria*, poca capacidad acidificante y escasa actividad proteolítica. Sin embargo, presentan intensa actividad esterásica y una notable actividad aminopeptidasa que les permite liberar ácido glutámico. Por todo ello, podrían ser útiles como cultivos auxiliares durante la elaboración de queso. Sería deseable en el futuro analizar con detalle el metabolismo del citrato y los compuestos aromáticos formados a partir de los sustratos liberados por la acción de las peptidasas y estererasas de estos enterococos y su influencia en las propiedades organolépticas del queso.

### Conclusión

Las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas a partir de leche de mujeres sanas tienen potencial para ser empleadas como cultivos bioprotectores o adjuntos por parte de las industrias queseras, en combinación con un cultivo iniciador.

### Referencias bibliográficas

- Abeijón, M.C. et al. 2006. Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. *Can. J. Microbiol.* 52:237-245.
- Magnusson, J. y Schnürer, J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.
- Martín, R. et al. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143:754-758.
- Reviriego, C. et al. 2005. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21:131-137.
- Rodríguez et al. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15:51-57.

**CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE *Lactobacillus* AISLADOS DE QUESOS ARTESANALES D. O. "MANCHEGO" PARA SU USO COMO ADJUNTOS DEL STARTER**

***Cabezas L.*<sup>1</sup>, *Nieto-Arribas P.*<sup>2</sup>, *Poveda J. M.*<sup>2</sup>, *Seseña S.*<sup>3</sup> y *Palop M. LI.*<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba. [bt1carem@uco.es](mailto:bt1carem@uco.es)

<sup>2</sup>Dpto. de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Universidad de Castilla-La Mancha.<sup>2</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Avda. Camilo José Cela s/n, Ciudad Real

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Avda. Carlos III s/n, 45071 Toledo.

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

La mayoría de los quesos, tanto los fabricados con leche cruda como con leche pasteurizada, contienen una microbiota adventicia de bacterias no pertenecientes al cultivo iniciador o starter denominada NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria). Su origen puede variar dependiendo de la leche de partida, de los ingredientes empleados en la fabricación del queso o del ambiente de la quesería (Martley y Crow, 1993). Ha sido ampliamente descrito que las especies *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb. plantarum* son las predominantes en esta microbiota no starter en muchas variedades de quesos: Cheddar, Idiazábal, Roncal, etc. Además hay que destacar que ambas especies continúan multiplicándose a lo largo de la maduración (Mannu et al., 2000, Sánchez et al., 2006). Por otra parte, los quesos elaborados con leche cruda desarrollan un aroma y un sabor más intenso que los quesos elaborados con leche pasteurizada (Gaya et al., 1990), lo que ha estimulado el interés por añadir NSLAB como adjuntos del starter a los quesos que se elaboran con leche pasteurizada (Poveda et al., 2003 y 2004, Broome, 2007).

Los objetivos perseguidos en este estudio son la caracterización de lactobacilos autóctonos aislados de quesos Manchegos artesanales previamente tipados por Sánchez et al. (2006), con el propósito de seleccionar aquél o aquellos que presenten las mejores propiedades tecnológicas para poder ser empleados como adjuntos de un starter en la fabricación de queso Manchego industrial.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se han analizado un total de 30 cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos de D. O. "Manchego" artesanales elaborados en 2 queserías distintas (C y N) de Castilla-La Mancha., 10 cepas pertenecientes a *Lb. plantarum* y 20 pertenecientes a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Para llevar a cabo la caracterización tecnológica, se determinaron las siguientes actividades: 1) La actividad acidificante midiendo el  $\Delta$ pH (Garriga et al., 1996); 2) la actividad proteolítica empleando el o-pthaldehyde (oPA), según el método descrito por Church et al. (1983); 3) la actividad aminopeptidásica con dos sustratos, L-lisina *p*-nitroanilida (Lys-PNA) y L-leucina *p*-nitroanilida (Leu-PNA), utilizando el método de Arizcun et al. (1997); 4) la actividad autolítica, (Lansgrud et al., 1987) y 5) La producción de aminas biógenas (Bover-Cid y Holzapfel, 1999), utilizando como sustratos L-tirosina, L-histidina, L-ornitina y L-lisina.

### **RESULTADOS**

La acidificación desarrollada por las cepas de *Lb. plantarum* fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que la producida por muchas de las cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* después de 24 h de incubación (Tabla 1). De acuerdo con la clasificación establecida por Bouton et al. (2002), la mayoría de los aislados presentaron una baja capacidad acidificante, siendo la cepa CA12MM4 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) la que presentó la capacidad acidificante más elevada.

En lo que respecta a la actividad proteolítica, se observan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores encontrados para las distintas cepas ensayadas (Figura 1). El aislado CA4MM5 (cepa de *Lb. plantarum*) fue el que presentó la mayor actividad proteolítica (2,63 mM Gly L<sup>-1</sup>) seguida de CA0R2, CA6MM3 y NB6MR3, todas pertenecientes a la especie *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Todas las cepas presentaron una actividad leu-aminopeptidasa más elevada que lys-aminopeptidasa (Figura 2) lo que coincide con los resultados encontrados por otros autores (Broome et al., 1991). Las cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* mostraron unos valores más elevados para las dos actividades aminopeptidásicas ensayadas con respecto a las de *Lb. plantarum*, siendo CA6MR4 la que presentó la actividad leu-aminopeptidasa más elevada.

Se pueden observar variaciones considerables en la tasa de autólisis (Figura 3) entre las distintas cepas de *Lactobacillus* (del 5% al 65%). El aislado CA0R2 (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) presentó la mayor ( $P < 0,05$ ) capacidad autolítica.

De las 30 cepas estudiadas solo una cepa (CA12MR2) fue capaz de descarboxilar la L-tirosina.

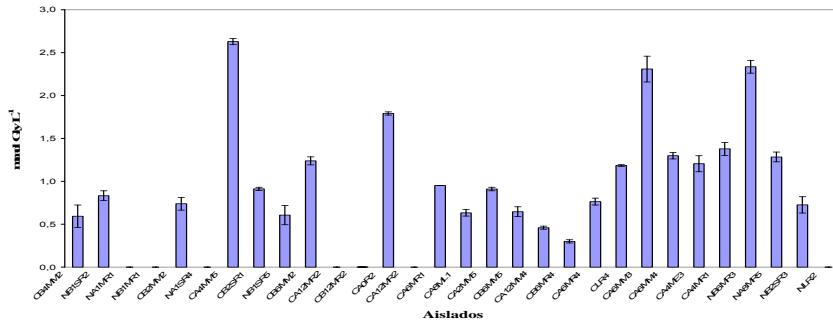


Figura 1. Actividad proteolítica

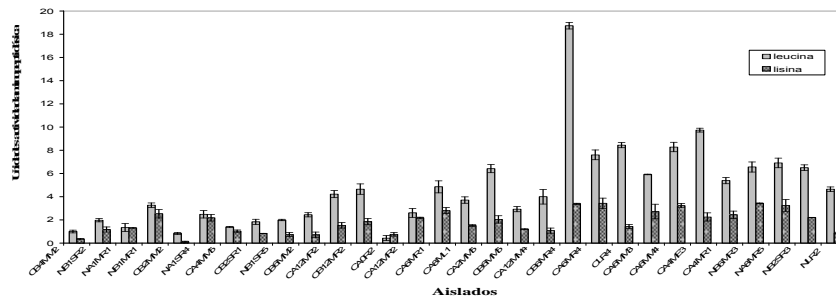


Figura 2. Actividad aminopeptidásica

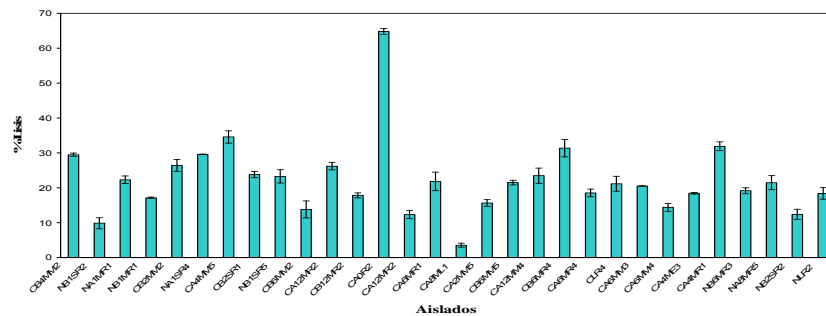


Figura 3. Actividad autolítica

Tabla 1: Actividad acidificante

Aislados	ΔpH 24 horas
<b>Lactobacillus plantarum</b>	
CB4MM2	0,41 ± 0,14
NB1SR2	0,40 ± 0,02
NA1MR1	0,42 ± 0,03
NB1MR1	0,90 ± 0,06
CB2MM2	0,44 ± 0,01
NA1SR4	0,86 ± 0,06
CA4MM5	0,87 ± 0,07
CB2SR1	0,69 ± 0,05
NB1SR5	0,85 ± 0,00
CB6MM2	0,98 ± 0,0
<b>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</b>	
CA12MR2	0,85 ± 0,05
CB12MR2	1,54 ± 0,03
CA0R2	0,80 ± 0,04
CA12MR2	1,29 ± 0,01
CA6MR1	1,19 ± 0,05
CA8ML1	1,35 ± 0,04
CA2MM5	0,63 ± 0,02
CB6MM5	0,28 ± 0,00
CA12MM4	1,67 ± 0,11
CB6MR4	0,83 ± 0,08
CA6MR4	1,22 ± 0,08
CLR4	1,25 ± 0,06
CA6MM3	1,53 ± 0,05
CA6MM4	1,22 ± 0,00
CA4ME3	0,84 ± 0,06
CA4MR1	1,28 ± 0,05
NB6MR3	0,72 ± 0,10
NA8MR5	0,43 ± 0,06
NB2SR3	1,01 ± 0,01
NLR2	0,37 ± 0,03

CONCLUSIONES

La cepa CA0R2, perteneciente a la especie *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ha presentado una mayor capacidad autolítica y una buena capacidad aminopeptidásica. La cepa CA4MM5 (*Lb. plantarum*) presentó la mayor actividad proteolítica. Por lo tanto, ambas cepas, se podrían incluir en la formulación de un starter para la fabricación de queso Manchego industrial, ya que podrían contribuir eficazmente a incrementar el aroma y el sabor de dicho queso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P. (1997). Lait 77, 729-736.  
 Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P., Grappin, R. (2002). Int. J. Food Microbiol. 76, 27-38.  
 Broome, M. C. (2007). En: Weimer, B. (F.d), Improving the Flavour of Cheese. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.  
 Broome, M. C., Hickey, M. W. (1991). The Australian J. Dairy Technol. 46, 19-23  
 Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. (1983). J. Dairy Sci. 66, 1219-1227.  
 Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J., Monfort, J. M. (1996). Int. J. Food Microbiol. 32, 173-183.  
 Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A., Núñez, M. (1990). J. Dairy Sci. 73, 26-32.  
 Lansgrud, T., Landaas, A., Casteberg H. B. (1987). Milchwissenschaft 42, 556-560.  
 Mannu, L., Comunian, R., Scintu, M. F. (2000). Int. Dairy J. 10, 383-389.  
 Martley, F. G., Crow, V. L. (1993). Int. Dairy J. 3, 461-484.  
 Poveda, J. M., Cabezas, L., McSweeney, P.L.H. (2004). Food Chem. 84, 213-218.  
 Poveda, J. M., Sousa, M.J., Cabezas, L., McSweeney, P.L.H. (2003). Int. Dairy J. 13, 169-178  
 Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J. M., Cabezas, L., Palop, M. LL. (2006). Int. J. Food Microbiol. 107, 265-273.

**APTITUD TECNOLÓGICA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS DEL QUESO DE TENERIFE PARA SU USO COMO CULTIVO INICIADOR PARA QUESOS**

***Zárate, V. y González, L.***

<sup>1</sup>*Dpto. de Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. 38206, La Laguna, vzarate@ull.es*

**Introducción y Objetivos**

Los cultivos iniciadores son preparaciones de microorganismos vivos que se aplican a los alimentos para hacer uso de su metabolismo. En la industria quesera, la adición de cultivos iniciadores a la leche pasteurizada permite fabricar quesos seguros desde el punto de vista sanitario, correctamente acidificados y con textura, aroma y sabor determinados por los microorganismos que los conforman.

En general, los microorganismos que forman parte de los cultivos iniciadores deben de cumplir unos requerimientos aptitud tecnológica en lo que se refiere a su seguridad, efectividad y aspectos económicos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la seguridad y efectividad tecnológica de seis cepas de bacterias lácticas aisladas a partir de quesos artesanales de Tenerife para seleccionar tres de ellas que formarán parte de un cultivo iniciador autóctono para la fabricación del queso. Con estas tres cepas seleccionadas se ha estudiado además el manejo rutinario y el modo de obtención a gran escala como paso previo a su aplicación a la industria quesera.

**Material y Métodos**

- Criterios de seguridad. Se determinó la incapacidad de producción de aminas biógenas a partir de los aminoácidos más frecuentes en el queso. Para ello se cultivaron en medio de líquido para la inducción de las descarboxilasas y luego en medio sólido donde se detectó la actividad descarboxilasa por la aparición de un halo púrpura alrededor del cultivo, a excepción de la tirosina descarboxilasa que origina la desaparición de la turbidez del medio. Tanto el medio líquido como el sólido contenían piridoxal- 5-fosfato y uno de los siguientes aminoácidos: lisina, histidina, tirosina, triptófano y ornitina.

- Criterios de efectividad tecnológica. Se determinó la capacidad acidificante (FIL-IDF, 1980), la producción de diacetilo en leche (King, 1948); la proteólisis en leche (Church y col., 1983); y la tolerancia a la sal por crecimiento en medio sólido de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) con concentraciones de NaCl del 0-6%.

Con las tres cepas seleccionadas de acuerdo con los criterios anteriores, se determinó el medio de cultivo, la técnica de siembra y las condiciones de incubación más adecuadas para su cultivo rutinario. Asimismo se han estudiado las condiciones óptimas para su cultivo a gran escala utilizando un Sistema de Fermentación Minifors 2,5 litros (Infors HT).

**Resultados y Discusión**

Se realizó el ensayo de la producción de aminas biógenas sobre 6 cepas de bacterias lácticas aisladas del queso artesanal de Tenerife (un lactococo, tres lactobacilos y dos leuconostocs) preseleccionadas en trabajos anteriores para su posible inclusión en el cultivo iniciador autóctono. Ninguna de las seis cepas fue capaz de descarboxilar la lisina, histidina, tirosina, triptófano ni la ornitina. Por lo tanto, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, cualquiera de ellas podría formar parte del cultivo iniciador autóctono ya que pertenecen a géneros que poseen el estatus de GRAS y además no producen metabolitos tóxicos durante su crecimiento en los quesos.

En cuanto a la capacidad acidificante, destacó el lactococo con una producción de un 0,33% de ácido láctico tras incubación en leche a 30°C durante 6 horas. El resto de los lactobacilos y leuconostocs produjeron, en las mismas condiciones, un porcentaje inferior al 0,04% de ácido láctico. Ya que la acidificación es una actividad metabólica fundamental para la correcta fabricación del queso se seleccionó la cepa de lactococo para formar parte del cultivo iniciador autóctono.

De las seis cepas ensayadas sólo un lactobacilo fue capaz de producir diacetilo tras 24 horas de incubación en leche. A los 5 días las otras dos cepas de lactobacilos produjeron este compuesto aromático, pero no así el lactococo ni los leuconostocs.

En el ensayo de tolerancia a la sal, todas las cepas mostraron porcentajes de supervivencia superiores al 70% en presencia de un 3% de NaCl. Teniendo en cuenta que en la mayoría de los quesos la concentración de sal se sitúa por debajo del 3%, todas ellas son capaces de crecer en las condiciones de salinidad habituales de este alimento.

Si bien los ensayos tecnológicos realizados en el presente trabajo no mostraron diferencias importantes entre las tres cepas de lactobacilos, se decidió seleccionar una de ellas ya que estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación indicaban que era la más peptidolítica y por tanto la mejor generadora de aroma y textura.

Para la selección de la tercera cepa del cultivo iniciador autóctono se escogió un representante del género *Leuconostoc*, y ya que las dos cepas tenían características tecnológicas similares se tuvo en cuenta la facilidad de manejo y de crecimiento.

Con las tres cepas seleccionadas se procedió a determinar las condiciones de cultivo rutinarias. El medio de cultivo de elección fue para todas el MRS tanto en caldo como en medio sólido. En este último caso la técnica de siembra óptima fue en superficie incubándose las placas a 30°C durante 48 horas en condiciones aerobias.

Una vez elegido el medio y la temperatura de incubación (30°C), se realizó una curva de crecimiento para cada cepa de bacteria láctica seleccionada con el fin de determinar el tiempo de incubación necesario para obtener el mejor rendimiento en biomasa. Tras realizar los recuentos de las u.f.c/ml a lo largo del tiempo de incubación del cultivo, se concluyó que para las tres cepas la mayor biomasa por volumen de medio se alcanzó a las 18-20 horas, coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial.

Finalmente se ha determinado, mediante cultivo en fermentador, las condiciones óptimas de obtención a gran escala de cada una de las cepas seleccionadas teniéndose en cuenta los siguientes factores: inóculo (obtención y porcentaje de adición); medio de cultivo, pH y temperatura del medio; agitación, aireación y tiempo de incubación.

### **Conclusiones**

Los resultados obtenidos durante el estudio de la aptitud tecnológica han permitido seleccionar tres cepas de bacterias lácticas aisladas del queso artesanal de Tenerife (un lactococo, un lactobacilo y un leuconostoc) para su inclusión en un cultivo iniciador autóctono para la fabricación de queso. Estas cepas cumplen los requisitos de seguridad, efectividad tecnológica y facilidad de manejo y obtención deseables en un cultivo iniciador.

### **Referencias Bibliográficas**

- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. 1999. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41
- Buckenhüskes, H.J. 1993. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 253-272.
- Church, F. y col. 1983. *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.
- International Dairy Federation 1980. 129:5-12
- King, N. 1948. *Dairy Industries* 13,860-866.
- Sánchez y col. 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 105:377-387

Este trabajo ha sido financiado por el Excmo. Cabildo Insular de Tenerife

APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA MEJORA DE LA VIDA COMERCIAL DE UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO

***Pérez Rodríguez, F.<sup>1</sup>, Rivera Zamorano, A.<sup>2</sup>, García-Gimeno, R.M.<sup>1</sup>, Valero, A.<sup>1</sup>, Carrasco E.<sup>1</sup> y Zurera, G.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, bt2perof@uco.es

<sup>2</sup> Servicio Andaluz de Salud. Distrito Sur de Córdoba

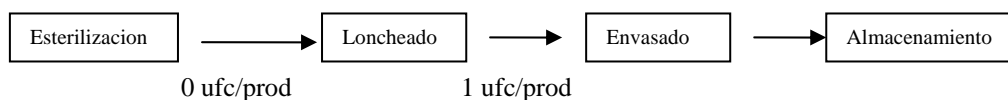
**Introducción**

El presente estudio pretende evidenciar la microbiología predictiva como una herramienta eficaz en la evaluación de microorganismos alterantes en alimentos.

Aunque los procesos térmicos puedan ser efectivos eliminando las bacterias responsables de alteración (Mäkelä y col. 1992), durante la manipulación los microorganismos pueden nuevamente contaminar el producto (Pérez-Rodríguez, 2008). De ahí que sea importante conocer aquellos factores que limitan su crecimiento, y que por tanto, impiden la alteración del producto, prolongando la vida comercial del producto. La microbiología predictiva intenta relacionar factores ambientales e intrínsecos del alimento con la respuesta microbiana (crecimiento y muerte). En este estudio se aplicaron modelos predictivos de crecimiento para estimar la alteración de un producto cárnico cocido loncheado.

**Material y Métodos**

Basado en un proceso de elaboración de un producto cárnico cocido loncheado se estimó el crecimiento de flora alterante con el objetivo de determinar la vida comercial del producto. El proceso consistió en un tratamiento de esterilización comercial que se demostró ser eficaz mediante ensayos microbiológicos. Posteriormente, la pieza estéril fue loncheada y envasada en atmósfera modificada en una mezcla de gases de CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>.



Durante la manipulación para el loncheado, ocurrió la recontaminación del producto. Con objeto de evaluar el posible crecimiento de alterantes, se empleó un modelo predictivo de crecimiento para *Lactobacillus sake*, uno de los principales microorganismos alterantes de cárnicos cocidos (Devlieguere y col. 1999).

$$\mu_{\max} = b \cdot (a_w - a_{w \min}) \cdot ([CO_2 \max] - [CO_2]) \cdot (T - T_{\min})^2$$

La base de datos Combase, (<http://combase.arserrc.gov/>) fue utilizada para definir los parámetros físico-químicos del producto (Aw y CO<sub>2</sub>) y el tiempo de latencia más probable (240 h) del microorganismo para las condiciones del alimento. La aplicación del modelo proporcionó estimaciones del nivel máximo de concentración alcanzado a diferentes tiempos (15, 30, 90,180 días) y temperatura (4 y 6 °C) de almacenamiento. Se partió de un valor inicial de 1 célula por producto (250 g). Por otro lado, se acordó que valores por encima de 7,5 log ufc/g implicarían la aparición de signos de alteración (Korkeala y col., 1989), y por tanto, el producto sería rechazado por el consumidor. Así, la vida comercial máxima fue estimada basada en este criterio.

**Resultados y Discusión**

El tratamiento térmico fue completamente efectivo para la eliminación del *L. sake*. Sin embargo, la recontaminación durante el loncheado aportó una concentración mínima de 1 célula por 250 g de

producto (0.004 ufc/g.). Este valor fue utilizado como concentración inicial del microorganismo en el modelo predictivo de crecimiento. Tras su aplicación se obtuvo que una combinación de una  $A_w = 0.96$  y  $T = 4^\circ\text{C}$  resultó en la mayor vida comercial, 40 días como se puede observar en la Figura 1-B.

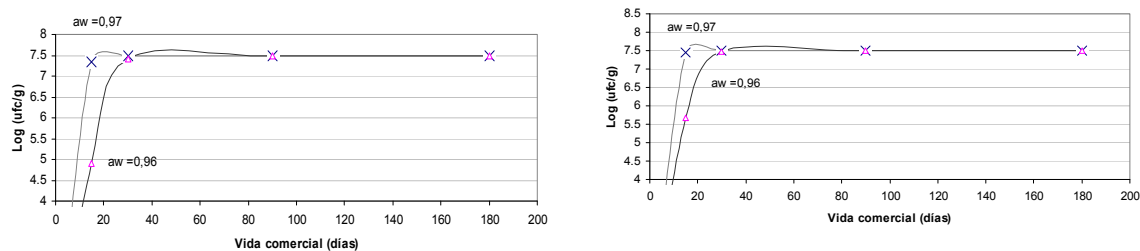


Figura 1. Representación del nivel máximo alcanzado por *L. sake* a distintos tiempos de vida comercial a 6 (A) y 4 °C (B).

Analizando en el modelo el efecto de los distintos factores ( $A_w$ ,  $\text{CO}_2$  y  $T$ ) se observó que la mejora en la vida comercial puede alcanzarse con una disminución en la actividad agua. A valores entorno 0.957 cuando el producto se almacena a  $4^\circ\text{C}$  en las mismas condiciones de envasado, el modelo de crecimiento estimó una vida comercial máxima de 6 meses, aproximadamente (ver Tabla 1). Incluso, a una temperatura de almacenamiento superior ( $6^\circ\text{C}$ ), se consiguió, sin ninguna otra variación del producto, una vida comercial máxima de 4 meses, aproximadamente (ver Tabla 1).

Tabla 1. Concentración máxima de *L. sake* (log ufc/g) a distintos tiempos de vida comercial a 6 y  $4^\circ\text{C}$  con una  $A_w=0.957$

Tiempo(días)	Crecimiento a $6^\circ\text{C}$	Crecimiento a $4^\circ\text{C}$
0	0	0
15	2,66	2,31
30	5,67	4,91
60	7,32	7,01
90	7,48	7,41
120	7,5	7,49
180	7,5	7,5

## Conclusión

El estudio demuestra que la aplicación de modelos predictivos permite identificar aquellos factores más significativos en el crecimiento de microorganismos alterantes, cuantificando su efecto, y posibilitando así incidir sobre ellos de una manera más eficaz, y en nuestro caso prolongando la vida comercial. Así, se concluyó que modificaciones leves sobre la actividad de agua llevaron a los mayores incrementos de vida comercial.

## Referencias Bibliográficas

Devlieghere, F., Van Belle, B., & Debevere, J. (1999) Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *International Journal Food Microbiology*. 46, 57–70.

Mäkelä, P., Schillinger, U., Korkeala, H. & Holzapfel, W.H. (1992). Classification of rosy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organism in meat products. *International Journal Food Microbiology*, 16, 167-172.

Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, RM<sup>a</sup>, Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: A review. *Trends in Food Science and Nutrition* 19, 130-143

## EFFECTO DE LA ANAEROBIOSIS SOBRE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DE ENDOSPOROS DE BACILLUS SPP. DAÑADOS TÉRMICAMENTE

*Antolinos, V., Ros-Chumillas, M., Guevara, L., Muñoz, M. y Fernández, P.S.*

*Dpto. de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA), Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203, Cartagena, pablo.fernandez@upct.es*

### Introducción y objetivos

El género *Bacillus* es muy amplio, hoy en día incluye más de sesenta especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram-positivos, formadores de endosporas, quimiheterótrofos, que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son aerobios o anaerobios facultativos y catalasa positivos.

Está aceptado que en condiciones aeróbicas el crecimiento metabólico es mucho más efectivo que en condiciones anaeróbicas. No obstante, en presencia de daño subletal, es posible que la capacidad de crecimiento en condiciones de anaerobiosis pueda verse limitado, lo que puede suponer una ventaja competitiva para la conservación de alimentos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de distintas spp de *Bacillus* sometidos a diferentes tratamientos térmicos en condiciones de anaerobiosis, para evaluar el impacto del daño térmico sobre la inhibición posterior.

### Materiales y métodos

A los distintos *Bacillus* esporulados se les aplicó un tratamiento de activación mediante un choque térmico de 80°C durante 10 minutos, posteriormente, se les sometió a un tratamiento térmico a distintas temperaturas dependiendo de la termorresistencia, que dieran lugar a una inactivación de 1 o de 4 ciclos logarítmicos, en un termorresistómetro Mastia.

El envasado se realizó en una cabina de anaerobiosis utilizando dos tipos de condiciones: frascos de vidrio en cuya tapa se situaban plásticos con diferente permeabilidad al oxígeno, o bien bolsas termoselladas de dos tipos de plástico con distinta permeabilidad al oxígeno.

Los envases así inoculados se almacenaron a 20 y 37°C durante diversos periodos de tiempo tras los cuales se analizó el pH, contenido de oxígeno disuelto en el medio, así como el crecimiento microbiano.

### Resultados y discusión

Se observó que el crecimiento en condiciones aeróbicas fue más rápido que en condiciones anaeróbicas para los microorganismos estudiados, existiendo también diferencias entre los envases con diferentes permeabilidades al oxígeno y con las temperaturas de almacenamiento utilizadas. El efecto observado fue mayor cuando los endosporos bacterianos se sometieron a tratamiento térmico.

No se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de plástico utilizados en los envases, si bien con las bolsas de plástico termoselladas se consiguieron mejores condiciones de anaerobiosis que con los botes de vidrio. A temperaturas de almacenamiento de 20°C se consigue retardar el crecimiento de los microorganismos en anaerobiosis, que habían sido expuestos a tratamiento térmico.

### Conclusiones

En ausencia de oxígeno el género *Bacillus* retarda su crecimiento y enlentece, por tanto, la alteración en los alimentos, permitiendo alargar su vida útil.

En condiciones de aerobiosis, tras 24 horas de incubación se observa un crecimiento microbiano que duplica el crecimiento en condiciones de anaerobiosis.

La temperatura de almacenamiento, junto con la presencia o ausencia de oxígeno son parámetros que permiten controlar el crecimiento del género *Bacillus*.

**Agradecimientos**

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto AGL2006-13320-C03-02/ALI

**Referencias bibliográficas**

R.Y. Stanier, J.L. Ingraham, E.A. Adelberg, General Microbiology, fourth edition, The MacMillan press Ltd., 1976.

CHARACTERIZATION OF A *BACILLUS SUBTILIS* ISOLATE CAUSING DISCOLORATION DEFECTS IN BREADED MEAT.

De Benito A.<sup>1</sup>, Setlow P.<sup>2</sup>, Marco S.<sup>1</sup> and Tomas D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Bioensayos, ainia centro tecnológico. Parque Tecnológico de Valencia. Paterna, 46980, Valencia, abenito@ainia.es

<sup>2</sup>Department of Molecular, Microbial and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, 06030-3305 USA.

**- Introduction and Objectives**

One of the most common causes of discoloration defects in food is the growth of spoilage microorganisms, whose colonies are pigmented or able to produce pigments that are released into the food. The main aim of the present study was to find the cause of a discoloration defect found in refrigerated MAP breaded sliced meat. The discoloration appeared as black spots or stains on the surface of the breaded meat, which developed before the end of the shelf life.

The microorganism causing the problem was found to be spores of *Bacillus subtilis* that were isolated from the bread crumbs and that were able to germinate and produce the pigment under the storage conditions of the product. Germination studies were performed on the purified spores of the isolate, using specific nutrient germinants such as L-Alanine, AGFK (L-Asparagine, D-Glucose, D-Fructose and Potassium ions), as well as Ca-DPA (Ca-dipicolinic acid).

**- Materials and Methods**

Isolation and identification of *Bacillus subtilis* causing the discoloration defect

Samples of MAP breaded meat with and without signs of spoilage were received in the laboratory. Portions of the surface from the section exhibiting the black discolorations were collected and placed into a stomacher bag containing buffered peptone water. Plate counts were performed for the determination of aerobic mesophiles, lactic acid bacteria and yeasts and moulds. The ingredients of the breaded mixture (batter and bread crumbs) were also examined for the same microbial parameters.

The isolated microorganisms were tested for their ability to form black spots on a solid medium containing the ingredients of the breaded mixture. The only isolates able to reproduce the discoloration were found in the bread crumbs and were identified by 16 S rRNA sequencing as *Bacillus subtilis*.

Spore preparation and germination studies on the isolate

Spores of the isolate were obtained at 37°C on 2xSG medium agar plates as described by Nicholson and Setlow 1990. The same protocol was applied for obtaining spores from *B. subtilis* strain PS533 (Setlow and Setlow 1996) that was used as control. Spores were diluted to a final OD<sub>600</sub>=1 into a solution of either 10mM (final concentration) of Tris-HCl (pH 7.5) and L-Alanine (10mM) or L-asparagine (2,5mM), D- glucose (5mg/ml), D-fructose (5mg/ml) and KCl (50mM) (AGFK). Spore germination by these nutrients was assessed by measuring the fall of OD<sub>600</sub> as well as the increase of OD<sub>270</sub> reflecting to DPA release. Spores were also germinated at 37°C with Ca<sup>2+</sup>-DPA (60mM CaCl<sub>2</sub>, 60mM DPA at pH 8.0). The germination in the latter assay was assessed by flow cytometry after staining with the fluorescent nucleic acid stain Sylo 16 (Molecular Probes).

**- Results and Discussion**

Isolation and identification of *Bacillus subtilis* causing the discoloration defect

High counts of possible spoilage microorganisms were found on the surface of the breaded chicken (10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cfu/g). However there were no apparent differences between samples obtained from tainted or untainted areas. The main type of microorganism found was lactic acid bacteria that were also recovered from the aerobic mesophile plate counts. Pigment producing *Bacillus subtilis* were isolated from aerobic counts performed on the bread crumbs (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> cfu/g). This was the only type of isolate that reproduced the discoloration in an artificial medium (see Fig 1). Strains of *Bacillus subtilis* have

been associated with black pigment production by other authors (Fritze D, 2001). Similar problems of discoloration in breaded meat have been associated with the growth of moulds by other authors (Perez, 2004)

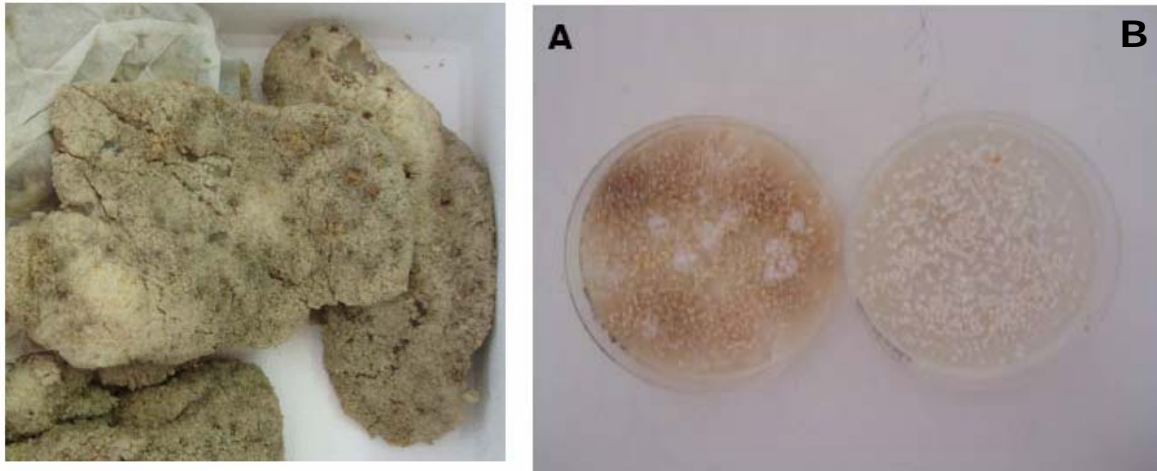
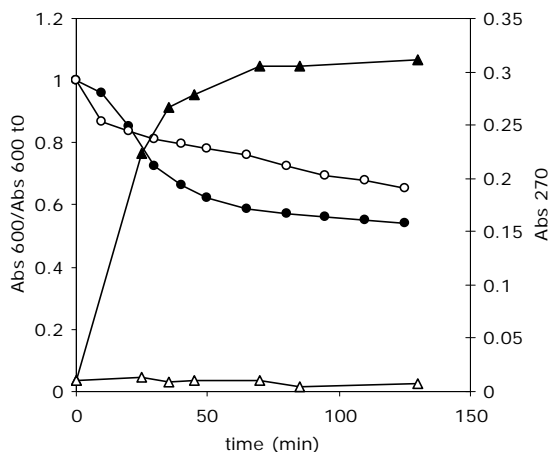


Fig. 1. (Left) Sample of breaded meat exhibiting the discoloration. (Right) Pigment produced by the *Bacillus subtilis* in an artificial medium formulated with the ingredients of the breaded mixture (A) and an uninoculated control (B).

#### Germination studies on the isolate



Rates of germination of spores obtained from the spoilage isolate (P5) were considerably lower than the spores used as control. This was apparent in assays using nutrient germinants as well as Ca-DPA. Results obtained by measurement of absorbance are shown in Fig 2.

The assays performed by flow cytometry showed small percentage of germinated spores (13%) after 2 h exposure to CaDPA.

Fig 2. Germination of spores of the spoilage isolate (P5) open symbols and strain PS533 closed symbols by L-Alanine. Germination was assessed by measuring absorbance at 600nm (circles) or 270nm (triangles).

#### **- Conclusions**

The cause of a discoloration defect in breaded meat was found to be associated with the growth of *Bacillus subtilis* spores, which in this particular study were present in the bread crumbs used as an ingredient. Prevention of the spoilage was attained by using batches of bread crumbs not contaminated with this type of spores. Germination studies performed on the spores of this isolate showed them to be less reactive with common germinants compared to spores of a standard strain.

#### **- References**

Fritze D. and Pukall R. 2001. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. *Int J. of Syst and Evol Micro* (2001), 51, 35–37.

Nicholson, W.L. and Setlow, P. 1990. Sporulation, germination and outgrowth. *Mol. Biol. Method Bacillus* (Harwood&Cutting,ed)

Perez Aparicio, J.; Zapata Soberá, L.; Alonso, G.; Gonzalez Rodríguez, A. and Muñoz Reina, M. 2004. Alteraciones por moho en alimentos envasados en atmósfera protectora: pechuga de pollo empanada y refrigerada. *Eurocarne*, 124-1-4.

Setlow B. and Setlow P. (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology* 178, 3486-3495.

## DETERIORO DE YOGURES ECOLÓGICOS POR LEVADURAS: ANTIGÜOS PROBLEMAS PARA NUEVOS ALIMENTOS

Wrent, P., Valderrama M.J., Peinado J.M. y de Silóniz, M.I.

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais N. 2, 28040, Madrid, pwrent@bio.ucm.es

### Introducción y objetivos

La preocupación por hacer compatible una alimentación sana con el respeto al medio ambiente hace que los productos ecológicos estén adquiriendo un protagonismo creciente. Esta denominación engloba también productos “biológicos” y “orgánicos”. Los productos ecológicos tienen que tener al menos un 75% de ingredientes provenientes de la agricultura ecológica y abarcan una gran variedad de productos como aceites, conservas, vegetales, yogures etc.

En nuestro laboratorio, con la colaboración de Laboratorios Micral S.L., hemos abordado el deterioro de yogures ecológicos de fruta debido al hinchamiento de los envases y producción de burbujas (Fig.1). Estos yogures están elaborados con leche ecológica de vaca, fermentos lácticos, azúcar ecológico, zumo de limón y un 20% de fruta.

El objetivo de este trabajo se ha centrado en el aislamiento e identificación de los microorganismos responsables y su rastreo, a través del tipado molecular de las cepas aisladas, para detectar el origen de la contaminación.

### Material y métodos

**Muestras:** se han analizado un total de 13 muestras pertenecientes a diferentes lotes entre las que se encuentran yogures naturales, de fruta (frutas del bosque, mermelada de fresa y de albaricoque) y las mermeladas de fresa y albaricoque utilizadas. Se han aislado un total de 41 cepas de levadura, 21 por aislamiento directo en el medio YMA con clorafenicol y 20 después de enriquecimiento en medio YMB (YMA sin agar ni cloranfenicol).

**Cepas:** además de las cepas aisladas e identificadas en este trabajo se han añadido 7 cepas pertenecientes a la especie *P. guillemontii* procedentes de diferentes colecciones de cultivo en el desarrollo de los métodos de tipado molecular.

**Identificación:** en todos los casos donde ha sido posible, las levaduras aisladas han sido identificadas mediante el tamaño de la región amplificada 5,8S-ITS del DNA ribosómico (White et al., 1990) y de los fragmentos de restricción obtenidos con las endonucleasas *HhaI*, *HaeIII* y *HinfI* y su posterior comparación con la base de datos YEAST-id.com (CECT). Algunas cepas seleccionadas además se han identificado siguiendo procedimientos convencionales morfo-fisiológicos (68 tests).

**Tipado:** se han comparado dos métodos. El primero utiliza DNA mitocondrial, y se basa en el protocolo simplificado descrito previamente (López et al., 2001, Martorell et al 2006). El segundo usa el espaciador intergénico (IGS) del DNA ribosómico siguiendo el protocolo y condiciones de PCR descritas por Romero et al, (2005) y Quirós et al., (2006)

**Reproducción del deterioro:** La capacidad de las levaduras aisladas para producir gas ha sido investigada utilizando una versión modificada, del ensayo rápido descrito previamente (Casas et al., 2004) inoculándolas en los diferentes tipos de yogur.

### Resultados y discusión

La especie aislada de forma predominante en los aislamientos directos fue *Pichia guillemontii* (21 cepas), encontrada tanto en los yogures naturales como en los de frutas, así como en la mermelada de fresa. En la mermelada de albaricoque se aisló además una cepa de *P.anomala*. En

los cultivos enriquecidos la especie predominante fue también, *P. guilliermondii* y otras dos cepas que no pertenecen a las dos especies citadas.

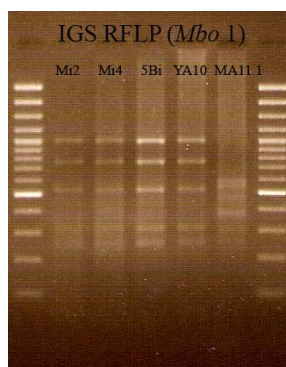
La inoculación de las cepas aisladas en yogures no alterados reprodujo exactamente los efectos observados en fábrica. La levadura creció abundantemente tanto en yogures naturales como con fruta ( $10^7$  UFC/g) pero sólo produjo gas en los yogures con fruta, confirmando que *P. guilliermondii* era la responsable del deterioro. Estos resultados confirman, en primer lugar, que el yogur es un medio adecuado para el crecimiento abundante de levaduras, aunque sean incapaces de utilizar la lactosa, como es el caso de *P. guilliermondii*. Esta especie, como ya ha sido descrito previamente en *P. anomala* (Caggia, 2001) utilizaría las proteínas como fuente de carbono. Esta susceptibilidad a la contaminación debe ser tenida en cuenta cuando, como en este caso, se prescinde de la adición de conservantes.

En segundo lugar el hinchamiento por producción de  $CO_2$  sólo se produce si existe una fuente de carbono fermentable que en este caso, como la especie deteriorante es lactosa negativa son los azúcares presentes en las mermeladas y fruta. Por eso no se produce hinchamiento en los yogures naturales a pesar de presentar una contaminación similar. La tasa fermentativa es bastante sensible a la temperatura y la acumulación de gas se retrasa notablemente a bajas temperaturas ( $8^\circ C$ ) lo que muestra la importancia del mantenimiento de la cadena de frío en el control del deterioro..

El análisis de las dos técnicas de tipado ensayadas ha puesto de manifiesto que la técnica de PCR-RFLP de la región IGS del DNA ribosómico (Fig 2) es una herramienta útil para seguir el rastro a la contaminación, más cómoda y clara que la basada en el DNA mitocondrial. Ambas técnicas ponen de manifiesto que la cepa deteriorante es la misma en todos los yogures ya sean naturales, de frutas del bosque, de fresa o albaricoque. Además ha sido encontrada en la mermelada de fresa pero no en la de albaricoque. Esto sugiere que la mermelada de fresa ha sido el origen inicial de la contaminación, que posteriormente se ha extendido por la fábrica ya que los yogures naturales, sin contacto con la fresa también aparecen contaminados. Es importante resaltar que *Pichia guilliermondii* ha sido propuesta para control biológico del deterioro por hongos en frutas (Kinay and Yildiz, 2008). Lamentablemente no hemos podido disponer de las fresas para comprobar esta hipótesis.



**Fig.1** Yogur ecológico de fresa deteriorado por la producción de gas.



**Fig.2.** RFLP de la región IGS del rDNA. Tipado de las cepas de *P. guilliermondii* Mi2, Mi4, 5Bi, YA10, MA11.1 aisladas de mermelada de fresa, yogur de fresas, yogur natural, yogur de albaricoque y mermelada de albaricoque respectivamente.

Se describe por primera vez el deterioro de yogures debido a la producción de gas por *P. guilliermondii*. El foco de contaminación puede rastrearse mediante la técnica de tipado de PCR-RFLP de la región IGS del DNA ribosómico. La fermentación puede controlarse manteniendo la temperatura por debajo de los  $8^\circ C$ .

### Referencias Bibliográficas

- Caggia et al. 2001. Int. J. Food Microbiol. 71:71-73  
Casas et al. 2004. Int. J. Food Microbiol. 94:93-96.  
Kinay and Yildiz, 2008. Biological Control 45: 433-440  
López et al. 2001. Int. J. Food Microbiol. 68: 75-81.  
Martorell P. et al. 2006. Int. J. Food Microbiol. 106: 79-84.  
Quirós et al. 2006. Antonie van Leeuwenhoek 90: 211-219.  
Romero et al. 2005. FEMS Yeast Res. 5:455-461.  
White et al. 1990. En: PCR Protocols: A guide of methods and applications (InnisMA, GelfandDH, Sninsky JJ & White TJ, eds.) , pp315-322. Academic Press. San Diego.

## RESISTENCIA AL CALOR DE *Bacillus sporothermodurans* SOMETIDO A TRATAMIENTOS ISOTÉRMICOS Y NO ISOTÉRMICOS EN TAMPÓN Y ALIMENTOS

Esteban M.D. y Palop A.

Dpto. de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena (Murcia), alfredo.palop@upct.es

### Introducción y Objetivos

La industria conservera aplica tratamientos térmicos con el fin de garantizar la esterilidad comercial de los alimentos. La esterilidad comercial implica la destrucción de todos los microorganismos viables en las condiciones de conservación habituales. Los microorganismos esporulados termófilos no crecen a las temperaturas de almacenamiento normales y, por tanto, no es necesaria su destrucción. Esto ha permitido a la industria conservera aplicar tratamientos térmicos menos intensos que los que hay que aplicar para conseguir destruir a esporos mesófilos de elevada termorresistencia, aislados recientemente. Tal es el caso de *Bacillus sporothermodurans* (Kort et al., 2005), del que se ha descrito que es tanto o más termorresistente que *Bacillus stearothermophilus*, una de las especies considerada como más termorresistente. El problema de estos microorganismos es que podrían llegar a sobrevivir a los tratamientos de esterilización aplicados tradicionalmente en las industrias conserveras y posteriormente podrían germinar y crecer en las condiciones de almacenamiento habituales y llegar a alterar los alimentos en conserva.

Los tratamientos térmicos aplicados en la industria alimentaria se calculan tradicionalmente aplicando el método de Bigelow. Estos cálculos se realizan normalmente a partir de datos de termorresistencia microbiana obtenidos en condiciones isotérmicas. Sin embargo, los tratamientos térmicos aplicados en la industria incluyen fases de calentamiento no isotérmico, que pueden ser incluso más importantes que la propia fase isotérmica.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la resistencia al calor de *Bacillus sporothermodurans*, en tampón de diferentes pHs y en alimentos, en condiciones isotérmicas y no isotérmicas de calentamiento.

### Material y Métodos

Se utilizó la cepa IC4 de *Bacillus sporothermodurans*, (cedida por Unilever Research Vlaardingen, Holanda). Los esporos fueron activados (100°C/ 5 min) y sometidos posteriormente a los distintos tratamientos isotérmicos (105, 110, 115 y 120°C) y no isotérmicos (a velocidades de 1 y 10 °C/min, partiendo de 100°C) en un termorresistómetro Mastia (patente 200302529). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Estos experimentos se realizaron al menos por duplicado en tampón McIlvaine de pHs 3, 5 y 7, y en crema de calabacín comercial de pH 5,8 (J. García Carrión, Almería). Tras realizar las oportunas diluciones, las muestras fueron sembradas en placas petri con agar BHIA e incubadas durante 24 horas a 37° C, antes de realizar el recuento de supervivientes.

Para los tratamientos isotérmicos, se calcularon los valores D y z, los intervalos de confianza para el 95% y los coeficientes de regresión mediante una hoja de cálculo Excel. Los resultados obtenidos en los experimentos no isotérmicos fueron comparados con los obtenidos en condiciones isotérmicas integrando la letalidad del tratamiento (Stumbo, 1973).

### Resultados y Discusión

*B. sporothermodurans* mostró un valor  $D_{115} = 0,40$  min y un valor  $z = 6.7$  °C en tampón McIlvaine de pH 7.

Al acidificar el medio de calentamiento de pH 7 a pH 5 la termorresistencia no se redujo de manera significativa, mientras que a pH 3 el  $D_{115}$  disminuyó hasta 0,16 min.

El valor z se incrementó hasta 7.4°C cuando el medio de calentamiento se acidificó hasta pH 5, sin embargo al acidificar desde pH 5 a pH 3 no se encontraron diferencias significativas.

En crema de calabacín la termorresistencia fue similar a la obtenida a pHs 7 y 5, no encontrándose diferencias significativas en los valores D a ninguna de las temperaturas investigadas, ni en el valor z.

En condiciones no isotérmicas, los resultados obtenidos fueron predichos razonablemente bien al integrar la letalidad del tratamiento, si bien velocidades de calentamiento altas fueron más letales de lo esperado que las velocidades de calentamiento bajas.

### **Conclusiones**

El pH del medio de calentamiento afecta a la termorresistencia de *B. sporothermodurans*, sin embargo no se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en tampones de pH 7 y 5 y los de crema de calabacín.

La velocidad de calentamiento de los tratamientos no isotérmicos también determinó la resistencia al calor de *B. sporothermodurans*.

### **Referencias Bibliográficas**

Kort, R., O'Brien, A.C., van Stokkum I.H.M., Oomes S. J.C.M., Crielaard, W., Hellingwerf, K.J. and Brul, S. 2005. Assessment of Heat Resistance of Bacterial Spores from Food Product Isolates by Fluorescence Monitoring of Dipicolinic Acid Release. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3556-3564.

Stumbo, C. R., 1973, "Thermobacteriology in Food Processing", Academic Press, London

**EVOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES EN FILETES DE DORADA (*Sparus aurata*), ENVASADOS AL VACÍO, DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN HIELO**

***Santaella M., Periago M.J., Martínez C., Peso P., Martín-Pozuelo G. y Lucas F.***

*Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Área de conocimiento de Nutrición y Bromatología.*

*Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo 30071, marinasp@um.es*

**Introducción y Objetivos**

Las nuevas presentaciones comerciales de productos de acuicultura, como el fileteado y el envasado al vacío, presentan una gran ventaja para los consumidores, al reducir el tiempo de preparación previo a su tratamiento culinario y alargar su vida comercial.

Los cambios bioquímicos, físicos y microbiológicos que ocurren tras la muerte del pescado originan la pérdida de frescura y un deterioro de su calidad (Huss, 1999). En general, sólo una pequeña parte de los microorganismos presentes en el pescado fresco tienen importancia durante el deterioro, son las denominadas "bacterias específicas del deterioro", que en el pescado al vacío almacenado en hielo son fundamentalmente *Photobacterium phosphoreum*, bacterias acidolácticas y *Brochothrix thermosphacta* (Lund *et al.*, 2000).

Las bacterias, utilizan compuestos nitrogenados del músculo del pescado, como sustrato energético produciéndose TMA, aminas biógenas, amoníaco y compuestos azufrados volátiles, responsables del olor desagradable del pescado deteriorado (Dalgaard, 2000). Además del análisis de N-TMA, la determinación de las bases volátiles totales (NBVT), es uno de los métodos más ampliamente utilizados en la evaluación de la calidad de los productos pesqueros. La unión Europea propone esta medida para evitar la comercialización de productos pesqueros impropios para el consumo humano (Reglamento (CE) 2074/2005).

El objetivo de este estudio ha sido determinar, en dorada de acuicultura fileteada y envasada al vacío, la evolución durante el almacenamiento en hielo de los microorganismos alterantes, y los compuestos de degradación producidos por las bacterias específicas del deterioro, para evaluar la calidad de este tipo de presentación comercial, y estimar su tiempo de comercialización.

**Material y Métodos**

Se filetearon manualmente 30 ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) de acuicultura, obteniéndose dos filetes de cada una. Los filetes (100±5 g) se introdujeron en bolsas gofradas PA/PE 80/20, de 100 μm de espesor total, con una permeabilidad al oxígeno de 50 cm<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> bar<sup>-1</sup> y al vapor de agua de 2.3 g. m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> (T<sup>a</sup> 23°C y 0% de HR), envasándose al vacío con una envasadora ORVED Professional Family (ORVED srl unipersonale, Italia) con un nivel de vacío final de 0.15 bar. Las muestras, clasificadas en lotes de seis, se analizaron a su llegada y a los 7, 12, 17 y 22 días tras el fileteado y almacenamiento en hielo. La musculatura exenta de piel y espinas, fue homogeneizada para determinar el contenido de nitrógeno básico volátil total (NBVT), según el método oficial descrito en el Reglamento (CE) 2074/2005, y de nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) siguiendo el método propuesto por Dyer (AOAC, 1990).

Para el análisis microbiológico, se tomó asépticamente una muestra de 10 g de musculatura, realizándose diluciones decimales hasta 10<sup>-8</sup>, con agua de peptona al 0.9% de NaCl. Para la incubación y posterior recuento, se sembró en superficie 0.1 mL de cada dilución. Los medios empleados y los tiempos de incubación fueron los siguientes: microorganismos aerobios mesófilos, PCA (Merck), 48 horas a 30°C; *Pseudomonas spp*, Agar CFC (Oxoid, CM 559) con suplemento SR 103 (Oxoid), 48 horas a 20°C; *Brochothrix thermosphacta*, Agar STAA (Oxoid, CM881) con suplemento SR 1519 (Oxoid), 3 días a 25°C; bacterias Coliformes, Agar Chromocult® (Merck, 1.10426), 48 horas a 37°C; *Photobacterium phosphoreum*, agar Long and Hammer, 7 días a 10°C; bacterias acidilácticas, agar MRS (Oxoid, CM 0361), 5 días a 30°C en anaerobiosis. Para determinar Enterobacterias y *Shewanella putrefaciens* se sembró en masa 1 mL de cada dilución, en Agar VRBGA (Oxoid, CM 485), 24 horas a 30°C para Enterobacterias, y en Agar IA (Oxoid, 867), 4 días a 20°C para *S. putrefaciens*.

## Resultados y Discusión

Durante el almacenamiento en refrigeración de los filetes envasados al vacío, observamos un aumento progresivo en el contenido de NBVT, desde 18.57 mg/100g en el primer muestreo a 24.76 mg/100 g en el día 22 de almacenamiento, acercándose al límite máximo de 25 mg/100g, fijado en el Reglamento (CE) 2074/2005 para comercializar especies como: *Sebastes spp.*, *Helicolenus dactilopterus* y *Sebastichthys capensis*. A partir del día 17 hubo un marcado aumento en el contenido de N-TMA, desde 0,40 mg/100 g en el día 12, a 3.16 y 4.52 mg/100 g en el día 17 y 22, respectivamente.

La Figura 1, muestra el comportamiento de aeróbios mesófilos, Enterobacterias y coliformes, así como la evolución de las bacterias específicas del deterioro, durante el almacenamiento en hielo. De forma general se observaron recuentos altos desde el inicio del estudio, que fueron aumentando progresivamente. No se detectó presencia de bacterias acidolácticas, *Brochothrix thermosphacta* y *Photobacterium phosphoreum* hasta el día 7, 12 y 17, respectivamente. Dichos recuentos, al igual que los de *Pseudomonas spp* y *Shewanella putrefaciens* alcanzaron un máximo en el día 17, rondando valores de 6 log ufc/g, coincidiendo con el aumento en la concentración de N-TMA. El descenso brusco observado en el día 22 de *Photobacterium Phosphoreum*, podría deberse al crecimiento de otros grupos microbianos que desplazaran a esta especie.

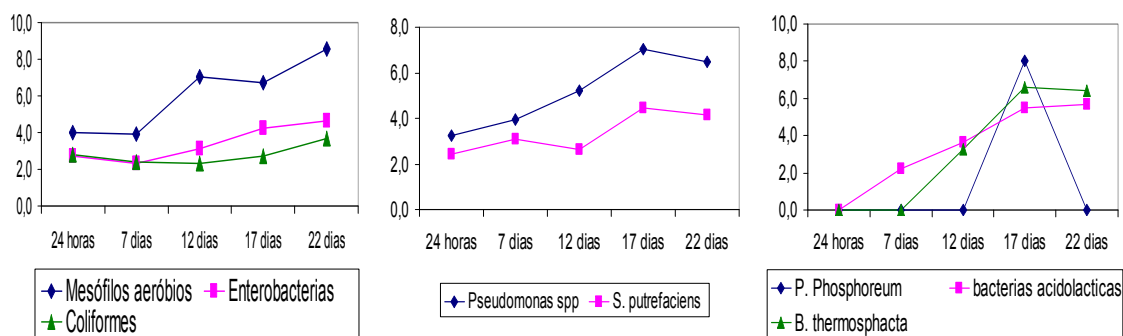


Figura 1. Evolución del recuento de la flora microbiana en log ufc/g

## Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran, que a partir del día 17 de almacenamiento en hielo, los filetes de dorada envasados al vacío, presentan un incremento de N-TMA asociado a la pérdida de calidad, hecho que se acompaña de un incremento de los microorganismos marcadores y del deterioro.

## Referencias Bibliográficas

- AOAC 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Arlington. VA: Association of Official Analytical Chemists
- Dalgaard P. 2000. Freshness, quality and safety in seafoods. Flair-flow Europe Technical Manual. F-FE 380A/00
- Huss H.H. 1999. El pescado fresco: su calidad y cambios en su calidad. Documento Técnico de pesca 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, Roma, Italia
- Lund B.M., Baird-Parker A.C. y Gould G.W. 2000. The Microbiological Safety and Quality of Foods. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Reglamento (CE) 2074/2005 de la Comisión. 2005, por el que se establecen los límites legales de nitrógeno básico volátil total en distintas especies de pescado, y los métodos de análisis que deben utilizarse. DO L 338 de 22/12/2005

## DIAGNÓSTICOS ACEPTABLES PERO EQUIVOCADOS: EL CASO DE *PICHIA BURTONII*

Rincón, J., Silóniz, M.I., Peinado, J.M. Valderrama, M.J.

Dpto. de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 2. 28040. Madrid. [mjv@bio.ucm.es](mailto:mjv@bio.ucm.es)

### Introducción y Objetivos

La aparición de olores y sabores desagradables es una de las manifestaciones más frecuentes del deterioro de alimentos. En ocasiones, se ha sido descrito un olor "a químico", que se ha asociado erróneamente a una contaminación del alimento con productos químicos, más que a un proceso de deterioro microbiano (Pinches y Apps, 2007). El olor a petróleo, a gasolina o a pintura, que se ha detectado en algunos productos de confitería y en mazapanes y derivados se debe a la presencia de un compuesto volátil, 1,3-pentadieno, originado por descarboxilación microbiana del ácido sórbico, conservador empleado habitualmente en este tipo de productos. Entre los microorganismos responsables se conocen algunos hongos filamentosos como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* (Pinches y Apps, 2007) y escasas especies de levaduras, como *Zygosaccharomyces rouxii* y *Debaryomyces hansenii* (Casas y col., 1999, 2004).

En este trabajo hemos estudiado un proceso de deterioro de unas magdalenas que presentaban un fuerte olor a petróleo y que por esta razón habían sido devueltas por los consumidores a la industria productora. El diagnóstico de partida, formulado en base a estudios previos, era la implicación de *Zygosaccharomyces rouxii* en el proceso.

### Material y Métodos

Recuento de levaduras: diluyente glicerol 10% y medio de recuento TGYC 10% (Beuchat y col., 1998). Cultivos de enriquecimiento: medio TGYC 30% de glucosa o almidón y 2 g/l de sorbato potásico. Identificación de levaduras: identificación morfofisiológica (Barnett y col., 1990); identificación molecular: PCR con cebadores específicos de *Z. rouxii* (Sancho y col., 2000) y PCR-RFLP para *P. burtonii* (Esteve-Zarzosoy col., 1999). Detección y análisis de pentadieno: cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (Casas y col., 2004).

### Resultados y Discusión

El estudio preliminar detectó que las magdalenas estaban contaminadas con una población de levaduras del orden de 100 ufc/g. Todos los aislamientos identificados pertenecían a la especie *Zygosaccharomyces rouxii*. *Z. rouxii* es una levadura fermentativa, osmotolerante y resistente a sorbato y otros ácidos débiles. Está presente de forma natural en flores, frutos y cereales, como muchas otras levaduras, pero es finalmente una de las pocas especies que sobrevive en las condiciones de baja actividad de agua de los productos de confitería y repostería. Efectivamente, *Z. rouxii* es el principal responsable del deterioro por producción de gas y, en aquellos productos conservados con sorbato, es responsable de la aparición del olor a petróleo. En el estudio también analizamos jarabe de glucosa y esencia de limón que habían sido empleados en la elaboración de las magdalenas deterioradas. Aislamos *Z. rouxii* en un número similar (aproximadamente 50 ufc/g) a partir del jarabe pero no de la esencia de limón. En estudios anteriores habíamos demostrado que el origen más frecuente de las cepas de *Z. rouxii* deteriorantes de diversos productos de repostería eran los jarabes de glucosa (Casas y col., 2004). Problema resuelto, pero mal resuelto, si nos hubiésemos quedado ahí.

Cuando estudiamos la capacidad de las cepas de *Z. rouxii* aisladas de producir pentadieno a partir de sorbato vimos que era nula. De los cultivos de enriquecimiento del jarabe de glucosa, pero no de los enriquecimientos de las magdalenas, habíamos aislado también unas pocas colonias de otra levadura, que fue posteriormente identificada como *Pichia burtonii* y que resultó ser una excelente productora de pentadieno. *P. burtonii* es una levadura poco conocida como alterante de alimentos, aunque ha sido aislada a partir de cereales y como contaminante de la levadura de panadería; es además una levadura osmotolerante y amilolítica (Barnett y col., 1992). Se realizaron entonces nuevos cultivos de enriquecimiento durante tiempos más prolongados (15 días) y en medios con glucosa o con almidón (y no glucosa) como sustratos carbonados. *P. burtonii* se aisló de nuevo a partir del jarabe de glucosa (materia prima), y además también a partir de las magdalenas (productos final alterado). Sin embargo, ya no pudo aislarse *Z. rouxii* de ninguna de las muestras: dos meses después de producida la alteración, la población de *Z. rouxii* había desaparecido, mientras que *P. burtonii* se mantenía viable.

Por último, se llevaron a cabo estudios de reinoculación de las cepas de *P. burtonii* y *Z. rouxii*, en cultivos puros y mixtos y en distintas proporciones (10, 100 y 1000 ufc/g) en magdalenas no alteradas (elaboradas de forma similar, conservadas con sorbato, y no contaminadas). Satisfactoriamente se reprodujo el efecto de deterioro (olor a petróleo) sólo en los casos en que se inoculó *P. burtonii*, incluso a partir de inóculos iniciales de 10 ufc/g.

### **Conclusiones**

No siempre la población microbiana dominante en un alimento alterado es la responsable del deterioro. La consideración de este hecho es particularmente importante cuando la alteración se debe compuestos microbianos volátiles, como el pentadieno, que son detectables a concentraciones bajas; una concentración baja del compuesto puede ser producida por una población microbiana baja, que puede no ser detectada por los métodos de análisis convencionales, o bien pasar desapercibida, en particular cuando existe una población más abundante de otro microorganismo deteriorante conocido.

*P. burtonii* es una levadura osmotolerante, amilolítica, resistente a conservantes y productora de pentadieno, que debe ser considerada como un nuevo peligro en los sistemas de APPCC de productos con baja o media actividad de agua y conservados con sorbatos.

### **Referencias Bibliográficas**

- Barnett y col., 1990. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press. London.
- Beuchat y col., 1998. J. Food. Mycol., 3: 117-130.
- Casas y col., 1999. Food Technol. Biotechnol., 37: 87-91.
- Casas y col., 2004. Int. J. Food Microbiol., 1: 93-96.
- Esteve-Zarzoso y col., 1999. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 329-337.
- Pinches y Apps, 2007. Int. J. Food Microbiol., 116: 182-185.

DESCRIPCIÓN DE LA CINÉTICA DE DETERIORO DE LA ENSALADA MÍNIMAMENTE PROCESADA

Virto, R., Busca, k., Jover, M. y Gonzalez, C.

Dpto. de Bioprocesos, Centro de Tecnología y Seguridad alimentaria (CNTA-Laboratorio del Ebro), 31570, San Adrián (Navarra), rvirto@cnta.es

INTRODUCCION y OBJETIVOS

Los productos vegetales mínimamente procesados sufren un procesado y manipulación (limpieza, lavado, troceado, descorazonado, pelado, etc..) que no suponen la pérdida de sus “características de fresco”. El procesado mínimo generalmente aumenta la velocidad de los procesos metabólicos que producen deterioro de los productos frescos (Garg et al., 1990; Scandella et al., 1989; Piagentini et al., 2003). El daño físico de los vegetales producido por los procesos de preparación aumenta la respiración y la producción de etileno en los primeros minutos, y existe un aumento asociado de las velocidades de otras reacciones bioquímicas responsables de cambios en el color (pardeamientos), flavor, textura y calidad nutricional (como pérdida de vitaminas). Cuanto mayor sea el procesado del producto mayor es la respuesta de alteración.

Por otro lado la flora dominante de los vegetales son microorganismos del suelo. La flora normal incluye bacterias del género *Erwinia* y *Pseudomonas*, que normalmente tienen ventajas competitivas sobre otros microorganismos que podrían ser peligrosos para los humanos. En estos productos mínimamente procesados, el aumento del daño superficial y la disponibilidad de nutrientes celulares proporcionan las condiciones que aumentan el número y tipos de microorganismos que se desarrollan (Nguyen-the and Carlin, 1994; King and Bolin, 1989). Por todo ello, el objetivo de este estudio fue estudiar los cambios sensoriales y la flora aerobia desarrollada en ensalada mínimamente procesada a diferentes temperaturas y obtener los datos cinéticos que permitan mostrar sus cambios en la calidad y determinar el o los atributos responsables del fin de la vida útil. Estos podrían ser usados para seleccionar el más adecuado iTT (integrador tiempo temperatura) para este producto.

MATERIAL Y METODOS

La ensalada mínimamente procesada se compró en un supermercado local (bolsas de 250 gramos). Las bolsas se almacenaron en distintas cámaras y distintas posiciones de éstas a las siguientes temperaturas: 4,13± 0,25 °C, 4,3±0,29 °C, 5,55±0,23 °C, 8±1 °C, 8,7±0,4 °C, 12±1 °C, 22±1 °C. A cada tiempo de análisis una bolsa se abría y se realizaban los correspondientes análisis sensoriales y microbiológicos. Los análisis microbiológicos (recuento de Aerobios Totales) se realizaron a tras 0, 1, 1,5, 2, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, días de almacenamiento. Los análisis sensoriales se realizaron a día 1, 4 y 7. Los análisis microbiológicos se han realizado utilizando un equipo de microbiología rápida, MicroFoss 128 (MicroFoss 32/128 (Type 78900, Foss Electric).

Al igual que las curvas de crecimiento descritas por Willocx et al., 1994, los recuentos microbianos obtenidos de las ensaladas no se correspondieron con una curva sigmoideal típica del crecimiento microbiano en caldo de cultivo. En estos resultados no se ha observado la fase Lag, y por lo tanto, si los datos experimentales se ajustan con las ecuaciones de Gompertz, Baranyi o logísticas aparecería un valor negativo para la fase lag (Willocx et al., 1995). Por esta razón, se propone el modelo de crecimiento restringido (ecuación 1) para describir la curva de crecimiento de microorganismos aerobios en ensalada mínimamente procesada. Este modelo describe una saturación exponencial hasta alcanzar una población microbiana máxima (Willocx et al., 1995).

$$\text{Log}N = \log Nm + (\text{Log}N_0 - \text{Log}Nm) \exp(-K_c \cdot t) \quad (1)$$

donde:

N= Población microbiana a tiempo t, (CFU/g)

Nm= Máximo recuento microbiano, (CFU/g)

N<sub>0</sub>= Población microbiana inicial, (CFU/g)

K<sub>c</sub>= constante de la velocidad de crecimiento (día<sup>-1</sup>)

T= Tiempo, (días)

Para calcular la constante de la velocidad de crecimiento (k<sub>c</sub>) a cada temperatura se aplicará una regresión lineal a la ecuación anterior y se obtiene la siguiente ecuación 2:

$$\ln \left[ \frac{\text{Log}(N/Nm)}{\text{Log}(N_0/Nm)} \right] = -K_c \cdot t \quad (2)$$

**Dependencia de la constante de velocidad (k) con la temperatura**

Para calcular la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la constante de la velocidad de la reacción, los valores k<sub>c</sub> obtenidos se representan frente a la Temperatura (°C).

### **Dependencia del recuento máximo (Nm) con la temperatura**

Para calcular la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la máxima población microbiana que se alcanza en el producto se han enfrentado y buscado la relación entre los recuentos máximos obtenidos experimentalmente y las temperaturas de almacenamiento.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### *Características sensoriales*

El final de la vida útil de la ensalada, se alcanzó tras 7 días almacenada a 8,7°C, el resto de las muestras (a las diferentes temperaturas) fueron aprobadas por el panel de cata hasta el último día de análisis (día 7).

#### *Calidad microbiológica*

La población de aerobios mesófilas aumentaron desde unos recuentos iniciales de  $5,6 \times 10^5$  UFC/g a  $9,5 \times 10^7$ ;  $2,3 \times 10^8$ ;  $5,8 \times 10^7$ ;  $1,1 \times 10^8$ ;  $1,8 \times 10^8$ ;  $2,5 \times 10^8$  y  $2,9 \times 10^8$  después de 10 días de almacenamiento a 4,13; 4,3; 5,5; 8; 8,7; 12 y 22 °C respectivamente..

Teniendo en cuenta los coeficientes de correlación obtenidos tras el ajuste con el modelo propuesto ( $R^2 > 0,94$ ), éste se puede considerar adecuado para describir el crecimiento de microorganismos aerobios. Una relación lineal se ha observado entre el valor  $k_c$  y la temperatura de almacenamiento (desde 4,13 a 22°C) para el crecimiento de microorganismos aerobios. Del mismo modo, una relación lineal se ha encontrado entre el recuento máximo de microorganismos aerobios mesófilos y la temperatura de almacenamiento del producto.

Por lo tanto, y considerando los resultados descritos para la evaluación sensorial donde ningún atributo limitó la vida útil del producto, puede considerarse al crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos como el parámetro responsable del fin de la vida útil de este alimento.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Jacxsens et al., (2002) para un producto similar, donde los parámetros de calidad limitaron la vida útil del alimento a los 9, 7, 5 y 3 días cuando se almacenaban a 2, 4, 7 y 10 °C respectivamente.

Finalmente la vida útil de la ensalada mínimamente procesada se estimó utilizando el modelo de predicción propuesto en combinación con las dos ecuaciones lineales obtenidas para los parámetros  $k_c$  y  $N_m$ . La ecuación 3 estima la vida útil de la ensalada mínimamente procesada en el rango de temperaturas al que se ha llevado a cabo el estudio (4-22°C).

$$\text{LogUFC}(t) = N_m + (N_0 - N_{\max})e^{-K_c t} \quad (5)$$

donde:

$$N_m = 0,098T + 7,21 \quad \text{Máximo recuento bacteriano (UFC/g)}$$

$$K_c = 0,083T - 0,33 \quad \text{Constante de la velocidad de crecimiento (day}^{-1}\text{)}$$

$T$  = Temperatura (°C)

$N_0$  = Población microbiana inicial, (UFC/g)

$t$  = tiempo, (day)

Por último se ha validado el modelo enfrentando los resultados obtenidos experimentalmente con los estimados por el modelo descrito a distintos días de almacenamiento del producto.

En resumen, la vida útil de la ensalada mínimamente procesada disminuyó con la temperatura desde alrededor de 7,5 días a 5°C a 0,40 días a 9,6 horas a 22°C.

Este resultado demuestra la necesidad de mantener la cadena de frío para este tipo de producto y la importante influencia de los pequeños incrementos en la temperatura.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Garg, N., CHurey, J.J.; Splittsoesser, D.F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. Journal of Food Protection, 53 (8), 701-703.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J. 2002. Temperature dependence of shelf life as affected by microbial proliferation an sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. Postharvest Biology and Technology 26, 59-73.
- King, A.D., Bolin, H.R. 1989. Physiological and microbiological storage and vegetables. Food Technology 43 (2), 132-135/139.
- Nguyen-the, C., Cralin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 34, 371-401.
- Piagentini, A.M., Güemes, D.R., Pirovani, M.E. 2003. Mesophilic aerobic population of fresh-cut spinach as affected by chemical treatment and type of packaging film. Journal of Food Science 68 (2). 602-607.
- Scandella, D., Leteinturier, J. 1989. Le qualité microbiologique, pp. 44-49. En La 4ème Gamme Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes. París, Francia.
- Willocx, F., Tobback, P., Hendricx, M. 1994. Critical remarks on the use of predictive microbiology for minimally processed vegetables. A case study on endive. IIR Symposium New applications of refrigeration to fruit and vegetables processing, June 8-10, Istanbul, Turkey
- Willocx, F., Hendricx, M., Tobback, P. 1995. Kinetic criteria for the evaluation of microbial quality of minimally processed vegetables by product history integrators. Refrigeration and the quality of fresh vegetables. Proceedings of the meetings of Comissions C2, D2/3. IIR, París, Francia, 95-108.

## OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA ENTEROCINA AS-48 A PARTIR DE UN SUSTRATO DERIVADO DEL LACTOSUERO

Ananou<sup>a</sup>, S. Muñoz, A. Gálvez,<sup>c</sup> A. Martínez-Bueno<sup>a</sup>, M. Maqueda<sup>a</sup> M. and Valdivia<sup>a,b</sup> E.

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología., Facultad de Ciencias. Universidad de Granada ([evavm@ugr.es](mailto:evavm@ugr.es))

<sup>b</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada.

<sup>c</sup> Área de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

### 1. Introducción y objetivos

La enterocina AS-48, producida por cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, presenta actividad bactericida sobre la mayoría de las bacterias Gram positivas ensayadas y también sobre ciertas Gram negativas, aunque éstas son mucho menos sensibles (Abriouel *et al.*, 1998; Ananou *et al.*, 2005c). Dentro de este amplio espectro de acción, destaca la sensibilidad que muestran bacterias patógenas transmitidas por alimentos y/o alterantes de los mismos: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Alicyclobacillus* sp. AS-48 se ha ensayado con éxito en el control de *B. cereus* en queso (Muñoz *et al.*, 2004) y alimentos basados en arroz (Grande *et al.*, 2006), de *S. aureus* en salchichón (Ananou *et al.*, 2005b) y queso (Muñoz *et al.*, 2007), de *L. monocytogenes* en salchichón (Ananou *et al.*, 2005a) y alimentos vegetales (Molinos *et al.*, 2005) y frente a diversas bacterias alterantes en zumos de fruta (Ananou *et al.*, 2005c; Grande *et al.*, 2005). Sin embargo para que la aplicación de la enterocina AS-48 sea factible a nivel industrial, es fundamental que ésta se obtenga a partir de un sustrato de grado alimentario y bajo coste. Por ello se ha investigado la potencialidad de diversos subproductos de la industria láctea, lactosuero y derivados, para soportar el crecimiento de la cepa productora y la producción de la enterocina. Una vez encontrado el mejor sustrato para la producción de AS-48, Esprión-300, se ha procedido a estudiar el efecto de diversos parámetros sobre la misma: concentración del sustrato, temperatura de incubación, volumen del inóculo, adición de complementos nutritivos (glucosa, distintas fuentes de nitrógeno sales minerales), condiciones de oxigenación: reposo y agitación y finalmente estabilización del pH a distintos valores.

### 2. Resultados y Discusión

La enterocina AS-48 se produce como metabolito primario en varios medios de cultivo de laboratorio. La primera vez que se investigó su producción se encontró que los máximos rendimientos se obtenían en medio BHI adicionado de glucosa al 1% y el medio complejo (CM) adicionado de glucosa al 1-2% (Gálvez *et al.*, 1986). Los títulos máximos se alcanzaban a las 8 h tras las cuales se producía una importante caída. Recientemente se han mejorado las condiciones de producción en el medio CM modificado (MCM) utilizando un inóculo de alta densidad y manteniendo el pH próximo a 6 mediante adición manual de NaOH. En estas circunstancias se consiguió incrementar el rendimiento desde 21 hasta 52 UA/ml, además de mantener estables los niveles de AS-48 en la posterior incubación (Abriouel *et al.*, 2003). Sin embargo, ni BHI ni CM reúnen las condiciones de ser medios baratos ni de grado alimentario. Por ello se decidió ensayar como sustratos diversos subproductos lácteos, lactosuero y derivados, por cumplir ambos requisitos. Los primeros intentos mostraron que la enterocina se producía en todos ellos, siendo el producto comercial desecado Esprión-300 el que daba mejores rendimientos, con niveles máximos de 15 UA/ml. A continuación se procedió a optimizar la producción de AS-48 en este sustrato variando diversos parámetros: tamaño de inóculo, suplementos nutricionales, estabilización de pH del cultivo a diferentes valores y concentración del sustrato. Ello permitió establecer las siguientes condiciones óptimas para la producción de AS-48 en este medio basado en E-300:

- Incubación a 28 °C
- 8% de inóculo de la cepa productora
- Medio de cultivo conteniendo 5% de E-300 y 1% de glucosa

- pH estabilizado entre 6,55-6,65 mediante adición controlada de NaOH

La elección de un alto inóculo (8%), aunque no influía significativamente en la producción de AS-48, tuvo por objeto minimizar las posibilidades de contaminación de los cultivos, ya que éstos se realizaron con el medio no sometido a ningún tipo de tratamiento térmico.

La concentración de glucosa influyó significativamente en la producción de la enterocina siendo máximos los niveles de actividad en los cultivos con una concentración de glucosa de 1% (30 UA/ml). El aumento de la concentración de glucosa hasta 2 o 3% no produjo ningún efecto en cultivos con pH no controlado.

El control del pH dentro de la neutralidad afecta positivamente el crecimiento de muchas bacterias del ácido láctico, entre ellas los enterococos, y por ello se puede esperar que en estos casos mejore la producción de las bacteriocinas. En nuestro caso AS-48 se produjo óptimamente a pH 6,55-6,65 (8% de inóculo, 1% glucosa y 6% de E-300). El aumento adicional de enterocina, respecto a los cultivos sin control de pH, se produjo en el intervalo de tiempo de 18 a 24h alcanzándose niveles de 160 UA/ml. Tales niveles máximos, además, permanecen prácticamente estables al menos hasta las 24 h, lo que es una ventaja adicional pues da un margen de recogida y procesado mucho más amplio.

La concentración de E-300 (0, 3, 4, 5 y 6%) influyó en la producción de AS-48 en los cultivos con pH controlado en 6,55 y con 1% de glucosa, siendo máximos los niveles de actividad con una concentración de 5% de E-300 (360 UA/ml a 18-20 h). En estas condiciones, la adición de 2 o 3% de glucosa tuvo un efecto negativo sobre la producción de AS-48. El efecto de la glucosa, y de los azúcares en general, sobre la producción de las bacteriocinas es un problema complejo, que quizás esté relacionado y regulado por la disponibilidad no solo de energía sino también de otros nutrientes tales como aminoácidos esenciales que pueden hacerse limitantes cuando la concentración de fuente de carbono aumenta.

La adición de fuentes nitrogenadas, peptona de soja o de carne, o sales minerales, de magnesio y potasio, no tuvo efecto sobre la producción. Además, tanto la temperatura de incubación (37°C) como las condiciones de oxigenación no tuvieron un efecto significativo sobre la producción de AS-48, si bien, debido a la necesidad de distribuir homogéneamente la sosa añadida, los cultivos se realizan en agitación.

### **3. Conclusiones**

Se ha conseguido la producción de AS-48 a partir de un sustrato derivado del lactosuero, Esprión 300, de grado alimentario y de coste económico, 1,53 €/Kg E-300 *versus* 140 €/Kg BHI.

Se han establecido las condiciones óptimas de producción de la enterocina AS-48 en este sustrato: temperatura de incubación de 28 °C, inóculo de la cepa productora al 8%, E-300 al 5%, glucosa al 1% y pH estabilizado a 6,55; siendo los dos últimos los parámetros clave.

### **Referencias Bibliográficas:**

- Abriouel *et al.*, 1998. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4623-4626.
- Abriouel *et al.*, 2003. *Journal of Microbiol Methods* 55, 599-605.
- Ananou *et al.*, 2005a. *International Journal of Food Microbiology* 103, 179-190.
- Ananou *et al.*, 2005c. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1364-1372.
- Ananou *et al.*, 2005b. *Meat Science* 71, 549-556.
- Gálvez *et al.*, 1986. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 765-771.
- Grande *et al.*, 2005. *International Journal of Food Microbiology* 104, 289-297.
- Grande *et al.*, 2006. *International Journal of Food Microbiology* 106, 185-194.
- Molinos *et al.*, 2005. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7781-7787.
- Muñoz *et al.*, 2004. *Journal of Food Protection* 67, 1517-1521.
- Muñoz *et al.*, 2007. *International Dairy Journal* 17, 760-769.

## EECTO ANTIBACTERIANO DE LA ENTEROCINA AS-48 EN PRODUCTOS DE PASTERERÍA

**Martínez Viedma P.<sup>1</sup>, Abriouel H.<sup>1</sup>, Ben Omar N.<sup>1</sup>, Valdivia E.<sup>2</sup>, Lucas López R.<sup>1</sup>, Martínez Cañamero, M.<sup>1</sup>, y Gálvez A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Ciencias de la Salud, Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén. Campus las Lagunillas, 23071, Jaén, agalvez@ujaen.es

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, 18071, Granada

### - Introducción y Objetivos

La industria alimentaria debe hacer frente a las nuevas demandas de los consumidores por alimentos con menos aditivos, conservados de forma natural, y listos para consumo. También debe resolver los retos que plantea la globalización del mercado, los nuevos métodos de distribución de alimentos, y la comercialización de nuevos productos con un valor añadido para el consumidor. La bioconservación de los alimentos se basa en el empleo de microorganismos o sus productos naturales para controlar el desarrollo de microorganismos perjudiciales. La enterocina AS-48 es un péptido antimicrobiano de gran interés para la bioconservación de alimentos (Gálvez et al., 1989; Maqueda et al., 2004). Esta bacteriocina está siendo ensayada actualmente frente a diferentes tipos de microorganismos patógenos o alterantes en alimentos cárnicos, lácteos, vegetales, así como en zumos y bebidas (Muñoz et al., 2004; Ananou et al., 2005; Cobo Molinos et al., 2005; Grande et al., 2006, 2007a,b). El objeto del presente estudio ha sido determinar la eficacia de esta bacteriocina frente a bacterias potencialmente patógenas o productoras de intoxicaciones alimentarias en materias primas y productos de pastelería.

### - Material y Métodos

La enterocina AS-48 fue ensayada frente a *Staphylococcus aureus* en diferentes tipos de materias primas de origen vegetal empleadas en productos de pastelería. A fin de potenciar la actividad de la bacteriocina, se ensayaron tratamientos combinados con lactato, sorbato, benzoato, delta gluconolactona, eugenol, 2-nitropropanol, y nisaplina. También se realizaron ensayos en diferentes tipos de postres (gelatina, natillas, natillas de soja, postres de soja, y postres de soja con frutas) frente a ésta y otras bacterias (*Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*). Las muestras fueron almacenadas a temperaturas de 10 y 22 °C. Tras el tratamiento con bacteriocina, se determinó la concentración de células viables mediante recuento en medios selectivos (agar VJ para *S. aureus*, agar PALCAM con suplemento para *L. monocytogenes*, y agar MYP para *B. cereus*). Se realizó un análisis estadístico para establecer el grado de significación de las diferencias obtenidas entre las muestras control y las tratadas.

### - Resultados y Discusión

La adición de enterocina AS-48 (a una concentración final de 50 µg/ml) redujo los niveles de *S. aureus* en crema pastelera, crema de cacahuete, crema de almendras, cabello de ángel, y caramelo líquido, pero no en crema de vainilla, crema de chocolate o chocolate líquido. En este último, la actividad frente a *S. aureus* se vio potenciada en los tratamientos combinados con eugenol, 2-nitropropanol, y nisaplina, pero no con lactato, sorbato, benzoato, o delta gluconolactona. En gelatina, natillas instantáneas, natillas de soja, postre de soja y postre de soja con frutas, la adición de AS-48 (50 µg/ml) redujo la concentración inicial de *S. aureus* (5.5 unidades log.) en 1 o 2 unidades logarítmicas, dependiendo de las condiciones de incubación de las muestras. El efecto bactericida incrementó cuando se emplearon concentraciones inferiores de inóculo, provocando una completa inactivación de los estafilococos para inóculos inferiores a 4 unidades log. por gramo de alimento.

En los ensayos realizados frente a *L. monocytogenes*, la adición de bacteriocina (25 µg/g) redujo de forma inmediata la concentración de listerias viables por debajo del límite de detección en gelatina, natillas instantáneas y natillas de soja, mientras que en postre de soja y postre de soja con frutas tuvo un efecto más lento, alcanzándose una completa inactivación a las 24 y 48 h respectivamente. En el caso de *B. cereus*, concentraciones de bacteriocina comprendidas entre 25 y 50 µg/g redujeron la concentración de células viables por debajo del límite de detección en gelatina,

natillas instantáneas, y natillas de soja en un intervalo de 24-48 h, dependiendo del tipo de alimento. En gelatina, la adición de bacteriocina inhibió además la licuación del alimento provocada por la actividad proteolítica de *B. cereus*.

#### **- Conclusiones**

Los resultados de este estudio indican que la eficacia de la enterocina AS-48 frente a *S. aureus* en productos de pastelería está marcadamente influenciada por el tipo de sustrato y la densidad de contaminación por la bacteria. Es posible potenciar el efecto bactericida de la bacteriocina mediante tratamiento combinado con otros antimicrobianos como eugenol, 2-nitropropanol o nisaplina. Comparativamente, la bacteriocina muestra una mayor eficacia frente a *L. monocytogenes* y *B. cereus*, permitiendo su completa inactivación en los diversos tipos de postres ensayados.

#### **- Referencias Bibliográficas**

- Ananou et al., 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 179-90.  
Cobo Molinos et al., 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7781-7787.  
Gálvez et al., 1989. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 437-441.  
Grande et al., 2006. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 185-94.  
Grande et al., 2007a. *J. Food Prot.* 70:405-411.  
Grande et al., 2007b. *J. Food Prot.* 70:2339-2345.  
Maqueda et al., 2004. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 399-416.  
Martínez Viedma et al., 2007. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1143-1151.  
Muñoz et al., 2004. *J. Food Prot.* 67, 1517-1521.

#### **-Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL2005-07665-C02-02/ALI).

**EFICACIA DE LA ENTEROCINA AS-48 SOLA Y EN TRATAMIENTOS COMBINADOS FRENTE A LISTERIA MONOCYTOGENES EN ENSALADILLAS**

**Cobo Molinos A.<sup>1</sup>, Abriouel H.<sup>1</sup>, Lucas López R.<sup>1</sup>, Valdivia E.<sup>2</sup>, Ben Omar N.<sup>1</sup>, y Gálvez A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Ciencias de la Salud, Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén. Campus las Lagunillas, 23071, Jaén, agalvez@ujaen.es

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, 18071, Granada

**- Introducción y Objetivos**

El consumo de alimentos preparados listos para consumo es una de las principales causas de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias, incluyendo las provocadas por *Listeria monocytogenes* (Gambas et al., 2003; Lianou y Sofos, 2007). En adición al uso de buenas prácticas durante la elaboración y distribución de este tipo de alimentos, es recomendable emplear barreras adicionales, como podría ser las bacteriocinas, para disminuir el riesgo potencial de transmisión de microorganismos patógenos o productores de toxinas. La enterocina AS-48 es un péptido antimicrobiano de gran interés para la bioconservación de alimentos (Gálvez et al., 1989; Maqueda et al., 2004). Esta bacteriocina está siendo ensayada actualmente frente a diferentes tipos de microorganismos patógenos o alterantes en alimentos cárnicos, lácteos, vegetales, así como en zumos y bebidas (Muñoz et al., 2004; Ananou et al., 2005; Cobo Molinos et al., 2005; Grande et al., 2006, 2007a,b). Dado que la efectividad de ésta y otras bacteriocinas viene marcadamente determinada por el tipo de microorganismo diana así como por diversos factores externos relacionados en su mayoría con la matriz alimentaria (Gálvez et al., 2007), el desarrollo de aplicaciones específicas requiere ensayos previos en el alimento a que van dirigidas. El objeto de este estudio ha sido determinar la eficacia de AS-48 frente a *L. monocytogenes* en ensaladilla y detectar actividad sinérgica con otros compuestos antimicrobianos.

**- Material y Métodos**

La enterocina AS-48 fue ensayada en ensaladilla rusa previamente inoculada con *L. monocytogenes* CECT 4032, a concentraciones de bacteriocina de 20 a 60 µg/g. Las muestras fueron almacenadas a 10 °C durante una semana. El recuento de células viables de *L. monocytogenes* se llevó a cabo en agar PALCAM con suplemento, así como mediante PCR en tiempo real. A fin de potenciar la actividad antilisteria, se realizaron tratamientos combinados consistentes en la adición conjunta de AS-48 (30 µg/g) con diferentes compuestos antimicrobianos, incluyendo aceites esenciales, sus componentes activos, compuestos de síntesis, y conservantes autorizados. Las muestras tratadas fueron almacenadas a 10 °C, realizándose recuentos a 0 y 24 h. Se realizó un análisis estadístico para establecer el grado de significación de las diferencias obtenidas entre las muestras control y las tratadas.

**- Resultados y Discusión**

En ensaladilla rusa, la concentración mínima de bacteriocina que permitió obtener una reducción significativa en los recuentos de listeria durante todo el periodo de almacenamiento fue de 30 µg/g. A 40 µg/g se obtuvo una reducción inicial en la población de listerias de 2 unidades log seguida de un descenso progresivo durante la posterior incubación, no detectándose listerias viables al séptimo día. Una concentración de bacteriocina superior (60 µg/g) provocó una reducción mucho mayor (4.2 unidades log). Durante el periodo de almacenamiento de las muestras así tratadas, tan sólo se detectaron algunas células viables de *L. monocytogenes* a las 24 h.

A fin de incrementar el efecto bactericida y reducir la concentración de bacteriocina, se aplicaron tratamientos combinados de AS-48 junto con diferentes compuestos antimicrobianos. La actividad de la bacteriocina se vio fuertemente potenciada en combinación con diferentes aceites esenciales (tomillo verbena, tomillo timol, tomillo carrasqueño, ajowan, árbol de te, clavo, romero, y salvia) así como con diversos componentes activos encontrados en los aceites esenciales, y otros compuestos antimicrobianos naturales o sintéticos (carvacrol, eugenol, timol, terpineol, ácidos cafeico, ferúlico, e hidrocínámico, geranil butirato, geranil fenil acetato, pirocatecol, tert butil

hidroquinona, tirosol, hidroxitirosol, vanílico, luteolina, oleuropeina, disodio fenil fosfato). También se detectó actividad sinérgica con conservantes autorizados como ácidos cítrico y láctico, ésteres de palmitato y estearato de sacarosa, p-hidroxibenzoico, y nisina. De entre todos los tratamientos combinados ensayados, los más efectivos fueron los que incluían aceites esenciales, permitiendo una completa inactivación de *L. monocytogenes* en el alimento.

#### **- Conclusiones**

Los resultados de este estudio indican que la adición de enterocina AS-48 a elevadas concentraciones permite inactivar a *L. monocytogenes* en ensaladillas listas para consumo. Las potentes sinergias detectadas con aceites esenciales y diversos compuestos antimicrobianos permiten desarrollar tratamientos combinados para la eliminación de *L. monocytogenes* en ensaladilla, disminuyendo la concentración de bacteriocina necesaria y atenuando el impacto de los agentes antimicrobianos sobre las propiedades organolépticas del alimento tratado.

#### **- Referencias Bibliográficas**

- Ananou et al., 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 179-90.  
Cobo Molinos et al., 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7781-7787.  
Gálvez et al., 1989. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 437-441.  
Gambas et al., 2003. *J. Food Prot.* 66, 559-569.  
Grande et al., 2006. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 185-94.  
Grande et al., 2007a. *J. Food Prot.* 70:405-411.  
Grande et al., 2007b. *J. Food Prot.* 70:2339-2345.  
Gálvez et al., 2007. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51-50.  
Lianou y Sofos, 2007. *J. Food Prot.* 70:2172-2198.  
Maqueda et al., 2004. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 399-416.  
Martínez Viedma et al., 2007. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1143-1151.  
Muñoz et al., 2004. *J. Food Prot.* 67, 1517-1521.

#### **-Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL2005-07665-C02-02/ALI).

## CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS RESPONSABLES DE FALLOS TECNOLÓGICOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.

Fernández M., Martínez N., Martínez B., Álvarez M. A.

Dpto. Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Ctra. de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. [noeliam@ipla.csic.es](mailto:noeliam@ipla.csic.es)

### Introducción y Objetivos

El éxito de las fermentaciones lácticas industriales depende del desarrollo de los microorganismos que constituyen el cultivo iniciador. El retraso o la inhibición del crecimiento de las bacterias del ácido láctico (BAL) que lo integran, deriva en la obtención de productos defectuosos, lo que conlleva grandes pérdidas económicas. Aunque la causa más frecuente de retrasos en las acidificaciones es la infección por bacteriófagos, la presencia de inhibidores como las bacteriocinas se ha relacionado también con fallos tecnológicos.

Las bacteriocinas son compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica [5]. La producción de bacteriocinas parece ser un mecanismo dirigido a la competición con otras bacterias que presentan el mismo nicho ecológico. En los últimos años se han descrito numerosas bacteriocinas tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Especial interés han tenido las bacteriocinas producidas por BAL puesto que pueden ser utilizadas como conservantes naturales, inhibiendo el desarrollo de bacterias alterantes y/o patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* [3,7,9]. Se han aislado bacteriocinas en diferentes especies y géneros de BAL, así como, a partir de diversos habitats, incluyendo productos lácteos, vegetales fermentados, carnes e incluso bacterias del tracto gastrointestinal de humanos y animales [4].

En este trabajo se estudia el efecto que la exclusión competitiva asociada a la actividad de las bacteriocinas, puede tener sobre los cultivos iniciadores y sobre el desarrollo de las fermentaciones lácticas industriales. A partir de yogures en los que se había producido un retraso en la acidificación, se aislaron e identificaron 6 cepas productoras de bacteriocinas, las cuales fueron caracterizadas, comprobándose que la que tenía un mayor espectro de inhibición no había sido previamente descrita.

### Material y Métodos

Para la detección de bacteriocinas se empleó la técnica de la doble capa [8], utilizando como indicadores distintas cepas de *Streptococcus thermophilus* empleadas como iniciadores en la fabricación de yogur.

Los sobrenadantes de las cepas productoras se sometieron a distintos tratamientos con el fin de caracterizar las actividades antimicrobianas: estabilidad a distintos pH (pH2-pH9), estabilidad térmica (60-100°C), sensibilidad a proteasas (proteínasa K, pronasa E, tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina,  $\alpha$ -amilasa y catalasa). Antes y después de los tratamientos se valoró la actividad inhibitoria de los sobrenadantes mediante el test de difusión en agar [8]. El modo de acción se estudió siguiendo el protocolo descrito por Boris *et al.*, [2].

Para la purificación de las bacteriocinas se precipitó con cloroformo el sobrenadante de un cultivo libre de células. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 100 ml de Tris HCl 20 mM pH 7.5, se aplicaron a una columna QFF de interacción aniónica y se eluyó con Tris HCl 20 mM pH 7.5 1 M NaCl realizando un gradiente escalonado (0, 0.2, 0.4, 1.0 M de NaCl). Las fracciones activas se reunieron y se añadió NaCl hasta tener una concentración 4 M. Esta fracción se aplicó a una columna HP de interacción hidrofóbica y tras el lavado se sometió un gradiente escalonado de NaCl (4, 3, 2, 1 y 0 M). Las fracciones activas se reunieron.

El extremo N-terminal de la bacteriocina purificada se secuenció por degradación de Edman.

Para determinar el peso molecular, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli [6]. Para detectar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de Bhunia *et al.*, [1].

### Resultados y Discusión

Se analizaron 300 muestras procedentes de fermentaciones lácticas industriales en las que se había producido un retraso en la acidificación. En seis de estas muestras se aislaron cepas productoras de bacteriocinas que eran capaces de inhibir el desarrollo tanto de *S. thermophilus* como de *Lactobacillus delbruecki*, los dos componentes del fermento del yogur. Paralelamente se comprobó la ausencia de bacteriófagos. Además, se pudo comprobar que dos de las bacteriocinas (Y1 e Y4) eran capaces de inhibir el desarrollo de las cepas iniciadoras que habían sido utilizadas en las

fermentaciones fallidas de las cuales se habían aislado. Por tanto, el retraso observado en la acidificación se debería a la acción de las bacteriocinas sobre el cultivo iniciador.

Respecto al espectro de inhibición, Y1 e Y4 eran activas frente a 42 cepas de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* ensayadas, con las que compartirían nicho ecológico. En cambio, fueron inactivas frente a otras especies de *Lactobacillus* (*acidophilus*, *buchneri*, *fermentum*, *salivarius*, *casei* y *brevis*). Y1 era activa también frente a *Streptococcus agalactiae*. Su acción sobre otros géneros de BAL variaba mucho de unas bacteriocinas a otras, siendo Y1 la que presentaba un espectro de inhibición más amplio. En ningún caso se observó actividad frente a los microorganismos alterantes y patógenos más frecuentes en productos lácteos.

Mediante secuenciación del ARNr 16S se identificaron las cepas productoras como: *Enterococcus faecalis* (2; Lb1), *Leuconostoc garlicum* (Lb3), *S. thermophilus* (2; Y1 e Y4) y *Lactobacillus fermentum* (F8). La caracterización preliminar de las bacteriocinas producidas indicaba que eran activas en un amplio rango de pH (2-9). Todas las bacteriocinas fueron inhibidas por alguno de los agentes proteolíticos ensayados, demostrando así su naturaleza proteica. Es destacable señalar que la bacteriocina Y1 fue la única inhibida por todos los agentes ensayados, mientras que Lb3 y F8 sólo lo fueron por  $\alpha$ -quimiotripsina. Por último, sólo las bacteriocinas de las cepas de *S. thermophilus* resultaron ser termorresistentes, aunque en el caso de Y4 su actividad disminuyó a la mitad tras el hervido. Las otras cuatro bacteriocinas perdieron su actividad tras 10 minutos a 60° C.

Se caracterizó con más detalle la bacteriocina Y1 por presentar un mayor espectro de inhibición. La máxima actividad se observó al inicio de la fase estacionaria y una vez que las células alcanzan esta fase, la actividad se mantiene estable en los sobrenadantes durante al menos 48 horas, ejerciendo un efecto bactericida sobre las cepas sensibles.

La síntesis de Y1 requiere un número mínimo de células en el inoculo inicial, por lo que su inducción podría responder a un mecanismo de "quorum sensing"

La bacteriocina Y1 se ha purificado a homogeneidad resultando ser un péptido con un tamaño aproximado de 3 KDa. El análisis de la secuencia aminoacídica de su extremo amino terminal indica que se trata de una nueva bacteriocina, puesto que no presenta homología con ninguna de las depositadas hasta el momento en las bases de datos.

### Conclusiones

- A partir de fabricaciones fallidas de yogur se han aislado seis cepas productoras de bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*. Mediante secuenciación del ARNr 16S se identificaron las cepas productoras como *E. faecalis* (Lb1), *Le. garlicum* (Lb3), *S. thermophilus* (Y1 e Y4) y *L. fermentum* (F8).
- Todas las bacteriocinas eran activas en un amplio rango de pH (2-9) y fueron inhibidas por alguno de los agentes proteolíticos ensayados, demostrando así su naturaleza proteica.
- Sólo las bacteriocinas producidas por las cepas de *S. thermophilus* (Y1 e Y4), resultaron termorresistentes
- Y1, que mostró un mayor espectro de inhibición, se ha purificado a homogeneidad, resultando ser un péptido con un tamaño aproximado de 3 KDa. El análisis de la secuencia aminoacídica del extremo amino terminal indica que se trata de una nueva bacteriocina.

### Referencias bibliográficas

1. Bhunia A.K., Johnson M.C., Ray B (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J Appl Bacteriol 65:261-268
2. Boris S, Jiménez-Díaz R, Caso JL, Barbés C (2001) Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. J Appl Microbiol 91:328-333.
3. Bredholt S, Nesbakken T, Holck A (2001) Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. Int J Food Microbiol 66:191-196
4. Kang JH, Lee MS (2005) Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. J Appl Microbiol 98:1169-1176
5. Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 12:39-85
6. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
7. McAuliffe O, Hill C, Ross RP (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. J Appl Microbiol 86:251-256
8. Schillinger U, Lücke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. Appl Environ Microbiol 55:1901-1906
9. Stiles, ME (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 70:331-345

## EFFECT OF A BACTERIOCIN PRODUCED BY *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* IN SPANISH DRY FERMENTED SAUSAGES AND FRANKFURTERS

Reguera-Useros J.I.<sup>1</sup>, Nieto-Lozano J.C.<sup>1</sup>, Sacristán-Pérez-Minayo G.<sup>1</sup> y Peláez-Martínez M.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Pza Misael Bañuelos s/n, E-09001 Burgos, Spain, jiru@ubu.es

<sup>2</sup>Instituto del Frío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ciudad Universitaria s/n, E-28040 Madrid, Spain

### Introduction and Objectives

The aim of this study is to study the inhibitory effect of a *Pedococcus acidilactici* bacteriocin-producer strain and a bacteriocin, characterized and amino acid sequenced by us (1, 2), and produced by *P. acidilactici* (a starter culture used in the meat industry in Spain), against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* by *in situ* assays (in Spanish dry fermented sausages and frankfurters), with the purpose of evaluating its potential use as a biopreservative.

### Materials and Methods

Two bacterial strains of *P. acidilactici* were used, one bacteriocinogenic strain (3) obtained from Chr. Hansen Laboratories (Denmark) and another non-bacteriocinogenic strain (Roger), isolated from commercial starter cultures for meat products. *L. monocytogenes* CECT 4031 and *C. perfringens* CECT 376 were used as indicator strains, obtained from the Spanish Type Culture Collection (Valencia, Spain). These strains were grown as reported by Nieto-Lozano et al. (4).

Pork minced meat and bacteriocin-producer *P. acidilactici* culture ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) were added, mixing for 1 min at 4 °C in dry fermented sausages samples. Later, *L. monocytogenes* CECT4031 ( $10^5$  CFU/ml) was vacuum added and mixed for 10 min to get a homogeneous mixture. Subsequently, this mixture was vacuum stuffed at 4 °C. Stuffed samples were stored for 24 h at 0 °C. Stuffed products heating was carried out at two stages. At first stage they were maintained at 20 °C and 94% RH (relative humidity) for 24 h and at second stage at 20 °C and 90% RH for 24 h. pH and Aw were dropped from 5.7 to 5.2 and from 0.96 to 0.94, respectively. After, the samples were stored at 18 °C and 80% RH for 7 d and later at 15 °C and 70% RH for 3 weeks.

Samples were analysed daily till 30 d of the drying process. pH analysis was performed with a Crison pH-meter (Spain). Product humidity was analysed from 5 g dried samples. After preparation, lactic acid determination was carried out from 5 g samples using the Boehringer kit (Boehringer-Mannheim, Germany) also.

The frankfurter was stuffed in cellulose gut and then it was cooked in a steam oven until the inside sample temperature raised 69 °C. After cooking, the frankfurters were maintained into the same oven, so the frankfurter temperature dropped under 15 °C in 30 min. Once sausages were peeled, they were vacuum packed and pasteurized in polyethylene-polyamide bags with water at 96 °C until it raise a centre product temperature of 80 °C. Then the sausages were cooled and stored at 5 °C.

Active, filtered and concentrated supernatant of the bacteriocin-producer *P. acidilactici* strain was obtained and characterized as a previously studies were reported (4). It was diluted separately until adequate concentrations. These dilutions with 5000 BU (bacteriocin units)/ml activity were used to submerge the frankfurters. After, frankfurters were vertically put in a sterile Erlenmeyer flask with a sterilized paper filter to eliminate the liquid excess.

Then, samples with *L. monocytogenes* were stored at 4 °C for 60 d and at 15 °C for 30 d, as well as samples inoculated with *C. perfringens* at 10 °C for 60 d and at 15 °C for 30 d. Samples were analysed during the storage. Control samples were carried out with the supernatant of the non bacteriocin-producer *P. acidilactici* strain.

Serial 10-fold dilutions were spread-plated on Palcam agar (Oxoid) for enumeration of *L. monocytogenes* (37 °C for 48 h under microaerophilic conditions), and on MRS agar for enumeration

of *P. acidilactici* (30 °C for 16-18 h under microaerophilic conditions). Identification of *P. acidilactici* was performed by a morphological study, Gram stain, colonies observation, and the API 50 CHL system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) of bacteriocin-producer *Pediococcus acidilactici* strain. Identification of *L. monocytogenes* was carried out by the API *Listeria* system (bioMérieux). Serial 10-fold dilutions were pour-plated on SPS agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for enumeration of *C. perfringens* (37 °C for 48 h under anaerobic conditions). Identification of *C. perfringens* was performed through the 32A ATB system and the ATB plus system (bioMérieux).

## Results and Discussion

*P. acidilactici* counts, after 30 days in the treatment with the bacteriocin-producer *P. acidilactici* strain inoculated in dry fermented sausages, were  $6 \times 10^6$  CFU/g and the counts of *L. monocytogenes* were reduced by 2 log cycles ( $2 \times 10^3$  CFU/g) with regard to the control assays ( $7 \times 10^3$  CFU/g). The changes of pH were similar compared to the control assays. There was no difference in the obtained RH results between bacteriocin-producer strain assays regarding with control assays (38%). Neither was it any difference in the lactic acid determination values between both assays. From our results we observed the inhibitory effect with the bacteriocin-producing strain and bacteriocin against *L. monocytogenes*.

After 60 days of storage at 4 °C the treatment with 5000 BU/ml of the bacteriocin on frankfurters caused an inhibitory effect against *L. monocytogenes*. After 60 days the counts of this indicator strain were  $8 \times 10^5$  CFU/g in control samples while the counts were reduced to  $8 \times 10^3$  CFU/g in treated samples. After 30 days this inhibitory effect was only of 0.6 log cycles in samples stored at 15 °C.

The counts of *C. perfringens* were reduced by 2 log cycles in the bacteriocin-treated frankfurters after storage at 10 °C during 60 days, and a small (only of 0.8 log cycles) inhibitory effect was observed in samples stored at 15 °C after 30 days.

## Conclusion

In conclusion, the use of the bacteriocin and the bacteriocin-producer strain of *P. acidilactici* in frankfurters and Spanish dry fermented sausages respectively caused an inhibitory effect against *L. monocytogenes* and *C. perfringens*, contributes to improve the sanitary quality and safety of these products and they are a potential alternative to chemical preservatives.

## References

1. Reguera JI, Nieto JC, Segura V, Sacristán G, Hardisson A (2003) Starter cultures, bacteriocins and probiotic bacteria in meat and meat products. In: Barredo JL (ed) Microorganisms for health care, food and enzyme production. Research Signpost, India, pp. 129-141
2. Nieto-Lozano JC, Nissen-Meyer J, Sletten K, Peláez C, Nes IF (1992) Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Gen Microbiol* 138:1985–1990
3. Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Peláez-Martínez MC, Hardisson de la Torre A (2002) Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Sci* 62:237-243
4. Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Peláez-Martínez MC, Hardisson de la Torre A (2006) Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Sci* 72:57-61

## DIVERSIDAD GENÉTICA DE BIFIDOBACTERIAS AISLADAS DE HECES DE LACTANTES

Medina M., Bravo D., Peirotén A., Rodríguez R. y Rodríguez E.

Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA. Ctra. de La Coruña Km 7, 28040 Madrid. mmedina@inia.es

### Introducción y Objetivos

El género *Bifidobacterium* representa un 75-90% de la microbiota cultivable del tracto gastrointestinal de los bebés (Bennet and Nord, 1987) y se considera de gran importancia durante las primeras etapas de la infancia (Tannock, 1994; Chierici et al. 2003). Las especies identificadas con más frecuencia en bebés son *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* (Matsuki et al. 1999; Chierici et al. 2003). Posteriormente, *B. infantis* y *B. breve* son reemplazados por *B. adolescentis* y *B. longum* (Matsuki et al. 1999). Las heces de bebés lactantes son en ocasiones empleadas como fuente para la obtención de nuevas cepas de bifidobacterias probióticas. En la selección de cepas para la elaboración de alimentos probióticos se aborda el estudio de sus propiedades probióticas, tecnológicas, de seguridad y también es fundamental llevar a cabo la identificación precisa de los aislados.

El objetivo de este trabajo es identificar distintos aislados de bifidobacterias procedentes de heces de bebés lactantes y analizar su diversidad genética mediante PFGE.

### Material y Métodos

**Microorganismos.** Se estudiaron 29 aislados obtenidos a partir de heces de 12 lactantes. Dichos aislados, pertenecientes a la colección de microorganismos del Dpto. de Tecnología de Alimentos del INIA, inicialmente se identificaron como bifidobacterias por su morfología.

**Identificación a nivel de especie mediante PCR.** Se realizó a partir de soluciones de ADN obtenidas de dos colonias de cada aislado que se mantuvieron a -20°C. Los cebadores especie-específicos empleados fueron los descritos por Matsuki et al. (1999) para la identificación de *Bifidobacterium* sp. (BIF 164 y BIF 662), *B. breve* (BIBRE 1 y BIBRE 2), *B. longum* (BILON 1 y BILON 2), *B. infantis* (BIINF 1 y BIINF 2), *B. catenulatum* (BICAT 1 y BICAT 2), *B. adolescentis* (BIADO 1 y BIADO 2) y *B. bifidum* (BIBIF 1 y BIBIF 2). Las reacciones de PCR se realizaron con las condiciones descritas por los autores en un termociclador Gene ATAQ Controller. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron tras su tinción con bromuro de etidio.

**Identificación por FAFLP.** Se enviaron a la Universidad de Gante (BCCM/LMG Bacterial Collection, Laboratorium Voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, Bélgica) un total de 7 aislados para su identificación mediante FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism).

**Diferenciación mediante PFGE.** Los aislados se cultivaron en MRS con cisteína durante 24 h en anaerobiosis a 37°C. El pellet obtenido tras centrifugar 2 ml del cultivo se resuspendió en tampón (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.6). A 160 µl de cada suspensión celular se añadieron 40 µl de lisozima (100 mg/ml), 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 160 µl de agarosa 1.6% en SDS 0.1%. Las células embebidas se lisaron durante 90 min/55°C en tampón de lisis (EDTA 0.5 M, sarcosina 1%, lisozima 4 mg/ml y mutanolisina 200 u/ml, pH 9). Se realizó una segunda lisis durante 60 min/55°C en 1.5 ml de tampón de lisis con proteinasa K (0.5 mg/ml). Finalmente, los bloques de agarosa se lavaron en agua destilada y tampón (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6). La digestión se efectuó con *SpeI* (30 U) ó *XbaI* (30 U) durante 2 h/37°C. La electroforesis en campos pulsados se realizó en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM, pH 8), empleando un CHEF DR II (Bio-Rad). Las condiciones de electroforesis fueron: pulso inicial 0.19 seg; pulso final 35.38 seg; tiempo 13.9 h; potencial 6 V/cm y 14°C. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando un Gel Doc 2000. La similitud de los patrones se estableció a partir del coeficiente de correlación Dice, utilizando el programa Diversity Database.

### Resultados y Discusión

Los resultados se recogen en la Tabla 1. Se confirmó la identificación previa de los 29 aislados como pertenecientes al género *Bifidobacterium* con los cebadores BIF 164 y BIF 662. A nivel de especie, se identificaron un total de 20 aislados con los cebadores especie-específicos de *B. breve* (12 aislados), *B. longum* (3), *B. adolescentis* (2), *B. bifidum* (2) y *B. catenulatum* (1). Nueve aislados

no pudieron ser caracterizados. De los 7 aislados identificados por FAFLP, *Bifidobacterium* sp. PRO 2 y *B. breve* PRO 120 se adscribieron a *B. pseudolongum*, *Bifidobacterium* sp. PRO 9 a *B. bifidum*, *Bifidobacterium* sp. PRO 405 y PRO 407 a *B. dentium* y *B. catenulatum* PRO 435 y *Bifidobacterium* sp. PRO 467 a *B. pseudocatenulatum*.

El tipado molecular mediante PFGE de los 29 aislados dio lugar a 20 pulsotipos distintos con la enzima *SpeI*, indicando una importante diversidad. Los pulsotipos mayoritarios fueron P1 que reúne aislados de distintos orígenes y especies y P3, detectado en 4 aislados de *B. breve* procedentes del mismo lactante, lo que apunta a la presencia mayoritaria de dicha cepa en su microbiota intestinal. Los 12 aislados agrupados en los pulsotipos más frecuentes P1, P2, P3 y P4 con la enzima *SpeI* se ensayaron con la enzima *XbaI* y se observaron 6 pulsotipos electroforéticos. Tres de los 4 aislados P1 de tres lactantes distintos mostraron el mismo patrón con *XbaI*, los dos P2, pertenecientes a distinta especie, también fueron distintos con *XbaI*, mientras que todas las bifidobacterias P3 presentaron el mismo pulsotipo D y las P4 el mismo pulsotipo E con *XbaI*. La resolución con esta enzima necesita ser mejorada.

Tabla 1. Identificación mediante PCR y FAFLP y pulsotipos obtenidos mediante PFGE de 29 aislados de bifidobacterias procedentes de heces de lactantes

Aislado	Origen*	Especie	Pulsotipo		Aislado	Origen*	Especie	Pulsotipo	
			<i>SpeI</i>	<i>XbaI</i>				<i>SpeI</i>	<i>XbaI</i>
PRO 19	1	<i>B. breve</i>	P1	A	PRO 468	7	<i>B. longum</i>	P1	F
PRO 18	1	<i>B. breve</i>	P9	-	PRO 471	7	<i>B. longum</i>	P19	-
PRO 12	1	<i>B. breve</i>	P10	-	PRO 467	7	<i>B. pseudocatenulatum</i>	P20	-
PRO 29	2	<i>B. adolescentis</i>	P2	B	PRO 2	7	<i>B. pseudolongum</i>	P5	-
PRO 54	2	<i>B. bifidum</i>	P2	C	PRO 9	7	<i>B. bifidum</i>	P17	-
PRO 43	2	<i>B. bifidum</i>	P8	-	PRO 49	8	<i>B. breve</i>	P18	-
PRO 244	3	<i>Bifidobacterium</i> sp	P14	-	PRO 69	8	<i>B. breve</i>	P18	-
PRO 243	3	<i>Bifidobacterium</i> sp.	P1	A	PRO 83	9	<i>B. breve</i>	P11	-
PRO 245	4	<i>Bifidobacterium</i> sp	P1	A	PRO 120	9	<i>B. pseudolongum</i>	P7	-
PRO 360	5	<i>B. breve</i>	P3	D	PRO 132	10	<i>B. breve</i>	P16	-
PRO 363	5	<i>B. breve</i>	P3	D	PRO 124	10	<i>B. longum</i>	P12	-
PRO 366	5	<i>B. breve</i>	P3	D	PRO 436	11	<i>B. adolescentis</i>	P15	-
PRO 367	5	<i>B. breve</i>	P3	D	PRO 435	11	<i>B. pseudocatenulatum</i>	P13	-
PRO 405	6	<i>B. dentium</i>	P4	E	PRO 466	12	<i>Bifidobacterium</i> sp.	P6	-
PRO 407	6	<i>B. dentium</i>	P4	E					

\*Cada número corresponde a un lactante diferente

### Conclusiones

De un total de 29 aislados de bifidobacterias de heces de lactantes, 25 fueron identificados a nivel de especie mediante PCR y FAFLP. Se registró una mayor proporción de *B. breve* (11 aislados), seguido de *B. longum* (3), *B. bifidum* (3), *B. adolescentis* (2), *B. dentium* (2), *B. pseudolongum* (2) y *B. pseudocatenulatum* (2).

El tipado molecular de los 29 aislados mediante PFGE con las enzimas *SpeI* y *XbaI* dio lugar a la caracterización de 22 pulsotipos distintos, permitiendo la diferenciación entre cepas de la misma especie y poniendo de manifiesto una considerable diversidad genética.

### Referencias Bibliográficas

- Bennet R, Nord CE. (1987). *Infection* 15: 332-336.  
 Chierici R, Fanaro S, Saccomandi D, Vigi V. (2003). *Acta Paediatr. Suppl.* 91: 56-63.  
 Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4506-4512.  
 Tannock GW. (1994). In: Gibson SAW (Ed). *Human Health: The contribution of microorganisms.* Springer-Verlag: London, pp 1-16.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS

Nácher-Vázquez M.<sup>1</sup>, Elizaquível P.<sup>1</sup> y Aznar R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. Burjassot, 46100, Valencia. [monna@alumni.uv.es](mailto:monna@alumni.uv.es)

<sup>2</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Paterna, Valencia

**-Introducción y Objetivos**

La industria alimentaria ha experimentado en los últimos años un creciente interés por los exopolisacáridos (EPSs) producidos por diversos organismos, debido a su carácter viscosificante y espesante. Además, algunos EPSs han sido descritos como beneficiosos para la salud humana. Este es el caso del beta-D-glucano, para el que se han descrito actividades antitrombóticas y antitumorales (Sutherland 1998). Aunque los organismos modificados genéticamente tienen el potencial para producir gran cantidad de estos EPS, su uso es limitado debido a la actual legislación en muchos países de la Unión Europea. Por ello, la producción de EPSs por parte de las bacterias lácticas (BAL) se ha estudiado extensamente en la última década. Dichas bacterias son consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) o de grado alimentario, permitiendo la producción "in situ" de EPS en diferentes productos alimenticios (por ejemplo, yogurt y queso), lo que satisface la demanda del consumidor en cuanto a productos con bajos niveles de aditivos. Además, las BAL son capaces de producir una gran variedad de EPS tanto homopolisacáridos como heteropolisacáridos. Por todo ello, la selección de una amplia diversidad de BAL y el estudio de su capacidad productora de EPS resulta de gran interés (Mozzi y cols 2006).

En un estudio previo abordado en nuestro laboratorio, se llevó a cabo un rastreo de 84 cepas de BAL (79 aislados de productos cárnicos y 5 cepas de referencia) aisladas de productos cárnicos. De estas cepas, se seleccionaron 18 en base a su aspecto "ropy" en medio de cultivo sólido así como por la presencia de genes relacionados con la producción de EPSs. Además, se utilizaron cebadores previamente descritos para el gen *gtf*, que codifica una glicosiltransferasa implicada en la biosíntesis del beta-D-glucano ramificado.

El objetivo de este trabajo se centra en caracterizar las 18 cepas seleccionadas para determinar su capacidad de crecimiento y producción de EPS en distintas condiciones. De este modo se pretende valorar su adecuación para la elaboración de nuevos alimentos funcionales basados en productos lácteos.

**- Material y Métodos**

*Fermentación de carbohidratos.* Se realizó inoculando las galerías API 50CHL (Biomérieux) a partir de suspensiones de células cultivadas en agar MRS y cubriendo los pocillos con vaselina estéril para mantener la anaerobiosis. Las lecturas se anotaron a las 24, 48 y 72 h.

*Crecimiento a distintas Tª y pH.* Se cultivaron en caldo MRS a pH 6.8, incubándose a 4, 12, 20, 37 y 42 °C para las pruebas de temperatura y caldo MRS a pH 3.7, 4.2, 6.3 y 6.8 incubándose a 30 °C para las de pH. Se determinó el crecimiento hasta un tiempo máximo de 28 días, en ambos casos.

*Crecimiento en leche.* Se utilizó leche en polvo desnatada al 9% con 0.04% de rojo clorofenol. Tras inocular cada una de las cepas, se cubrió la superficie del tubo con vaselina estéril para garantizar la anaerobiosis. El crecimiento se determinó como viraje del indicador de morado a amarillo.

*Cuantificación del exopolisacárido.* Para la cuantificación del EPS producido se utilizó el método del fenol-sulfúrico descrito por Dubois y cols. (1956) a partir del crecimiento en medio semidefinido (20g/l glucosa, 10 g/l casaminoácidos, 5g/l acetato de sodio, 6.7 g/l yeast nitrogen base (YNB), 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g/l MnSO<sub>4</sub>, 1 g/l Tween80 y 0.005 g/l xantina, guanina, adenina y uracilo).

**-Resultados y Discusión**

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las pruebas de crecimiento y producción de EPS para las 18 cepas en estudio. Todas las cepas fueron capaces de crecer entre 12 y 37 °C y a pH de 6.3 y 6.8. A 42 °C crecieron sin dificultad los *Lb. plantarum* y los enterococos observándose un crecimiento tardío en alguna de las cepas de otras especies. En cuanto al pH, sólo los *Lb. plantarum* fueron capaces de crecer en el valor más bajo ensayado (pH = 3.7). En leche se observó crecimiento en todos los casos excepto para *Lb. sakei* y la cepa B9 de *Lc. mesenteroides*.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de crecimiento en leche y a distintas temperaturas y pH.

	Cepa	Temperatura °C				pH				Leche	EPS mg/l	
		4	12	20	37	42	3.7	4.2	6.3			6.8
<i>Lc. mesenteroides</i>	G7	(+) <sup>a</sup>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	24.9
	B4	(+)	+	+	+	-	-	(+)	+	+	+	nt
	F10	(+)	+	+	+	(+)	-	-	+	+	+	53.1
	B9	(+)	+	+	+	-	-	-	+	+	-	nt
	B1	(+)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	28.4
	A8	(+)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	39.7
<i>Lc. carnosum</i>	G4	-	+	+	+	(+)	-	-	+	+	+	13.4
	H4	(+)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	202
<i>Lb. plantarum</i>	C6	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19.4
	D4	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21.1
	C7	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32.2
	C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20.2
	D10	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	174
	D2	(+)	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	49.8
<i>Lb. curvatus</i>	B7	(+)	(+)	+	+	-	-	+	+	+	+	nt
<i>Lb. sakei</i>	2M2	(+)	+	+	+	(+)	-	+	+	+	-	100
<i>Enterococcus</i>	M16	(+)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	nt
	M17	(+)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	35.7

<sup>a</sup> Crecimiento visible tras 10 o más días.

En cuanto a la fermentación de carbohidratos, todos los *Lb. plantarum* presentaron un perfil idéntico mientras que en el caso de las cepas de *Leuconostoc*, se observó mayor variabilidad en los perfiles. La producción de EPS cuantificada por el método del fenol-sulfúrico, muestra diferencias entre cepas de la misma especie, lo que indica que es un carácter de cepa.

**- Conclusiones**

Considerando la producción de EPS y las características tecnológicas de las cepas ensayadas, los *Lb. plantarum*, y concretamente la cepa D10, son los mejores candidatos para su incorporación en alimento funcional de tipo lácteo como el yogur, dado que la fermentación se lleva a cabo a 42 °C y a lo largo de ésta se produce una acidificación del medio hasta pH de 4.2.

**-Referencias Bibliográficas**

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350-356, 1956.

Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E.M., Van der Meulen, R., Foulquié Moreno, M.R., Font de Valdez, G., De Vuyst, L. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. Appl. Environ. Microbiol. 72:4431-4435, 2006.

Ruas-Madiedo, P., Moreno, J.A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., Reyes-Gavilán, C. Screening of Exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains Isolated from the Human Intestinal Microbiota. Appl. Environ. Microbiol. 73:4385-4388, 2007.

Sutherland, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends Biotechnol. 16:41-46, 1998.

Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G., De Vuyst, L. Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. Int. J. Food Microbiol. 118:250-258, 2007.

## PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE BIFIDOBACTERIAS AISLADAS DE HECES DE LACTANTES

**Rodríguez E., Rodríguez R., Gaya P. y Medina M.**

Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA, Ctra. de La Coruña Km 7, 28040 Madrid, minguez@inia.es

### Introducción y Objetivos

Las bifidobacterias son componentes mayoritarios de la microbiota intestinal humana y se emplean en la elaboración de numerosos productos lácteos probióticos. Un criterio importante en la selección de nuevas cepas probióticas como adjuntos alimentarios, es que se mantengan viables en el producto y que una vez ingeridas toleren el paso por el tracto gastrointestinal de manera que un número suficiente de bacterias alcance el intestino y ejerza su efecto beneficioso (Zárate et al., 2000). Por otro lado, se ha descrito que alimentos como la leche incrementan la supervivencia bacteriana al tránsito gastrointestinal (Charteris et al., 1998). Una vez en el intestino, la capacidad de adhesión de las bifidobacterias al mucus intestinal y posteriormente a los enterocitos permitiría además la colonización bacteriana proporcionando una mayor persistencia del efecto probiótico en el lugar de acción y contribuiría a mejorar la protección del intestino frente a la colonización de patógenos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de un proceso de digestión simulada en la supervivencia de bifidobacterias aisladas de heces de lactantes y sembradas en leche, así como la capacidad de adhesión *in vitro* de dichos aislados a células tumorales intestinales Caco-2.

### Material y Métodos

**Bacterias estudiadas.** Se emplearon seis aislados de bifidobacterias obtenidos de heces de lactantes y pertenecientes a la colección de microorganismos del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA.

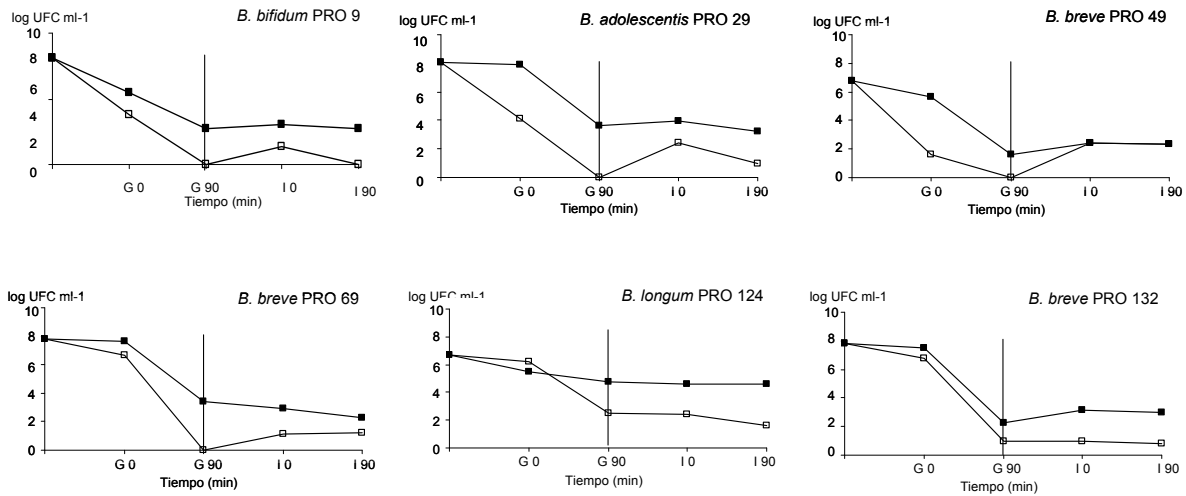
**Resistencia a fluidos gástricos e intestinales.** Se prepararon cultivos de los aislados que se centrifugaron y resuspendieron en solución salina (NaCl 0.9%) o leche en polvo reconstituida (10%) a una concentración de aproximadamente  $10^8$  ufc/ml. Dichas suspensiones se inocularon al 10% en jugo gástrico simulado a pH 2 (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 45 mM, pepsina 3 g/L) y se incubaron a 37°C con agitación a 100 rpm durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo, las células obtenidas por centrifugación se resuspendieron en el mismo volumen de jugo intestinal simulado (bilis bovina 0,15% y pancreatina 0,1%) a pH 8 y se incubaron durante 90 minutos a 37°C con agitación (Zárate et al., 2000; Fernández et al., 2003). Se realizaron recuentos de bacterias viables en cada paso del proceso en agar MRS con cisteína al 0.3%

**Adhesión al tracto gastrointestinal *in vitro*.** Se prepararon suspensiones de las bifidobacterias de aproximadamente  $10^8$  ufc/ml en PBS/Eagle's 50%, que se inocularon por triplicado en pocillos de placas preparadas con las células Caco 2 (ATCC HTB 37). Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se eliminaron las bacterias no adheridas a las células lavando cada pocillo dos veces con PBS. Las bacterias adheridas se fijaron con metanol al 70% a 4°C y se tiñeron con cristal violeta. A continuación se visualizaron al microscopio óptico y se hizo recuento de las bacterias adheridas en 20 campos microscópicos por pocillo. A partir de los resultados obtenidos se realizó una clasificación arbitraria del grado de adhesión con respecto a la cepa *B. longum* BB536 (Morinaga Milk Industry Co, Tokio, Japón) considerada como cepa adherente en la literatura.

### Resultados y Discusión

Los niveles de las seis bifidobacterias estudiadas descendieron drásticamente en presencia de jugo gástrico desde el tiempo 0 hasta los 90 minutos de incubación a 37°C, como se observa en la Figura 1. Sin embargo, se observó un efecto inhibitorio menor sobre la viabilidad bacteriana en presencia del jugo intestinal. Se comprobó el efecto protector de la leche en todas las bifidobacterias ensayadas, superior en el caso de las cepas *B. longum* PRO 124 y *B. bifidum* PRO 9, en que se observó una reducción de tan sólo 1 unidad logarítmica.

Figura 1: Efecto de la digestión simulada por jugos gástricos (G) e intestinales (I) sobre la supervivencia de seis aislados de bifidobacterias en suero salino (□) o en leche (■).



La capacidad de adhesión a células Caco-2 fue muy variable (Tabla 1) entre los distintos aislados, en concordancia con los resultados de otros trabajos (Crociani et al., 1995; Gómez Zavaglia et al., 1998; Fernández et al., 2003). Tres de las bifidobacterias ensayadas presentaron valores superiores de adhesión al obtenido con *B. longum* BB536 considerada como muy adherente por Crociani et al. (1995). En todos los casos se observaron diferencias marcadas en el número de bifidobacterias adheridas en función del campo visualizado.

Tabla 1. Adhesión de seis bifidobacterias aisladas de heces de lactantes a células Caco-2.

Aislado	Origen*	Bacterias adheridas (nº medio células/campo)	Grado de adhesión
<i>B. bifidum</i> PRO 9	1	48	Media
<i>B. adolescentis</i> PRO 29	2	197	Alta
<i>B. breve</i> PRO 49	3	133	Alta
<i>B. breve</i> PRO 69	3	112	Alta
<i>B. longum</i> PRO 124	4	3	Baja
<i>B. breve</i> PRO 132	4	11	Baja
<i>B. longum</i> BB536 (Control)	Producto comercial	55	

\* Cada número se corresponde con un lactante diferente

### Conclusiones

Los aislados de bifidobacterias estudiados presentaron una viabilidad reducida frente al proceso digestivo simulado, aunque se observó un efecto protector de las bacterias vehiculadas en leche. La capacidad de adhesión a células Caco-2 fue variable. Tres de los aislados presentaron valores superiores de adhesión al de la cepa comercial considerada como adherente *B. longum* BB536.

### Referencias Bibliográficas

- Charteris W.P., Nelly P.M., Morelli L., Collins, J.K. (1998) J. Appl. Microbiol. 84: 759-768.  
 Crociani J., Grill J.P., Huppert M., Ballongue J. (1995) Lett. Appl. Microbiol. 21: 146-148.  
 Fernández M.F., Boris S., Barbés C. (2003) J. Appl. Microbiol. 94: 449-455.  
 Gómez Zavaglia A., Kociubinski G., Pérez P., De Antoni G. (1998) J. Food Prot. 61: 865-873.  
 Kimoto H., Kurisaki J., Tsuji N.M., Ohmomo S., Okamoto T. (1999) Lett. Appl. Microbiol. 29, 313-316.  
 Zárate G., Perez Chaia A., González S., Oliver G. (2000) J. Food Prot. 63: 1214-1221.

## CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO PRS5 DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* Y UTILIZACIÓN COMO VECTOR DE CLONACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE USO ALIMENTARIO

Alegre M.T.<sup>1</sup>, Rodríguez M.C.<sup>2</sup> y Mesas J.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Dpto. de Fisiología Vegetal. <sup>3</sup>Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología (Tecnología de los Alimentos). Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n, 27002, Lugo, [mtalegre@lugo.usc.es](mailto:mtalegre@lugo.usc.es)

### Introducción y Objetivos

Los pediococos son bacterias lácticas (BAL) presentes de forma natural en ensilados y alimentos fermentados, que a menudo son utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos vegetales, cárnicos y lácteos, tanto por su contribución a las propiedades organolépticas de estos alimentos, como por la capacidad de algunos pediococos de producir bacteriocinas inhibidoras del crecimiento de otras bacterias (Graham y McKay, 1985; Ramesh, y col., 2000). Otro hábitat natural de *Pediococcus* es el vino, en el cual algunas de sus especies, como *P. damnosus*, pueden ser responsables del deterioro de los mismos (Gindreau y col., 2001) y otras, como *P. pentosaceus*, probablemente se limiten a realizar la fermentación maloláctica en aquellos vinos en los que se desarrollan de forma espontánea. *P. pentosaceus* ha sido estudiado por su capacidad para producir bacteriocinas, por su contenido en plásmidos, y por la posibilidad de utilizar éstos como vectores de clonación (Graham y McKay, 1985; Giacomini, y col., 2000; Alegre y col., 2005). El objetivo del presente trabajo ha consistido en la secuenciación y caracterización de pRS5, un plásmido de *P. pentosaceus* de ~10 Kb, y en el empleo del mismo en la obtención de vectores de clonación para BAL.

### Material y Métodos

Los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo fueron LB para *Escherichia coli* y MRS para *Lactobacillus* y *Pediococcus*, suplementados con ampicilina, cloranfenicol o eritromicina cuando fue requerido. Las temperaturas de incubación empleadas fueron 37°C para *E. coli* y 30°C para las BAL. Las extracciones plasmídicas se realizaron según Ausubel y col. (1987) para *E. coli* y por el método de O'Sullivan y Klaenhammer (1993) para las BAL. La transformación de plásmidos se realizó según Ausubel y col. (1987) para *E. coli*, Rodríguez y col. (2007) para *P. acidilactici* y por el método de Alegre y col. (2004) para *L. plantarum*. La secuencia de nucleótidos de pRS5 se determinó usando un secuenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences) y la búsqueda de homologías con otros plásmidos incorporados en bases de datos, se realizó usando el "BLAST network service" (Altschul y col., 1997). El análisis de la estabilidad segregacional de los derivados de pRS5 se llevó a cabo por el método de Sudhamani y col. (2008).

### Resultados y Discusión

La secuencia de nucleótidos de pRS5 (10153 bp; Acceso Number: FM163399) mostró la presencia de 9 ORFs cuyos productos génicos se muestran en la Tabla 1. La región de pRS5, que comprende la ORF1 y secuencias adyacentes, muestra alto porcentaje de identidad con la región de replicación de varios plásmidos de la familia de pUCL287 (Benachour y col., 1997) indicando que pRS5 replica por el sistema "theta". Destacan asimismo en pRS5 la presencia de ORFs que codifican para una enzima de restricción y una antitoxina que podría estar implicada en la estabilidad de pRS5 en *P. pentosaceus*.

A partir de pRS5 se han obtenido 3 derivados: (i) pRS5C (6,1 Kb), que contiene la región de replicación de pRS5, pUC19 y un gen de resistencia a cloranfenicol y que se comporta como vector bifuncional para *E. coli* y BAL; (ii) pRS5CE (7,2Kb), que contiene pRS5C y un gen de resistencia a eritromicina, cuya expresión en *E. coli* y BAL confirma la utilidad de pRS5C como vector de clonación; (iii) pRS5C2 (3,8 Kb), derivado de pRS5C por eliminación de pUC19, replicativo en BAL pero no en *E. coli*, útil como vector específico para BAL. La estabilidad de estos vectores (Fig. 1) depende más del

tamaño del plásmido que de la especie portadora y es suficientemente alta como para considerar a los derivados de pRS5 vectores de clonación idóneos para BAL.

Tabla 1. Características de los ORFs de pRS5

ORF <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>	Tamaño <sup>c</sup>	Función probable codificada
ORF1	298-1233	311	Proteína de replicación (RepA)
ORF2	1518-2081	187	Control de N° de copias
ORF3	2188-3108	306	Sistema restricción-modificación
ORF4	3111-7364	1417	Enzima de restricción
ORF5	7836-7480	118	Desconocida
ORF6	8114-7836	92	Antitoxina
ORF7	8193-8780	195	Integrasa
ORF8	8793-9152	119	Desconocida
ORF9	9529-9741	70	Desconocida

<sup>a</sup> Los ORFs han sido listados de 1 a 9 en función de su distancia respecto al sitio *MspI* más cercano al inicio de lectura del ORF de RepA. <sup>b</sup> N° de nucleótido. <sup>c</sup> Aminoácidos.

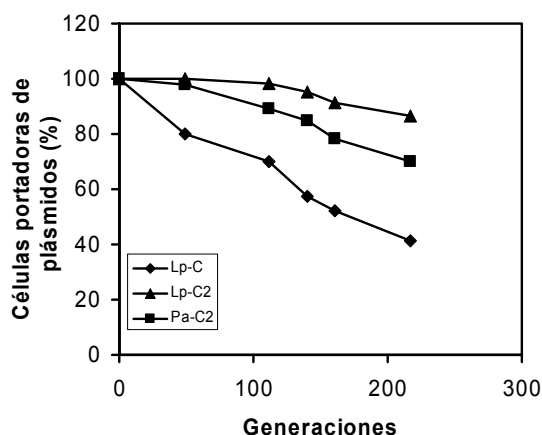


Fig. 1. Estabilidad segregacional de los vectores derivados de pRS5. Lp-C: *L. plantarum* conteniendo pRS5C. Lp-C2: *L. plantarum* conteniendo pRS5C2. Pa-C2: *P. acidilactici* conteniendo pRS5C2.

## Conclusiones

El plásmido pRS5 replica por el sistema "theta" y pertenece a la familia de pUCL287. Codifica para una endonucleasa de restricción, que podría proporcionar cierta ventaja ecológica a sus huéspedes y para una posible antitoxina implicada en la estabilidad del plásmido. La alta estabilidad de los derivados de pRS5 les convierte en herramientas de clonación idóneas para las BAL. Por el momento pRS5 es el primer plásmido "theta" de *P. pentosaceus* utilizado eficazmente como vector de clonación.

## Referencias Bibliográficas

- Alegre, M.T., Rodríguez, M.C. y Mesas, J.M. 2004. FEMS Microbiol. Lett. 241, 73-77.  
 Alegre, M.T., Rodríguez, M.C. y Mesas, J.M. 2005. FEMS Microbiol. Lett. 250, 151-156.  
 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, W., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Nucleic Acid Res. 25, 3389-3402.  
 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.  
 Benachour, A., Frère, J., Flahaut, S. y Novel, G. 1997. Mol. Gen. Genet. 255, 504-513.  
 Giacomini, A., Squartini, A. y Nuti, M.P. 2000. Plasmid 43, 111-122.  
 Gindreau, E., Walling, E. y Lonvaud-Funel, A. 2001. J. Appl. Microbiol. 90, 535-542.  
 Graham, D.C. y McKay, L.L. 1985. Appl. Environ. Microbiol. 50, 532-534.  
 O'Sullivan, D.J. y Klaenhammer, T.D. 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2730-2733.  
 Ramesh, A., Halami, P.M. y Chandrashekar, A. 2000. World J. Microbiol. Biotechnol. 16, 695-697.  
 Rodríguez, M.C., Alegre, M.T. y Mesas, J.M. 2007. Plasmid 48, 44-50.  
 Sudhamani, M., Ismaiel, E., Geis, A., Batish, V. y Heller, K.J. 2008. Plasmid 59, 11-19.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PH Y CONCENTRACIÓN INICIAL DE AZÚCARES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS VÍNICAS CON INTERÉS PARA EL SECTOR INDUSTRIAL

Arroyo López F.N.<sup>1</sup>, Orlic, S.<sup>1</sup>, Belloch, C.<sup>2</sup>, Barrio, E.<sup>1</sup>, Querol, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia. Edificio de Institutos del Campus de Paterna. E-46100 Burjassot, Valencia, España. francisco.arroyo@uv.es

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). PO-BOX 73. E-46100 Burjassot, Valencia, España.

### - Introducción y Objetivos

Las levaduras juegan un papel muy importante durante el proceso de transformación del mosto en vino, afectando a la calidad y sabor del producto final (Querol y Fleet, 2006). Las principales especies de levaduras responsables de la fermentación son diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *S. bayanus* var. *uvarum* (Pretorius, 2000), aunque también se ha descrito la formación natural de híbridos entre especies del antiguo complejo *Saccharomyces* sensu stricto como es el caso de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* (González et al., 2007).

Debido a los efectos que el cambio climático está produciendo en el proceso de maduración natural de la uva (incrementando el contenido en azúcares y descendiendo la acidez de los frutos) el sector vitivinícola está cada vez más interesado en determinar la influencia que las variables ambientales pueden tener sobre el crecimiento de los microorganismos presentes durante la fermentación. Sin embargo, no hay estudios que determinen tales efectos.

El presente trabajo tiene como objetivo principal caracterizar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* T73 (ScT73) y del híbrido *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* W27, ambas levaduras con interés para el sector industrial ya que son comercializadas como cultivos iniciadores de las fermentación, en función de la temperatura, pH y concentración inicial de azúcares reductores.

### - Material y Métodos

Los experimentos de fermentación fueron llevados a cabo en mosto sintético MS300 (Rossignol et al., 2003), con una composición en azúcares, sales minerales, vitaminas, y aminoácidos en proporciones similares a las que contiene el mosto natural.

El efecto combinado de las variables ambientales sobre la velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) se estudió mediante un diseño compuesto central con 3 repeticiones en el centro para estimar el puro error. El rango de las variables ambientales abarcado fue: Temperatura (T) 14 - 34°C, pH (P) 2,25 - 4,75 (ajustado con ácido tartárico no asimilable) y concentración inicial de azúcares (S) (50% glucosa + 50% fructosa) 115 - 285 g/l. La región experimental fue seleccionada intencionadamente para obtener condiciones reales que se pueden dar durante la fermentación en la industria.

Posteriormente los efectos de las variables ambientales se cuantificaron mediante superficie de respuesta (SR), según la ecuación:

$$\mu_{max} = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_{11} T^2 + \beta_2 P + \beta_{22} P^2 + \beta_3 S + \beta_{33} S^2 + \beta_{12} T^*P + \beta_{13} T^*S + \beta_{23} P^*S + \varepsilon.$$

Que permite estimar los efectos lineales, cuadráticos e interacciones entre las variables. Con el fin de validar las predicciones realizadas por las SR, una serie de nuevas experiencias fueron llevadas a cabo y los índices de precisión (A) y sesgo (B) calculados según indican Baranyi et al. (1999).

### - Resultados y Discusión

El análisis de ANOVA para ScT73 y el híbrido W27 mostró como significativos ( $p \leq 0,05$ ) los siguientes coeficientes de la SR:

$$\mu_{max, ScT73} = 0.2208 + 0.1082 T - 0.0405 S + 0.0329 S^2 \quad Ec (1)$$

$$\mu_{max, híbrido W27} = 0.3319 + 0.15554 T + 0.0542 pH - 0.0417 pH^2 - 0.0370 S \quad Ec (2)$$

Para ambas levaduras la temperatura fue la variable con mayor importancia sobre la velocidad de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), de manera que conforme aumenta dicho factor también aumenta  $\mu_{\max}$  (signo positivo para el coeficiente de la T). Otros efectos significativos fueron también la concentración inicial de azúcares (lineal y cuadrático) para la levadura ScT73, y el pH (lineal y cuadrático) y concentración de azúcares (lineal) para el híbrido W27. No quedó retenido ningún coeficiente para las interacciones entre las variables. Los resultados indican que conforme se incrementa el pH aumenta  $\mu_{\max}$ , presentando el híbrido W27 un máximo entorno a 4,0. Sin embargo, cuando aumenta la concentración inicial de azúcares desciende  $\mu_{\max}$ . Por lo tanto, el aumento en el contenido de glucosa y fructosa que se está produciendo en las uvas por causa del cambio climático podría tener un efecto negativo sobre la fermentación.

Las ecuaciones obtenidas pueden ser utilizadas con fiabilidad por la industria para predecir el comportamiento de ScT73 y el híbrido W27 frente a nuevas combinaciones de las variables ambientales, como así lo demuestran sus índices de validación ( $A=1,04$ ,  $B=0,97$  para ScT73, y  $A=1,06$ ,  $B=0,98$  para el híbrido W27). Dichos índices nos indican que aproximadamente se está cometiendo un porcentaje de error del 5% en las predicciones, y que las mismas son ligeramente menores que los valores observados ( $B < 1$ ).

#### **- Conclusiones**

El uso de técnicas de microbiología predictiva y el desarrollo de nuevas ecuaciones de crecimiento resultará de gran utilidad para el sector vitivinícola, ya que le permitirá disponer de información objetiva sobre que microorganismos son más aconsejables de utilizar según la variedad de uva con la que se trabaje o las diferentes condiciones de fermentación.

#### **- Referencias Bibliográficas**

- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. Validating and comparing predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 159-166.
- González, S.S., Gallo, L., Dolores Climent, D., Barrio, E., Querol, A. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 11-18.
- Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
- Querol, A., Fleet, G. 2006. *Yeasts in food and beverages*. Springer-Verlag, Berlin (Germany).
- Rosignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20, 1369-1385.

## APLICACIÓN DE SISTEMAS MINIATURIZADOS PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS EN ENOLOGÍA

***Berbegal C.,<sup>1</sup> Pardo I.<sup>1</sup> y Ferrer S.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup> ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Valencia, [carmen.berbegal@uv.es](mailto:carmen.berbegal@uv.es)

### Introducción y Objetivos

La Fermentación Maloláctica (FML) es fundamental para la calidad del vino, especialmente en los vinos tintos. En este proceso se produce la transformación del ácido málico, de un sabor más herbáceo y amargo, en ácido láctico, más agradable y suave al paladar, además de producirse una mejoría aromática del vino.

Esta fermentación es llevada a cabo por bacterias lácticas (BL), pero no siempre se realiza en el momento adecuado ni en condiciones óptimas, ya que son muchos los factores que influyen en su crecimiento y desarrollo [1]. Existen varias estrategias para controlar la fermentación de forma adecuada. Una de ellas consiste en la inducción de esta con la inoculación de BL seleccionadas, principalmente con cepas de *Oenococcus oeni*. Se trata de aportar al vino una elevada población de bacterias, de forma que se asegure el completo desarrollo de la FML y se controle la calidad a través de la naturaleza y cantidad de los productos secundarios formados por las cepas seleccionadas.

Para llevar a cabo la selección se siguen unos criterios para elegir las mejores desde el punto de vista de actividad maloláctica, es decir, que sean capaces de crecer y realizar dicha fermentación a bajos niveles de pH, a altos contenidos en etanol, a bajas temperaturas, etc. [2]. Los métodos habituales para la selección de cepas microbianas implican la utilización de grandes volúmenes de medios de cultivo y largos periodos de tiempo para el procesado y análisis de todos los cultivos. Por este motivo, el objetivo de este trabajo es realizar una selección de cepas de *O. oeni* para promover la FML mediante un sistema miniaturizado que facilite la información de interés de una manera rápida y sin necesidad de un análisis complejo. Para ello, se trabaja con cultivos en microplacas y con un lector de microplacas que permite seguir medidas cinéticas de cambios en la absorbancia durante periodos de tiempo específicos.

### Material y Métodos

Las cepas de *O. oeni* utilizadas en este estudio provienen de la colección de nuestro laboratorio (ENOLAB) y de aislados procedentes de muestras de mostos y vinos que presentaban interés por sus características particulares y en los que se desarrollaron BL capaces de realizar la FML. La incubación de los diferentes cultivos bacterianos tiene lugar en microplacas de 96 pocillos (Falcon™ Microplates, BD) y la medición de la absorbancia se lleva a cabo con el lector de microplacas FLUOstar Optima Microplate Reader (BMG LABTECH, GmbH) a 600 nm cada 24 horas durante 5 días.

Para el estudio del crecimiento de las distintas cepas de *O. oeni* a diferentes niveles de pH, se utiliza una placa estéril de 96 pocillos que contienen vino sintético. Cada columna de la microplaca corresponde a un nivel de pH diferente (3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 4.4). Estos niveles de pH se han ajustado con hidróxido de sodio y ácido ortofosfórico. Las células de las distintas cepas son crecidas en medio MLO [3], lavadas con H<sub>2</sub>O e inoculadas en concentraciones de 10<sup>7</sup> ufc/ml en un volumen final de 350 µl de vino sintético presente en cada pocillo. Las microplacas son incubadas a 28°C en condiciones de anaerobiosis.

Este sistema puede utilizarse también para estudiar y caracterizar la influencia de distintos parámetros, como por ejemplo, la cantidad de etanol, concentración de azúcares, niveles de SO<sub>2</sub>, etc. sobre el crecimiento de las distintas cepas.

La transformación del ácido málico en ácido láctico implica una disminución de la acidez. Mediante la utilización de un indicador de pH se pueden observar variaciones en el color que señalen un aumento de pH y por tanto una degradación de ácido málico. Como indicador de pH se ha utilizado el azul de bromofenol, ya que presenta cambios de color entre niveles de pH de 3 (amarillo) y 4.6 (azul-púrpura). Se construye una curva patrón que relacione el nivel de pH del azul de bromofenol con la absorbancia a 600 nm. Las células, son crecidas en MLO [3], lavadas con H<sub>2</sub>O e inoculadas en concentraciones de 10<sup>8</sup> ufc/ml en una solución de tampón fosfato monosódico 200 mM, ácido málico (3g/L) y azul de bromofenol (0.04 g/L), ajustando el pH con hidróxido de sodio y ácido ortofosfórico (pH 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.8, 4.4 y 4.9). Una vez inoculadas, las placas son incubadas a 28°C. De esta manera se puede medir la capacidad de degradación de ácido málico a diferentes niveles de pH.

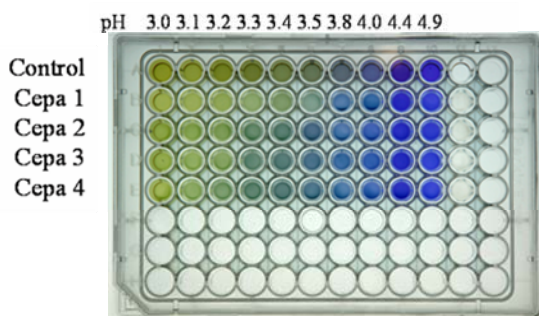


Fig.1 Microplaca para la detección de la degradación de ácido málico a diferentes niveles de pH (3 - 4.9). Los cultivos (1-4) corresponden a distintas cepas de *O. oeni*, observándose una mayor capacidad de degradar el ácido málico a valores bajos de pH en la cepa 4, y menor en el caso de la cepa 1.

## Resultados y Discusión

La incubación de cultivos en microplacas y la medición de la absorbancia con el lector de microplacas han permitido observar pequeñas diferencias en la tasa de crecimiento entre cepas de *O. oeni* y seleccionar aquellas capaces de crecer en vino sintético a niveles de pH más bajos. De la misma manera las diferencias en la absorbancia por los cambios de color del indicador de pH, azul de bromofenol, permiten distinguir las cepas capaces de desarrollar la FML a niveles más bajos de pH, así como la cinética de cada cepa estudiada.

Sometiendo también a las distintas cepas a concentraciones crecientes de etanol, SO<sub>2</sub>, bajas temperaturas, etc., se consigue obtener una colección de cepas de *O. oeni* caracterizadas que pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores en función de las características intrínsecas del vino y que faciliten el desarrollo de la FML aunque se trate de vinos difíciles.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de sistemas miniaturizados para la selección de cepas de *O. oeni* proporcionan numerosas ventajas frente a los métodos habituales de selección ya que permiten reducir el volumen de medio utilizado, minimizar la manipulación del cultivo y seguir el progreso de las cinéticas de las distintas cepas a tiempo real además de ser un sistema automatizado. De esta manera se disminuye la probabilidad de contaminación y el tiempo necesario para el procesado y análisis de los cultivos. También permiten estandarizar las medidas de la absorbancia mediante el uso de un lector de microplacas y la programación de la toma de medidas durante tiempos establecidos, además de realizar numerosas medidas en periodos de tiempo muy cortos. La microtécnica puede ser considerada por tanto, como un método sencillo, rápido y eficaz para realizar simultáneamente numerosas pruebas a gran cantidad de cepas y en diversas condiciones, pudiéndose generalizar para el estudio de diferentes criterios sobre cualquier microorganismo.

## Referencias Bibliográficas

- 1- Wibowo D, Fleet, G.H., Lee. & Eschenbruch, R. 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*. 64: 421-428.
- 2- *Buckenhuskes*, H.J. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*. 12: 253-272.
- 3- Maicas, S., À. Natividad, S. Ferrer, and I. Pardo. 2000. Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *O. oeni*. *World Journal Microbiology. and Biotechnology*. 16: 805-810.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RM2007-00007-00-00, la beca V segles Universitat-empresa de València, y Agrovín.

**CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIFENOLES DE LA MALVASÍA DE SITGES Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE**

**Carbó R.<sup>1</sup>, López F.<sup>2</sup>, Andreo N.<sup>1</sup>, Almajano M.P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia. Escola Superior d'Agricultura, Universitat Politècnica de Catalunya. Av. Canal Olímpic, 15, 08860 Castelldefels

<sup>2</sup>Dpto Enginyeria Química, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili. Av. Països catalans 26, 43007 Tarragona.

<sup>3</sup>Dpto Enginyeria Química. Universitat Politècnica de Catalunya. Av. Diagonal 649, 08034 Barcelona.

**Introducción y objetivos**

La malvasía de Sitges es un vino de licor de envejecimiento oxidativo que se elabora con una variedad de uva blanca originaria de Grecia, llamada malvasía. La malvasía se cultiva en pequeñas extensiones, en distintos países y se denomina con distintos sinónimos generalmente asociados a la región en la que se cultiva (Malvasía de Banyalbufar, Malvasía de Gandia, Malvasía de Lanzarote, Malvasía de Chianti, Malvasía de Cerdeña, etc). Los objetivos del presente estudio son: a) caracterizar y determinar los polifenoles presentes en la variedad malvasía de Sitges, b) evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana del mosto y la mistela elaborada con dicha variedad, c) determinar la concentración mínima inhibitoria de polifenoles puros presentes en la malvasía de Sitges.

**Material y métodos**

Se ha evaluado la actividad antioxidante de dos muestras de mosto y una de mistela de malvasía de Sitges por el método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) y se han cuantificado los polifenoles totales mediante HPLC. La actividad antimicrobiana se ha realizado mediante la técnica del disco de difusión en placa a partir de las muestras concentradas 4 veces y sin etanol. Además se ha realizado la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en microplacas de los principales polifenoles detectados frente a *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

**Resultados y Discusión**

El mosto prensa es el que presenta una mayor concentración de polifenoles totales (75,11mg/L) y prácticamente la mitad de ellos pertenecen al grupo de los ácidos hidroxicinámicos (Tabla 1). Sin embargo el mosto flor y la mistela tienen una concentración de polifenoles totales similar entre ellos y alrededor de 24 mg/L. La mayoría de los polifenoles en el mosto flor, al igual que en el mosto prensa, pertenecen al grupo de los ácidos hidroxicinámicos. Contrariamente, en la mistela el ácido gálico es el que se encuentra en mayor proporción. Le siguen el grupo de los ácidos hidroxicinámicos y el ácido siríngico. Este último, junto con el ácido gálico, podría ser debido a la madera de castaño en la que se ha realizado el envejecimiento oxidativo. Los polifenoles totales de la mistela son inferiores a los presentes en vinos blancos debido al proceso de elaboración que supone el encabezado del mosto y por lo tanto una dilución de los polifenoles del mismo (Maggu M. et al., 2007).

Existe correlación entre la concentración de polifenoles totales y la actividad antioxidante, aunque esta última es muy baja como consecuencia de la oxidación que ha sufrido el propio vino estudiado. Así, la actividad antioxidante de la mistela es equivalente a 2,1 mmol de trolox/L mientras que la del mosto prensa es de 5 mmol de trolox/L. (Paixao N. et al., 2007)

Los ensayos de inhibición por la técnica del disco de difusión en placa solo inhibieron ligeramente el crecimiento de *Candida*. El resto de microorganismos estudiados no presentaron inhibición. Existe correlación entre la actividad antioxidante y la actividad antimicrobiana, de manera que la falta de inhibición concuerda con la baja actividad antioxidante de las muestras. Algunas plantas como la *Camelia sinensis*, de la que procede el té, presentan gran actividad antimicrobiana y pueden tener una actividad antioxidante superior a 1000 mmols de trolox/L. Respecto a las pruebas MIC realizadas se comprobó que los microorganismos estudiados presentaron una gran resistencia a los principales polifenoles de la variedad malvasía (Tabla 2). Para algunos polifenoles y microorganismos no se pudo determinar la MIC pues la baja solubilidad de estos compuestos en agua no permitió preparar concentraciones lo suficientemente elevadas como para poder detectar el efecto inhibitorio. En estos casos se expresaron los resultados como MIC superior al máximo valor ensayado. De los polifenoles estudiados, los ácidos cafeico y cumárico son los que presentan mayor actividad antimicrobiana (Campos et al., 2003). En las levaduras, las MIC varían en función del género pero mayoritariamente son de 500 mg/L. De las tres levaduras ensayadas, *Saccharomyces* es más resistente que *Brettanomyces* y *Candida*. Respecto a las bacterias, las MIC también varían en función de la especie y mayoritariamente los valores van de 100 a 500 mg/L. *L.acidophilus* y *L.plantarum* son las especies que presentan mayor resistencia al ácido cafeico y *L.acidophilus* y *O.oeni* presentan mayor resistencia al ácido cumárico. Las MIC del resto de polifenoles son más elevadas y en la

mayoría de ensayos no se ha determinado el valor exacto. Microorganismos propios del vino como los estudiados presentan una gran resistencia a los polifenoles ensayados y ello sugiere que la inhibición que ejercen no parece tener un papel tan importante comparándolo con otros alimentos.

### Conclusiones

Vinos de envejecimiento oxidativo como la malvasía de Sitges presentan baja actividad antioxidante y antimicrobiana. Los principales polifenoles provienen de la uva y de la madera utilizada en el envejecimiento. Los ácidos cumárico y caféico son los polifenoles ensayados que presentan mayor actividad antimicrobiana, siendo las bacterias lácticas más sensibles que las levaduras.

Tabla 1. Componentes polifenólicos en mg/L en mistela y mosto de Malvasía de Sitges. (tr: trazas)

	Mosto flor		Mosto prensa		Mistela	
	mg/L	SD	mg/L	SD	mg/L	SD
Ácido gálico	2,1	0,2	4,2	0,2	9,1	0,3
Ácido protocateico	0,2	0	0,3	0	tr	-
Tirosol	3,1	0,2	11,8	0,2	tr	-
Ácido cis-caftárico	3,5	0,2	16,6	0,2	2,8	0
Ácido cis-coutarico	1,6	0	4,2	0	1	0
Ácido trans-coutarico	4,1	0,1	4,6	0	0,8	0
Ácido cis-cafeico	1,5	0,1	1,5	0	1,6	0
Ácido trans-cafeico	1	0,1	1,1	0	tr	-
Ácido cis-cumárico	0,3	0	0,4	0	0,5	0
Ácido trans-cumárico	0,4	0	0,7	0	1	0
5-Metil furfural	tr	-	0,1	0	tr	-
Ácido siríngico	tr	-	tr	-	6,3	0,3
Rutino	0,8	0,1	3,2	0,2	1,2	0,1
Quercitina	tr	-	0,6	0	tr	-
(+)-Catequina	6,5	0,2	25,6	0,2	tr	-
Total	25		75,1		24,2	

Tabla 2: MIC en mg/L de polifenoles

	Ácido caféico	Ácido p-cumárico	Epicatequina	Ácido vanílico	Ácido protocateico	Ácido gálico
<i>Brettanomyce/Dekkera</i>	500	500	500	>1500	>1500	>1500
<i>Candida albicans</i>	500	500	>1000	1000	1500	>1500
<i>Sacch.cerevisiae</i>	>500	>1500	>1000	>1500	>1500	>1500
<i>L. acidophilus</i>	>500	500	1000	>1500	1500	>1500
<i>L. hilgardii</i>	250	100	>1000	1000	1500	>1500
<i>Oenococcus oeni</i>	100	500	>1000	500	1500	>1500
<i>L. plantarum</i>	>500	200	>1000	>1500	>1500	>1500

### Referencias bibliográficas

Campos *et al.*, Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. Journal of Applied Microbiology (2003), 94167–174

Maggu M. *et al.* Effect of skin contact and pressure on the composition of sauvignon blanc most. J.Agric Food chem., 55 (2007), 10281-10288

Paixao N. *et al.* Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. Food Chemistry 105 (2007) 204–214

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología de España que ha subvencionado la presente investigación a través de la ayuda AGL2005-08-088-CO2-02/ALI

## PRESENCIA DE LEVADURAS COMERCIALES EN FERMENTACIONES VÍNICAS ESPONTÁNEAS

Chacón M., Ortiz M.J., Barraón N. y Briones A.

Dpto. de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de CC. Químicas, Universidad de Castilla La Mancha. Avda. Camilo José Cela, 10. 13071 Ciudad Real. Ana.Briones@uclm.es

### Introducción y Objetivos

Hoy en día es habitual el uso de cultivos iniciadores en enología (LSA); no obstante, en algunas bodegas y a criterio del enólogo, elaboran el vino bajo fermentación espontánea, es decir con las propias levaduras del mosto; ello, a *priori* favorece la complejidad del vino, ya que ocurre un proceso dinámico con una sucesión de especies y cepas siguiendo el principio de sustitución poblacional; aunque es el concepto de cepa dominante el que tiene importancia en una fermentación industrial.

El objetivo de este trabajo es conocer si en las fermentaciones espontáneas se detecta la presencia de levaduras comerciales usadas en la bodega. Para ello se estudió la dinámica de poblaciones durante la fermentación alcohólica de seis mostos tintos procedentes de dos bodegas localizadas en la región de La Mancha.

### Material y Métodos

Durante las vendimia 2006-07, se muestrearon en dos bodegas (A y B) seis depósitos de fermentación espontánea en distintas etapas del proceso (Inicio, Mitad y Final), resultando un total de 18 muestras.

Cada fermentado y sus diluciones seriadas se sembraron en Agar YPD adicionado de tetraciclina y propionato sódico. Tras incubar a 28 °C / 48 h, las placas de las diluciones contables, se replicaron sobre Agar lisina, para discriminar entre cepas *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*. Estas últimas se identificaron a nivel de especie mediante PCR-RFLP, mientras que *Saccharomyces*, se caracterizó intra-específicamente mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial (DNAmT-RFLP).

### Resultados y Discusión

En la bodega A, de los tres tanques muestreados se obtuvo la siguiente distribución: el 75% correspondía a *Saccharomyces* espontáneas, el 15% a la levadura comercial empleada y el resto a no *Saccharomyces*. Estas solo se detectaron al inicio de la fermentación y correspondían a *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Candida norvegica* y *Kluyveromyces thermotolerans*.

En la Figura 1, se muestra la distribución de levaduras en los tanques muestreados. En ella se observa que en la mayoría de los depósitos y en las distintas etapas del proceso se detectó la presencia de la levadura comercial, en distintas proporciones, si bien era más notoria al final de la fermentación, como se observa en la vinificación de Shiraz y Cabernet- Sauvignon, donde se aisló en más de un 60% de los casos.

En la bodega B, empleaban hasta siete levaduras seco-activas diferentes para la elaboración de sus vinos, en cambio algunos mostos de las variedades Tempranillo y Cabernet-Sauvignon fermentaron espontáneamente. En estos últimos se obtuvo que el 34 % correspondía a levaduras *Saccharomyces* espontáneas, un 42 % a las distintas levaduras comerciales y el resto a no *Saccharomyces*

En la Figura 2 se observa cómo en los mostos / vinos de tempranillo, T1, hay una contaminación con la levadura comercial **2** que es masiva en la muestra de mitad de fermentación, y en menor proporción con la **3** (encontrada en todas las etapas) y la **7**.

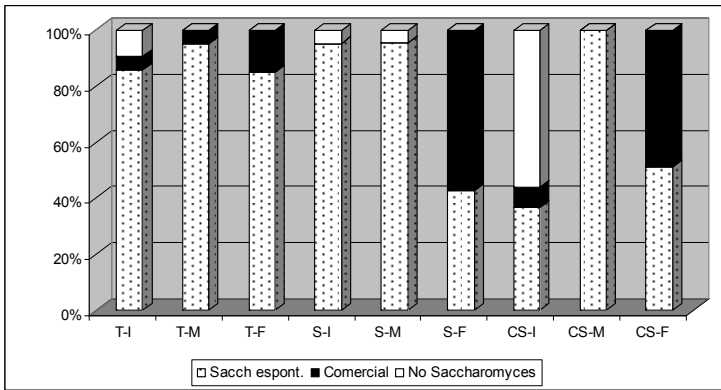


Figura 1. Distribución de levaduras en los depósitos de la bodega A

En *Cabernet Sauvignon*, y en la muestra de Tempranillo, **T2**, la dinámica es similar ya que en ambas fermentaciones, existió un porcentaje pequeño de *Saccharomyces* espontáneas, se aislaron no *Saccharomyces* (*Zygosaccharomyces fermentati*) incluso a mitad y final de la fermentación, hecho inusual, y hubo un predominio de la levadura comercial 1.

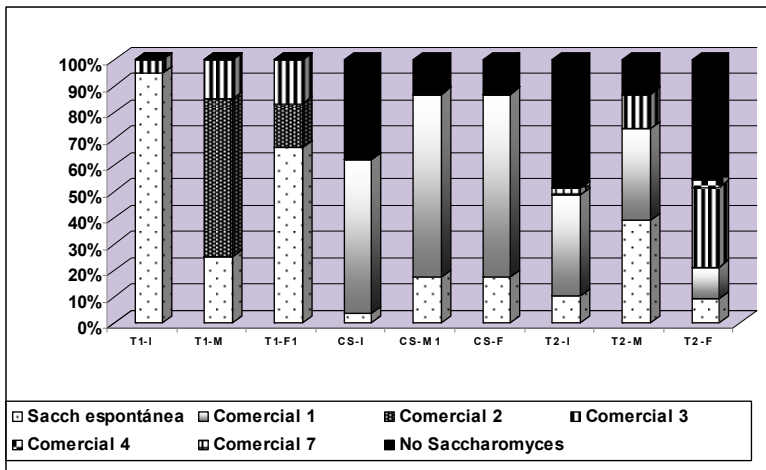


Figura 2. Distribución de levaduras en los depósitos muestreados en la bodega B

### Conclusiones

En estas fermentaciones se muestra de forma clara que las levaduras seco-activas “contaminan” procesos fermentativos espontáneos sustituyendo a las levaduras autóctonas. Diferentes fenómenos, como la limpieza del equipo, los depósitos y los utensilios usados en el trabajo diario de una bodega, tienen que influir de forma decisiva en estos resultados poniendo de manifiesto la creación de un “nicho” ecológico de difícil desplazamiento y de competencias quizás indeseables entre poblaciones de levaduras.

## REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS BIOINMOVILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS DULCES

García-Martínez T.<sup>1</sup>, Peinado R.A.<sup>2</sup>, Moreno J.<sup>2</sup> y Mauricio J.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Edif. Severo Ochoa, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, [mi1gamaj@uco.es](mailto:mi1gamaj@uco.es)

<sup>2</sup>Dpto. Química Agrícola y Edafología, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Edif. Marie Curie, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba.

### - Introducción y Objetivos

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo sacarofílico y en su hábitat se encuentra con elevadas concentraciones de azúcares. Sin embargo, cuando se usa para fermentar mostos con alta concentración en azúcares puede presentarse una serie de problemas como son paradas de fermentación y fermentaciones lentas, que podrían favorecer el desarrollo de microorganismos indeseables, que aumentan la acidez volátil y originan vinos de baja calidad. Posiblemente, estas paradas son consecuencia de las condiciones de estrés en las que se encuentran las levaduras como son la elevada presión osmótica y el etanol producido por ellas que le es tóxico. Para evitar estos problemas, los vinos dulces tradicionalmente se han elaborado mezclando los mostos de uva pasificada con alcohol vínico sin ser éstos sometidos a un proceso de fermentación parcial. Una posible solución podría ser el uso de levaduras inmovilizadas tolerantes a altas concentraciones de azúcares y etanol. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un sistema de bioinmovilización entre una cepa del hongo *Penicillium chrysogenum* (H3) y una levadura de flor *Saccharomyces cerevisiae* (G1), consiguiéndose biocápsulas de levaduras. La aplicación de este sistema de inmovilización de levaduras podría tener una serie de ventajas con respecto a su utilización en forma libre, como son un control adecuado de la fermentación hasta la concentración de etanol deseada, así como, una disminución en los costes debido a la posibilidad de la reutilización de las mismas. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la capacidad de reutilización de la cepa G1 inmovilizada para la fermentación de mostos de uva pasificada y poder reducir el contenido de alcohol vínico añadido a los vinos dulces. Los parámetros cuantificados en las fermentaciones con reutilizaciones sucesivas han sido: cinética de fermentación, azúcares residuales, etanol, polioles, volátiles mayoritarios y compuestos de nitrógeno como aminoácidos, ión amonio y urea.

### - Material y Métodos

#### **Microorganismos**

Para la producción de biocápsulas se ha usado una levadura de flor, *Saccharomyces cerevisiae* G1 (ATCC: MYA-2451) y como hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* H3. El medio de producción de biocápsulas y las condiciones están descritas por Peinado *et al.*, (2006).

#### **Mosto de uva pasa y condiciones de fermentación**

Se ha usado un mosto de uva pasificada al sol de la variedad Pedro Ximénez procedente de la D.O. Montilla-Moriles (Córdoba, España) con 454 g/L de azúcares (glucosa/fructosa equimolar). Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 400 mL de mosto sin esterilizar (matraces de fermentación). Las biocápsulas se confinaron en cilindros de acero inoxidable de 62 cm<sup>3</sup> de volumen con perforaciones de 3 mm de diámetro. Las fermentaciones se realizaron a 24°C.

#### **Métodos analíticos**

Las fermentaciones se monitorizaron por la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado como medida de la pérdida de peso. Los parámetros químicos generales, acidez total, acidez volátil y pH se cuantificaron según los métodos oficiales. Los azúcares (glucosa y fructosa) se han cuantificado según un kit enzimáticos de Boehringer-Mannheim, Alemania. El etanol se cuantificó usando el método de Crowell y Ough. Los compuestos volátiles mayoritarios y polioles se determinaron mediante cromatografía de gases según el método propuesto por Peinado y colaboradores. Para la cuantificación de los aminoácidos se siguió el procedimiento de Mauricio y colaboradores.

### - Resultados y Discusión

La cinética de fermentación de la primera fermentación mostró un retraso en relación a las otras, posiblemente debido a la adaptación de las levaduras al nuevo medio. La actividad fermentativa no se afectó en gran medida por las reutilizaciones (datos no mostrados).

Las tablas 1 y 2 representan los valores de los compuestos químicos analizados en las distintas fermentaciones con biocápsulas de levadura reutilizadas.

**Tabla 1.** Concentraciones de los distintos compuestos de carbono analizados en las fermentaciones con reutilización de biocápsulas de levadura.

COMPUESTOS	MOSTO	INMOV-1	INMOV-2	INMOV-3	INMOV-4	INMOV-5
Etanol % (v/v)	0,2 ± 0,1	13,7 ± 0,2	13,3 ± 0,2	12,7 ± 0,1	8,57 ± 0,1	12,5 ± 0,1
Azúcares Residuales (G + F) (g/L)	454 ± 6	169 ± 4	211 ± 12	233 ± 12	317 ± 9	233 ± 6
Acetaldehído (mg/L)	140 ± 10	155 ± 13	212 ± 18	227 ± 7	261 ± 16	262 ± 3
Acetato de etilo (mg/L)	7,8 ± 0,3	89,55 ± 0,8	37,35 ± 3,3	39,9 ± 0,1	29,7 ± 0,4	48,05 ± 0,6
Metanol (mg/L)	33 ± 0,5	37,15 ± 3,2	39,75 ± 1,8	37,45 ± 0,1	37,4 ± 0,1	41,6 ± 1,1
Propanol (mg/L)	Nd	42,85 ± 5	60,5 ± 0,7	53,7 ± 0,7	54,1 ± 1,1	51,75 ± 1,3
Isobutanol (mg/L)	Nd	55 ± 5,7	51,1 ± 0,1	44,3 ± 0,1	42,2 ± 1,1	43,5 ± 1,4
Isoamílicos (mg/L)	Nd	148 ± 16,7	172,5 ± 2,1	118 ± 7,1	104,7 ± 7,5	98,2 ± 6,0
Acetoína (mg/L)	70,5 ± 4,9	45,2 ± 5,3	85,5 ± 16,3	80,7 ± 1,0	217 ± 24,0	120,5 ± 6,3
2,3-levo (mg/L)	140,5 ± 60	1464,5 ± 32	2300 ± 283	2627 ± 105	2497,5 ± 135	3176 ± 209
2,3-meso (mg/L)	131,5 ± 5	414 ± 75	837 ± 112	941,5 ± 47	913,5 ± 64	1084 ± 69
Succinato (mg/L)	1260 ± 96	1129 ± 160	1590 ± 443	1286 ± 8	1834 ± 135	1610 ± 3
2-Feniletanol (mg/L)	9 ± 3	34 ± 3	40 ± 3	40 ± 1	40 ± 1	43 ± 1
Glicerol (g/L)	Nd	17,4 ± 0,8	22,0 ± 2,8	18,6 ± 0,1	17,1 ± 0,2	21,7 ± 1,1
Acidez Volátil (gACh/L)	0,39 ± 0,0	0,95 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,65 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,6 ± 0,0
Acidez Titulable (meq/L)	92 ± 6	67 ± 3	71 ± 2	73 ± 3	71 ± 1	82 ± 0

**Tabla 2.** Concentraciones de los distintos compuestos de nitrógeno analizados en las fermentaciones con reutilización de biocápsulas de levadura.

COMPUESTOS (mM)	MOSTO	INMOV-1	INMOV-2	INMOV-3	INMOV-4	INMOV-5
L-Pro	25,50 ± 4,7	31,29 ± 2,1	45,01 ± 4,3	27,13 ± 1,1	19,85 ± 0,3	23,55 ± 8,4
L-Arg	1,57 ± 0,4	0,25 ± 0,1	0,38 ± 0,1	0,31 ± 0,1	0,06 ± 0,0	0,17 ± 0,1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2,80 ± 0,3	0,28 ± 0,0	0,31 ± 0,0	0,42 ± 0,0	0,13 ± 0,0	0,58 ± 0,0
GABA	1,71 ± 0,0	1,63 ± 0,7	2,24 ± 0,3	1,74 ± 0,4	1,15 ± 0,0	1,55 ± 0,4
L-Glu	0,47 ± 0,4	0,93 ± ,05	Nd	Nd	0,24 ± 0,2	0,70 ± 0,0
L-Ala	7,41 ± 0,9	8,34 ± 3,6	9,17 ± 0,9	8,39 ± 0,9	5,74 ± 0,0	6,74 ± 1,8
L-Leu	0,45 ± 0,0	1,77 ± 0,0	1,80 ± 1,6	1,96 ± 0,0	1,86 ± 0,2	1,76 ± 0,4
L-Val	1,27 ± 0,3	0,22 ± 0,1	0,57 ± 0,1	0,56 ± 0,2	0,26 ± 0,1	0,24 ± 0,0
L-Gly	1,27 ± 0,2	1,23 ± 0,1	0,75 ± 0,6	0,38 ± 0,0	0,78 ± 0,2	0,86 ± 0,7
L-His	0,41 ± 0,0	0,04 ± 0,1	2,19 ± 0,5	1,27 ± 0,2	0,92 ± 0,1	0,71 ± 0,2
L-Ile+ L-Phe	0,53 ± 0,0	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
L-Gln	1,45 ± 0,2	0,35 ± 0,1	0,44 ± 0,2	0,53 ± 0,0	0,34 ± 0,0	0,87 ± 0,4
Urea	0,02 ± 0,0	0,10 ± 0,0	0,24 ± 0,0	0,15 ± 0,0	0,12 ± 0,0	0,17 ± 0,0
L-Orn	0,49 ± 0,1	0,25 ± 0,0	0,67 ± 0,3	0,29 ± 0,1	0,38 ± 0,1	0,56 ± 0,2
L-Tyr	0,13 ± 0,0	Nd	0,45 ± 0,1	0,90 ± 0,1	0,20 ± 0,0	Nd
L-Lys	0,48 ± 0,1	0,13 ± 0,0	0,20 ± 0,1	0,14 ± 0,0	0,47 ± 0,3	0,39 ± 0,0
L-Ser	0,63 ± 0,0	0,72 ± 0,5	0,60 ± 0,2	0,55 ± 0,0	0,29 ± 0,1	0,47 ± 0,0
Nitrógeno Total	54,6 ± 6,4	49,2 ± 3,2	73,4 ± 8,4	50,7 ± 2,2	39,5 ± 0,9	43,9 ± 10,5

### Conclusiones

La aplicación de biocápsulas de levadura podría ser útil para la vinificación de vinos dulces, por las ventajas que conlleva dicho sistema de bioinmovilización, como son: la facilidad de retirar las biocápsulas en el momento deseado, su reutilización que, además de agilizar el proceso, reduce costes, y también se podrían utilizar en procesos continuos.

### - Referencia Bibliográfica

Peinado R.A., Moreno J.J., Villalba J.M., González-Reyes J.A., Ortega J.M., Mauricio J.C., 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enz Microb Technol*, 40: 79-84.

**Agradecimientos.** Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (AGL2005-01232/ALI) y por fondos FEDER.

**MICROORGANISMOS ENOLÓGICOS PRESENTES EN EL AIRE DE DISTINTAS ZONAS DE UNA BODEGA COMERCIAL EN ÉPOCA DE INACTIVIDAD.**

**Ocón E.<sup>1</sup>, López-Ocón E.<sup>1</sup>, Sanz S.<sup>1</sup>, Olarte C.<sup>1</sup>, Gutiérrez A.R.<sup>1</sup>, López R.<sup>2</sup> y Santamaría P.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Dpto. de Agricultura y Alimentación, Área de Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Rioja. Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, La Rioja. maria-elena.ocon@unirioja.es

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA). Ctra. de Mendavia-Logroño (NA 134, km 88), 26071 Logroño, La Rioja.

**- Introducción y Objetivos**

El vino es un producto cuya elaboración implica complejas transformaciones microbiológicas. La evolución de mosto a vino se lleva a cabo a través de la fermentación alcohólica (FA), proceso realizado por las levaduras. A esta primera transformación le sigue la llamada fermentación maloláctica (FML) producida por las bacterias lácticas. Ambos procesos son útiles en la obtención de vinos de calidad. Tanto las bacterias lácticas como las levaduras, están presentes durante todas las etapas de vinificación: entran con la uva y permanecen en el equipamiento de las bodegas tras la FML (Fugelsang y Edwards, 2007). Además de estos microorganismos útiles, en las bodegas se pueden encontrar otros que provocan alteraciones del vino durante su elaboración y sobre todo en conservación: levaduras filmógenas del grupo no-*Saccharomyces*, levaduras del género *Brettanomyces*, bacterias lácticas y acéticas, mohos,... etc.

La diseminación de los microorganismos por la bodega a través del aire, tanto los útiles como los de alteración, es una línea de trabajo recientemente iniciada: Garijo et al. (2008) indicaron que la presencia en el aire de distintos microorganismos (levaduras, mohos y bacterias) está relacionada con los procesos enológicos que están teniendo lugar en los depósitos durante la época de vendimias. En ese trabajo se indicaba que el número de mohos presentes disminuye al finalizar la entrada de uva en la bodega, el número máximo de levaduras en el aire se encuentra cuando todos los depósitos de la bodega están fermentando y las bacterias lácticas están ausentes hasta que se inicia la primera fermentación maloláctica. En este trabajo se estudia la presencia de distintos microorganismos enológicos (levaduras, bacterias y mohos), en el aire de distintas zonas de una bodega en época de no-vendimias, es decir cuando no se está procesando uva y cuando ningún depósito está fermentando. El objetivo final sería conocer si durante la conservación del vino, el aire podría ser una vía de transmisión de microorganismos en la bodega, como ocurre en el período de vinificación.

**- Material y Métodos**

El trabajo se llevó a cabo en el mes de Febrero de 2008 en una bodega de la D.O.Ca. Rioja. Se tomaron muestras en 4 zonas de la bodega: nave de elaboración (sin actividad), nave de barricas (trasegando y lavando barricas), botellero (envejecimiento en botella) y zona de embotellado (embotellando vino). El muestreo del aire se llevó a cabo utilizando un muestreador ambiental airIDEAL de Biomerieux. El estudio de los diferentes microorganismos se realizó utilizando medios selectivos específicos para cada uno de ellos: Cloranfenicol Glucosa Agar para levaduras totales, Agar Lysina para levaduras no-*Saccharomyces*, DBDM para levaduras del género *Brettanomyces/Dekkera*, Agar Czapek para mohos, y para bacterias lácticas MRS-Agar modificado. El volumen de aire analizado varió en función del microorganismo estudiado entre 100 y 1500 litros. Todos los muestreos se llevaron a cabo por duplicado. Las placas fueron trasladadas al laboratorio e incubadas en las condiciones adecuadas para el crecimiento de cada microorganismo (estufa a 25°C durante 48 horas para levaduras totales y no-*Saccharomyces* y durante 15 días para *Brettanomyces*, Tª ambiente durante 7 días para mohos, y anaerobiosis a 30°C durante 10 días en el caso de las bacterias lácticas). A las placas de levaduras y bacterias, se les adicionaron unos cristales de difenilo para impedir el desarrollo de mohos. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de cada tipo de microorganismo. Simultáneamente al muestreo del aire se midieron los parámetros ambientales en cada zona de la bodega (temperatura, humedad relativa y % de oxígeno y anhídrido carbónico).

**- Resultados y Discusión**

En todas las zonas los microorganismos mayoritarios en el aire son los mohos. En la Tabla 1 se puede ver que de las 4 zonas muestreadas, la nave de barricas es la que tiene una humedad relativa más alta, lo que explicaría que sea la zona donde el crecimiento de mohos es mayor. También es la zona con la temperatura más baja, lo que también podría justificar que sea la zona donde el conjunto de

microorganismos restantes aparecen en menor cantidad. Por el contrario, el botellero (mayor temperatura y menor humedad), es la que tiene menos mohos y mayor población de otros microorganismos. Llamamos especialmente la atención los datos encontrados en la embotelladora: hay crecimiento en todos los medios empleados, y especialmente de mohos y bacterias lácticas. La embotelladora está aislada del resto de la bodega mediante acristalamiento y posee un sistema de extracción del aire por la parte superior, para evitar que el vino se contamine en el momento del llenado. A pesar de ello, el nivel de microorganismos encontrados es elevado.

Un porcentaje elevado de las levaduras que crecen en CGA (levaduras totales) se corresponderían con no-*Saccharomyces* (crecimiento en Agar Lysina), datos que estarían de acuerdo con los encontrados en estudios previos (Santamaría et al., 2005), donde la mayoría de las levaduras encontradas adheridas a materiales, maquinaria y superficies de las bodegas en bodegas vacías pertenecen a estos géneros. En todas las zonas ha habido crecimiento de una colonia en medio DBDM. Este medio es muy selectivo y crecen levaduras *Brettanomyces* y muy pocas otra no-*Saccharomyces*. La posterior identificación molecular de estas 4 colonias nos indicará si efectivamente son levaduras *Brettanomyces* y por lo tanto si el aire es un medio en el que estas levaduras pueden permanecer y contaminar posteriormente los vinos.

Tabla 1.- Datos ambientales tomados simultáneamente al muestreo del aire en distintas zonas de la bodega.

ZONAS	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)	O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)
Elaboración	11,5	68%	20,6	0,0
Barricas	10,3	77%	21,2	0,0
Botellero	11,6	66%	20,6	0,0
Embotelladora	11,4	68%	20,7	0,0

Tabla 2.- Recuento de microorganismos (UFC/500 litros de Aire ó UFC/1500 en medio DBDM) en distintas zonas de la bodega y distintos medios de cultivo.

Medios de cultivo específicos	Zonas de la bodega			
	Elaboración	Barricas	Botellero	Embotelladora
CGA	-	4	17	3
Agar Lysina	11	2	11	2
DBDM	1	1	1	1
MRS Agar	0	0	17	8
Agar Czapek	355	705	170	225

### - Conclusiones

Se han detectado todos los tipos de microorganismos enológicos en el aire de distintas zonas de una bodega en época de no-vendimia. La inexistencia en bibliografía de datos similares en otras bodegas, no permiten determinar si estos valores son normales o no. La posterior identificación de las colonias aisladas, así como un seguimiento continuado a lo largo del año de los microorganismos del aire, permitirá valorar estos primeros resultados.

### - Referencias Bibliográficas

- Fugelsang y Edwards, 2007. Wine Microbiology. Springer Media, LLC, New York.  
 Garijo et al., 2008. *Int.J. Food Microbiol.* DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.014  
 Santamaría et al., 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 49-56.

EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN AUTÓCTONA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN UNA BODEGA DE LA D.O.CA. RIOJA EN SUS 10 PRIMEROS AÑOS DE FUNCIONAMIENTO

Santamaría P.<sup>1</sup>, López R.<sup>1</sup>, Garijo P.<sup>1</sup> y Gutiérrez A.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA). Ctra. de Mendavia-Logroño (NA 134, km 88), 26071 Logroño, La Rioja. microbiologia.cida@larioja.org

<sup>2</sup>Dpto. de Agricultura y Alimentación, Área de Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Rioja. Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, La Rioja.

### - Introducción y Objetivos

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico de transformación del azúcar del mosto en alcohol, a lo largo de una serie de reacciones en cadena catalizadas por los enzimas contenidos en el citoplasma de las levaduras. Desde el punto de vista microbiológico, la fermentación alcohólica espontánea del mosto de uva es un proceso complejo llevado a cabo por la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levadura. Tradicionalmente, el vino se produce por la fermentación natural, conducida por las levaduras que se encuentran en el hollejo de la uva y en las superficies de la bodega. En la bodega, las levaduras que han participado en las fermentaciones de una campaña quedan fijadas sobre suelos, paredes, depósitos, conducciones y maquinaria de procesado. De esta forma permanecen de un año al siguiente, en el que pueden volver a participar en las fermentaciones espontáneas que tengan lugar.

Las levaduras asociadas a la vinificación se pueden agrupar en dos categorías: *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* son los principales agentes de la fermentación. Esta especie presenta una gran diversidad clonal y comprende una gran número de cepas con propiedades tecnológicas extremadamente variables (Ribèreau-Gayon, 1998). En los últimos años se han realizado muchos trabajos sobre la ecología de levaduras vínicas con el fin de establecer si hay estabilidad de estas cepas en las bodegas de un año a otro, es decir si existen "cepas típicas" de un ecosistema (campaña, bodega o región) (Sabate et al., 1998). En este trabajo se comparan las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que condujeron las fermentaciones alcohólicas espontáneas en las campañas de 1998, 1999 y 2000, con las encontradas en las vendimias del año 2006, con el fin de establecer si existen cepas típicas de esa bodega que permanezcan en el ecosistema y guíen las fermentaciones a lo largo de los años.

### - Material y Métodos

El estudio se llevó a cabo en la Bodega Santos Montiel en Tudelilla (La Rioja). La propiedad se inauguró en 1998, y el estudio sobre las levaduras presentes se realizó en los tres primeros años de actividad (1998, 1999 y 2000), y posteriormente en la campaña de 2006. Desde el principio y hasta la actualidad, en esta bodega no se han utilizado levaduras comerciales y todas las levaduras que participan en las fermentaciones son autóctonas.

En los tres primeros años de estudio, el muestreo se realizó eligiendo un depósito y tomando 3 muestras a lo largo de la fermentación: 24 horas de encubado, fermentación tumultuosa y final de fermentación. En el año 2006, se eligieron 3 depósitos que fueron estudiados de forma similar a los de años anteriores. Las muestras se procesaron siguiendo el método de diluciones decimales sucesivas y posterior siembra en placas petri con medio Cloranfenicol Glucosa Agar, incubación a 25°C durante 48 horas y posterior aislamiento al azar de 10 colonias que se almacenaron en Agar Malta hasta su posterior identificación. La pertenencia de las colonias a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, su identificación clonal, así como la comparación de los clones entre si se realizó mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial (Querol et al., 1992). Los índices de diversidad se calcularon siguiendo la fórmula indicada por Bert et al. (1997).

### - Resultados y Discusión

El número de clones distintos identificados en las vendimias de 1998, 1999 y 2000 fueron respectivamente 5, 9 y 8. Los índices de diversidad calculados para cada año, teniendo en cuenta solamente las 2 etapas finales de fermentación (puesto que en la primera, la mayoría de las colonias eran no-*Saccharomyces*), fueron de 0,76, 0,80 y 0,77. Aunque estos índices fueron similares los tres años, en las dos últimas campañas el número de levaduras distintas que participaron en las fermentaciones fue mayor, lo que indicaría una mayor complejidad del ecosistema de la bodega a medida que pasa el tiempo. Al comparar los clones que aparecen en estas tres primeras vendimias, sólo hubo un clon común a las tres fermentaciones, pero su contribución a la fermentación fue significativa en todos los casos: 35%, 33% y 42% del total de cepas presentes. Estos datos sugerirían la existencia de una cepa característica que se ha adaptado al ecosistema de la bodega y que se mantiene de una vendimia a otra. Algunos otros clones aparecieron sólo en dos de las tres vendimias estudiadas. En total, en estos 3 años se encontraron 15 clones diferentes, y un índice de diversidad medio del 0,67.

En los tres depósitos analizados en 2006, se han encontrado 18, 21 y 15 clones distintos respectivamente. Estos números indican que los clones distintos que participan en las fermentaciones se han incrementado considerablemente respecto a lo que ocurría unos años antes, sugiriendo una mayor diversidad y complejidad en el ecosistema. No se ha encontrado ningún clon común a los tres depósitos, aunque si se comparan dos a dos sí se detectan algunos clones compartidos. Estos datos indicarían que no se puede hablar de cepas o clones específicos de una campaña. El número de clones distintos encontrado entre todos los analizados en la campaña de 2006 fue de 18 y el índice de diversidad medio de los tres depósitos del 0,98. Este valor corrobora el aumento de la diversidad con el paso del tiempo indicado anteriormente.

Al comparar los clones de los tres primeros años con los 18 aislados en 2006, ninguna de las cepas identificadas en 2006 coincide con las aisladas en los tres años anteriores, lo que sugiere una gran variabilidad de las levaduras presentes a lo largo del tiempo, y descartaría la idea de una cepa típica de la bodega. Los resultados de los 3 primeros años (menor diversidad y clon común), podrían deberse a que se trataba de las primeras vendimias que se procesaban en la bodega, y que ésta poseía por lo tanto un ecosistema poco evolucionado.

#### **- Conclusiones**

Los resultados obtenidos indican una gran diversidad clonal dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, y una gran variabilidad en los clones que participan en las fermentaciones tanto entre depósitos distintos de una misma campaña vitivinícola, como entre campañas distintas. Estos datos descartarían la idea de cepa típica de un ecosistema (bodega o campaña).

#### **- Referencias Bibliográficas**

Bert F., Branger C., Lambert-Zechiovsky N., 1997. Pulsed-Field Gel Electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Current Microbiology*, 34, 226-229.

Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramón D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by yeasts strains. *Applied Environmental Microbiology*, 58:2948-2953.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 1998. *Traité d'Oenologie*. 1. *Microbiologie du vin*. Vinifications. Ed. Dunod. Paris.

Sabate, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J.M., 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Letters in Applied Microbiology* 26, 452-255.

## MÉTODO RÁPIDO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS VÍNICAS CON DISTINTAS TÉCNICAS MOLECULARES

**Maqueda M.<sup>1</sup>, Zamora E.<sup>2</sup>, Álvarez M.L.<sup>2</sup>, Ramírez M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho, Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz

<sup>2</sup>Estación Enológica, Conserjería Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Extremadura. Almendralejo, Badajoz.

### - Introducción y Objetivos

Las levaduras tienen múltiples aplicaciones biotecnológicas y se requieren métodos rápidos y precisos para su identificación. Tradicionalmente, la taxonomía se ha basado en lentas y tediosas técnicas convencionales que inducen a errores taxonómicos. La identificación de levaduras a nivel de cepa ha mejorado con el uso de técnicas basadas en polimorfismos moleculares (1;3), aunque frecuentemente se necesitan varias de ellas para la identificación precisa. Estas técnicas requieren métodos específicos de extracción de ácidos nucleicos que resultan costosos y largos. En este trabajo se describe un método para el aislamiento simultáneo de mtDNA, DNA nuclear y dsRNA de virus que facilita la caracterización de cepas de levaduras vínicas en estudios ecológicos extensos, resultando un procedimiento sencillo, rápido y económico.

### - Material y Métodos

Se usaron cepas vínicas de *Saccharomyces*: JP41, JP73, JP88, EX149, EX1124 y EX1125. *Método nuevo de extracción de ácidos nucleicos*: Los cultivos de células, 5 ml en YEPD, se centrifugaron, se lavaron con Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM (pH 7.5), centrifugaron de nuevo e incubaron 15 min a temperatura ambiente en 1 ml de Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, pH 9.3/ 2-mercaptoethanol 1%. Seguidamente, se centrifugó, se resuspendieron las levaduras en 1 ml de NaCl 0.1 M/ Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 / Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM / SDS 0.2%, se añadió 0.7 ml de fenol (pH 8), y se incubaron a temperatura ambiente 30 min con agitación. La fase acuosa (con los ácidos nucleicos) se recuperó (700 µl) y, después de añadir 1/10 del volumen (70 µl) de acetato potásico 3M, se precipitaron los ácidos nucleicos con 1 volumen de isopropanol frío, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó (13000 rpm en microcentrífuga, 10 min). El DNA precipitado se lavó con etanol 70%, se secó con centrifuga de vacío (2 min) y se resuspendió en 50 µl de TE pH 8.

*Método rápido simplificado de extracción de ácidos nucleicos de López et al. (6)*: El cultivo de levaduras, 1.5 ml en GYP, fue centrifugado, lavado en agua estéril y resuspendido en 0.1 ml de sorbitol 1 M / EDTA 0.1 M pH 7.5. Después de añadir 4 µl de una solución de 20 mg/ml de Zymolyasa 60, las muestras se incubaron 20 min a 37 °C. Los esferoplastos obtenidos se centrifugaron en una microfuga (10000 rpm, 1 min) y se resuspendieron con 0.1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 / EDTA 20 mM. Después de añadir 2.5 µl de SDS 10%, la mezcla se incubó 5 min a 65°C. Inmediatamente, se añadió 40 µl de acetato potásico 5 M y los tubos se colocaron en hielo 5 min. Se centrifugó (13000 rpm, 15 min) a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microfuga, el DNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol frío, se incubó 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugó (13000 rpm, 10 min). El DNA precipitado se lavó con etanol 70%, se secó con centrifuga de vacío (2 min), y se resuspendió en 16 µl de TE pH 8.

*Caracterización de levaduras*: Cada cepa se caracterizó mediante electroforesis en gel de los dsRNA de virus (4 µl, agarosa 0.8%, TAE 1×), de los fragmentos de restricción del mtDNA (3 µl, agarosa 0.7%, TBE 0.5×, después de digestión con *RsaI* durante 2 horas a 37°C (7)), y de los amplificadores (3 µl, agarosa 1%, TAE 1×) obtenidos mediante PCR de secuencias microsatélite (GAC)<sub>5</sub> (2).

### - Resultados y Discusión

Se compararon los dos métodos rápidos de extracción de ácidos nucleicos. El nuevo método es una versión simplificada basada en otro método ya simplificado (8) para extraer dsRNA de virus (5), y que hemos reducido de 124 a 72 minutos. El segundo, es una versión simplificada realizada por López *et al.* (6) de otro previo para la extracción de mtDNA (7).

El nuevo método y el método simplificado de López *et al.* (6) son similares en rapidez (72 versus 68 min, respectivamente) y permiten obtener mtDNA con un rendimiento similar. Sin embargo, el método nuevo es más simple (menos pasos) y más económico porque no necesita enzimas para romper la pared celular. Además, se obtiene mayor volumen de muestras (50 µl versus 16 µl) de forma más limpia, se aísla correctamente ScV-LA y ScV-M2 dsRNA ya que se previene su hidrólisis con el uso de fenol), y también permite el aislamiento de suficientes cantidades de DNA nuclear como para amplificar mediante PCR el gen del rRNA 18S para secuenciación e identificación (4) de levaduras vínicas (*S.cerevisiae*, *C.tropicalis*,

*K.apiculata*, *M.pulcherrima*, *K. waltii*, *I.orientalis*, *H.guilliermondii*, y *H.uvarum*) (datos no mostrados), o de microsátélites para la tipificación de distintas cepas de levaduras (Fig. 1 C).

**- Conclusiones**

El nuevo método facilita la tipificación de levaduras vínicas evitando el uso de varios métodos específicos para el aislamiento de cada tipo de ácido nucleico, pudiendo resultar particularmente rápido y barato en estudios ecológicos extensos donde se requieran múltiples técnicas moleculares para la identificación precisa de cepas de levaduras.

**- Referencias Bibliográficas**

- 1 Ambrona, J., Maqueda, M., Zamora, E., and Ramírez, M. 2005. Sulfometuron resistance as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *J. Agric. Food Chem.* 53:7438-7443.
- 2 Baleiras Couto, M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Veld, J. H., and Vossen, J. M. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:41-46.
- 3 Degre, R., Thomas, D. Y., Ash, J., Mailbiot, K., Morin, A., and Dubord, C. 1989. Wine yeast strain identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 40:309-315.
- 4 Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L., and Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2942-2951.
- 5 Fried, H. M. and Fink, G. R. 1978. Electron microscopic heteroduplex analysis of killer double-stranded RNA species from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4224-4228.
- 6 López, V., Querol, A., Ramón, D., and Fernández-Espinar, M. T. 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68:75-81.
- 7 Querol, A., Barrio, E., and Ramón, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.* 15:439-446.
- 8 Sommer, S. S. and Wickner, R. B. 1982. Co-curing of plasmids affecting killer double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: [HOK], [NEX], and the abundance of L are related and further evidence that MI requires L. *Journal of Bacteriology* 150:245-251.

**- Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos: IFD97-1074 (DIGESIC, FEDER I+D), 2PR01B002 y 2PR04B003 (Junta de Extremadura). Matilde Maqueda ha sido becaria del Ministerio de Educación y Ciencia.

## EFICACIA DE LA MICROFILTRACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE VINOS EMBOTELLADOS: IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MICROBIANAS MÁS FRECUENTES

Polo L.<sup>1</sup>, Ferrer S.<sup>1</sup> y Pardo. I<sup>1</sup>

ENOLAB <sup>1</sup>Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Valencia, [lucia.polo@uv.es](mailto:lucia.polo@uv.es)

### Introducción y Objetivos

Los productores de vinos deben seguir ciertos pasos en la limpieza y desinfección de sus bodegas para cumplir con las normas y estándares de calidad exigidos. La ley que regula la elaboración de vinos y el cumplimiento de estándares y normas de calidad, ha llevado al establecimiento de manuales y procedimientos que van desde guías de buenas prácticas, hasta el desarrollo de sistemas de HACCP (Aplicación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en vinos) y de certificaciones como ISO 9001 e ISO 14000. En el Reglamento Sanitario de los Alimentos se señala que la limpieza consiste en eliminar los residuos visibles, como polvo, tierra y grasa y que una buena higienización comprende la reducción de los microorganismos [1], pero no se especifican concentraciones máximas permitidas de estos últimos en vinos terminados. En la industria enológica se ha dado poca importancia al control microbiológico de los vinos embotellados, en parte porque los microorganismos existentes no suponen un riesgo grave sobre la salud, y en parte porque no hay legislación al respecto. De cualquier forma, el enólogo es consciente de que la presencia de microorganismos vivos puede producir alteraciones sobre todo en aquellos vinos con un alto contenido en azúcares residuales. Por ello ha introducido técnicas como la microfiltración para garantizar la estabilidad microbiológica del vino embotellado. En la actualidad, las pocas referencias que existen sobre concentraciones aceptables de microorganismos en vinos embotellados, son sólo recomendaciones o hacen referencia a límites establecidos por los países importadores. Los objetivos de nuestro trabajo han sido mostrar la eficacia de los tratamientos de filtración para garantizar la estabilidad microbiológica y conocer cuál es la incidencia de los microorganismos en vinos embotellados. Ello permitirá recopilar datos que pueden ser de utilidad para el establecimiento de una normativa microbiológica y de protocolos que garanticen la salud del consumidor y la estabilidad del producto.

### Material y Métodos

Se analizaron volúmenes de hasta 100 ml de 42 vinos jóvenes, crianzas y reservas de bodegas de diferentes Denominaciones de Origen. Se analizó la población microbiana antes (vino base) y después de la microfiltración (vinos embotellados). Las muestras directas, diluidas o concentradas se sembraron en placas de MRS (Scharlab), y MLO [2] para el aislamiento de bacterias lácticas, GPYA para el de levaduras [3], CA sin CaCO<sub>3</sub> para el de bacterias acéticas [3]. Las placas se incubaron a 28°C durante 2 a 7 días. La identificación de las bacterias lácticas y acéticas se realizó por la técnica de 16S-ARDRA. El fragmento amplificado se digirió por separado con los enzimas *MseI*, *BfaI* y *AluI* y los fragmentos digeridos se separaron por electroforesis en agarosa al 2% [4,5]. La identificación de las levaduras se realizó mediante restricción (*CfoI*, *HaeIII* y *HinfI*) de ITS, según [6]. Los perfiles de restricción de los aislados fueron comparados con perfiles de cepas de referencia en nuestra base de datos.

### Resultados y Discusión

El proceso de filtración mediante los sistemas de filtros empleados más comúnmente en enología garantiza la eliminación de la mayor parte de levaduras en el vino base, pero no de las bacterias. Aunque se aprecian disminuciones importantes en los recuentos de bacterias viables tras la filtración, la cantidad de estas bacterias residuales pueden ser lo suficientemente significativa como para dar lugar a alteraciones posteriores. Las especies de levaduras identificadas en vinos embotellados aparecían ya en el vino base, aunque la diversidad es menor como consecuencia de la disminución en su concentración. Las únicas bacterias aisladas en vinos filtrados y embotellados pertenecen a la especie *Acetobacter aceti*, mientras que en vinos base jóvenes, aparecía también *Oenococcus oeni*. La microfiltración parece retener mejor las células de *O. oeni* que las de bacterias acéticas, posiblemente porque las primeras forman cadenas de células que son retenidas mejor por los filtros. Los recuentos de microorganismos y especies encontrados antes y después del filtrado se muestran en la siguiente Tabla:

Tipo de Muestras	Jóvenes	Crianzas	Reservas
Nº de muestras analizadas	22	7	13
Recuentos de levaduras en vino base (ufc/ml)	$1.2 \times 10^{-1} - 1.2 \times 10^3$	$7.2 \times 10^{-1} - 7.8 \times 10^3$	$3.0 \times 10^{-1} - 4.0 \times 10^2$
Especies de levaduras identificadas en vino base	Zygosaccharomyces bailii  <i>Pichia membranaefaciens</i> Saccharomyces cerevisiae Candida vinaria Candida maltosa Candida sorbosa Candida montana Candida intermedia	<i>Pichia membranaefaciens</i> Saccharomyces cerevisiae	<i>Pichia membranaefaciens</i> Saccharomyces cerevisiae
Recuento de bacterias en vino base (ufc/ml)	$7 - 3.6 \times 10^5$	$1.8 \times 10^1 - 7.7 \times 10^3$	$2 - 8.1 \times 10^5$
Especies de bacterias identificadas en vino base	Oenococcus oeni  <i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
Recuento de levaduras en vinos filtrados (ufc/ml)	$< 1 \times 10^{-2} - 5$	$< 1 \times 10^{-2} - 8 \times 10^{-2}$	$< 1 \times 10^{-2} - 2 \times 10^{-2}$
Especies de levaduras identificadas en vinos filtrados	Zygosaccharomyces bailii  <i>Pichia membranaefaciens</i> Saccharomyces cerevisiae Candida maltosa Pichia anomala	Zygosaccharomyces bailii  <i>Pichia membranaefaciens</i> Candida vinaria	Zygosaccharomyces bailii  <i>Pichia membranaefaciens</i> Saccharomyces cerevisiae Candida vini Candida vinaria Candida montana
Recuento (ufc/ml) de bacterias en vinos filtrados	$< 1 \times 10^{-2} - 1.2 \times 10^4$	$3.6 \times 10^{-1} - 7.8 \times 10^3$	$< 1 \times 10^{-2} - 1.1 \times 10^3$
Especies de bacterias identificadas en vinos filtrados	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i>

### Conclusiones

1- La microfiltración reduce la carga microbiana, particularmente la de levaduras. Existen concentraciones de bacterias acéticas en vinos microfiltrados que pueden comprometer la calidad del vino embotellado.

2- La bacteria que encontramos en vinos filtrados y embotellados es *A. aceti*.

### Referencias Bibliográficas

- 1- Molina *et al.*, 2006 Sanitización en la industria enológica. Bebidas Mexicanas. Agos-sept 2006: 8-12.
- 2- Maicas, *et al.* 2000. MLF in wine with high densities of non-proliferating *O. oeni*. World. J. Microb. Biotech. 16: 805-810.
- 3- Belloch, *et al.* (Eds). 1998. Catálogo de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo.
- 4- Rodas, *et al.* 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:197-207.
- 5-Blasco, *et al.* Comparison between 16S-ARDRA, specific PCR and FISH for identification of acetic acid bacteria from grape must and wine. Int. J. Food Microbiol. (submitted).
- 6- Esteve-Zarnoso, *et al.* 1999. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8s rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bact. 49: 329-337.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a A. Rodas su colaboración. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RM 2007-407-00-00.

## OFF-ODOR DEVELOPMENT IN NON-AMENDED CORK MATRICES BY ISOLATED BACTERIA AND FUNGI

Prat C.<sup>1,2</sup>, Trias R.<sup>2</sup> Anticó E.<sup>1</sup> and Bañeras L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpt. of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Girona, Campus Montilivi s/n, E-17071 Girona, chantal.prat@udg.edu

<sup>2</sup>Molecular Microbial Ecology Group (Institute of Aquatic Ecology), University of Girona, Campus Montilivi s/n, E-17071 Girona.

### Introduction and Aim

Cork stoppers provide the desired level of elasticity and strength to fulfill an effective and safe closure of bottles of most wine types [7]. The natural origin of cork and the long manufacturing process of stoppers contribute to the development of a true microbial ecosystem over the surface of this material that has prompted the implication of stoppers in the formation of sensory deviations altering wine. Although the list of possible compounds developing unpleasant aromas in cork is relatively large, the main incidence of musty-earthly off-odors relies in (TCA), 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine (MDMP) and 2,4,6-tribromoanisole (TBA)[5, 8]. Microorganisms, bacteria and fungi, contribute to the formation of these compounds. The biological synthesis and accumulation of chloroanisoles, mainly TCA, by the biomethylation of 2,4,6-trichlorophenol (TCP) is well known [2]. Besides, the participation of bacteria in the production of guaiacol, geosmin and pyrazines has been described experimentally [1, 3, 6]. However, most of the reported works using isolated bacteria and fungi show the production of off-odor compounds at ideal conditions, i.e. using either complex media or using substrate amended cork matrices. In the present work we have evaluated the potential risk of off-odor development of a collection of 20 bacteria and 19 fungi isolated from cork samples. Tests have been made in three different cork matrices consisting of cork granules, natural cork stoppers and agglomerated cork stoppers in undisturbed conditions.

### Material and Methods

Samples were obtained from tainted cork samples using conventional washes in isotonic solution and a dilution series. Luria-Bertani agar (LB) plates supplemented with nistatin and Rose Bengal Agar (RBA) or Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with chloramphenicol were used for the isolation of bacteria and fungi, respectively. Identification of strains was done by comparison of partial 16S rRNA gene or the ITS-I sequences with GenBank databases. All cultures were incubated at ambient temperature.

Bacterial and fungal suspensions containing  $10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> or  $5 \cdot 10^4$  spores mL<sup>-1</sup>, respectively were inoculated into cork samples. Three different cork matrices were used: cork granules, natural cork stoppers and agglomerated cork stoppers. Agglomerated and natural cork stoppers were soaked in the corresponding microbial suspension for 3 s to ensure an even distribution of the inoculums and corks distributed individually in sterile bottles. Bottles containing 5 g of granulated cork were sterilized and inoculated with 1 ml of the bacterial or fungal suspensions and homogenized. Cork samples were incubated at 25 °C during 30 days. After the incubation period, cork samples were macerated for 24 h in double distilled water and were inspected by qualified personnel. All the tests were run in triplicate. Sensory deviations were classified according to standards for wine and cork.

Chemical analysis of cork macerates was carried out by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography coupled to an ion trap mass spectrometer detector. A DVB/CAR/PDMS fiber was used with a 5 mL sample containing 1.5 g of NaCl. Extraction was performed under stirring conditions for a period of time of 30 minutes at 50 °C [4]. The chromatograms were acquired in scan mode and further examined to ascertain the presence of musty-earthly compounds. From the peak areas, concentrations in cork samples were calculated by interpolating in a calibration curve using *d*<sub>5</sub>-TCA as internal standard.

### Results and Discussion

*Pseudomonas* spp. strains (50%) were the identified as the most abundant isolates obtained from tainted cork samples. Other  $\gamma$ -*proteobacteria*, such as *Enterobacter* sp. and *Stenotrophomonas maltophilia*, were also identified on the basis of partial 16S rRNA sequence homologies. *Bacillus* spp. strains were also abundant and covered 25% of the isolates. *Curtobacterium flacumfaciens* and *Phyllobacterium mirsinacearum* isolates were also obtained. All filamentous fungi isolates were identified as *Penicillium* sp. (10 strains) or *Trichoderma viride* (3 strains) according to sequence homologies of the ITS-I region. Yeast isolates were identified as *Aureobasidium pullulans*, *Sporidiobolus salmonicolor* and *Rhodotorula* sp. In order to summarize the obtained data, isolates were grouped as Bacteria, Filamentous fungi or Yeasts.

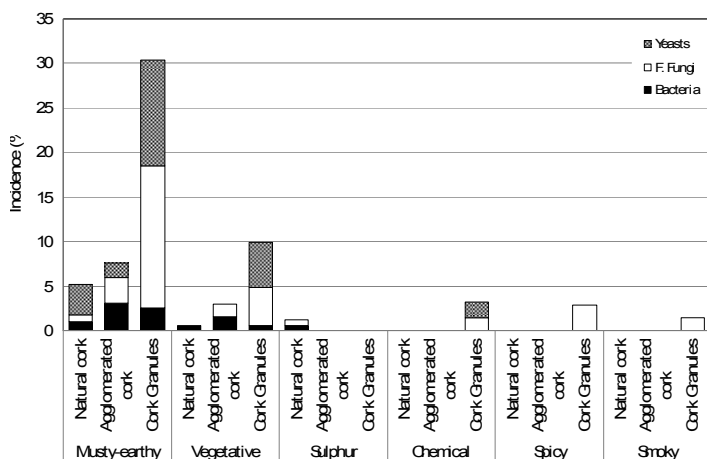


Figure 1. Incidence (%) of different off-flavor deviations in cork matrices. Three replicates of every cork matrix were used for every isolated strain.

The incidence of sensory deviations varied significantly according to the used cork matrix and the type of microorganism incubated (Figure 1). Cork granules were found to be the most sensitive substrate for the development of unpleasant odors for almost all descriptors encountered. On the contrary, natural cork was found to be the safer material. Differences may be due to the significant increase in the exposed surface (cork granules) or the use of organic glues for cork stabilization (agglomerated corks). Musty-earthy off-odors were mostly produced when either filamentous fungi or yeasts were inoculated on cork.

*Penicillium* sp. strains were further investigated as main off-odor producers in cork granules. Chemical analyses revealed that TCA was the only molecule found

above the detection limit of the method.

Most of the strains did not show significant increases of TCA when compared with the non-inoculated controls (Table 1). Strains F001 and F003A were able to develop an intense musty-earthy aroma, which was reflected in the increase in the TCA production.

### Conclusions

In conclusion, cork granules were shown to be the most sensitive material with respect to off-odor development when selected microorganisms were used as inoculums. Most of the musty-earthy odors were produced when fungi, specially *Penicillium* sp. isolates, were used and bacterial isolates contributed less to sensory deviations. Interestingly, the TCA production capacity in non amended conditions in cork is not a species specific trait as suggested for the obtained results.

### References

1. Alvarez-Rodriguez ML, Belloch C, Villa M, Uruburu F, Larriba G, Coque JJ (2003) FEMS Microbiol Lett 220:49
2. Álvarez-Rodríguez ML, López-Ocaña L, López-Coronado JM, Rodríguez E, Martínez MJ, Larriba G, Coque JJR (2002) Applied and Environmental Microbiology 68:5860
3. Dickschat JS, Reichenbach H, Wagner-Döbler I, Schulz S (2005) Eur J Org Chem 19:4141
4. Prat C, Bañeras L, Anticó E (2008) Eur Food Res Technol (DOI 10.1007/s00217-008-0823-0)
5. Sefton MA, Simpson RF (2005) Australian Journal of Grape and Wine Research 11:226
6. Silva Pereira C, Figueredo Marques JJ, San Romão MV (2000) Critical Reviews in Microbiology 26:147
7. Silva A, Lambri M, De Faveri MD (2003) European Food Research and Technology 216:529
8. Soleas GJ, Yan J, Seaver T, Goldberg DM (2002) J Agric Food Chem 50:1032

Table 1. Mean concentration of produced TCA ( $\pm$  SE) in 30 days incubation in cork granules by different *Penicillium* strains. Three replicates were used unless indicated (<sup>a</sup>).

<i>Penicillium</i> sp. strain number	TCA produced (ng/g cork)	Related sequence
F001	15,2 $\pm$ 14,0 <sup>a</sup>	<i>Penicillium glabrum</i>
F002	0,5 $\pm$ 0,1	<i>Penicillium roquefortii</i>
F003A	34,6 $\pm$ 24,5	<i>Penicillium</i> sp.
F003B	0,8 $\pm$ 0,3	<i>Penicillium glabrum</i>
F004	1,6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	<i>Penicillium roquefortii</i>
F005	0,5 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	<i>Penicillium glabrum</i>
F006	0,4 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	<i>Penicillium glabrum</i>
F017	0,7 $\pm$ 0,2	<i>Penicillium glandicola</i>
F018	0,8 <sup>a</sup>	<i>Penicillium glabrum</i>
Control	0,8 $\pm$ 0,2	Non inoculated

## INFLUENCIA DEL MANEJO DEL SUELO SOBRE LA PRESENCIA DE LEVADURAS FERMENTATIVAS EN EL VIÑEDO

Ramírez, M.<sup>1\*</sup>, Muñoz, A.<sup>1</sup> y López-Piñero, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área de Microbiología, Universidad de Extremadura. Avda Elvas, s/n. 06071 Badajoz. \*Email:mramirez@unex.es. <sup>2</sup>Área de Edafología y Química Agrícola, Universidad de Extremadura.

### - Introducción y Objetivos

Diversos estudios indican que las levaduras presentes en las uvas se ven afectadas por las condiciones climáticas (temperatura y lluvia), la localización geográfica del viñedo (Parrish y Carroll 1985; Longo *et al.* 1991), el tipo de suelo (Poulard *et al.*, 1980), la edad del viñedo, la variedad de la uva, y la técnica de vendimia (Martini *et al.*, 1980; Pretorius *et al.*, 1999). Pero existen muchas dudas acerca de la procedencia de estas levaduras dentro del propio viñedo. Una posibilidad es que el suelo actúe como reservorio de estas levaduras, que posteriormente pasarían a la uva madura y realizarían la fermentación espontánea del mosto. Nuestro objetivo es corroborar la presencia de levaduras fermentativas en los suelos del viñedo y determinar la influencia de dos manejos diferentes del cultivo en la presencia de estas levaduras.

### - Material y Métodos

Se seleccionaron dos viñedos contiguos de siete años de antigüedad con la variedad *Tempranillo*. VC: Viñedo de Conservación (mantiene una cobertura vegetal espontánea a lo largo de todo el año) y VT: Viñedo Tradicional (utiliza el arado). Las muestras de suelo se tomaron bajo la hilera de los viñedos (H) a una profundidad de 0-10 cms. Además, en VC se tomaron muestras entre las calles (EC). Se realizaron fermentaciones de mosto estéril inoculado con suelo a lo largo del ciclo del cultivo (M1: tres meses antes de vendimia, M2: antes de vendimia, M3: después de vendimia y M4: tres meses después de vendimia). Se inocularon  $3 \times 10^{-2}$  g/mL de cada muestra de suelo en mosto blanco estéril (variedad *Macabeo*, pH 3.3) y se realizó un seguimiento de la fermentación durante 30 días midiendo los °Brix con un refractómetro. Los análisis microbiológicos se realizaron en las etapas: antes de fermentación, inicio de fermentación, fermentación tumultuosa, y final de fermentación. Se sembraron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  en YEPD-agar para hacer el recuento de viables (ufc/mL), analizar las poblaciones dominantes en cada fase, aislar colonias, y secuenciar el DNA (RNA 16S) de las levaduras para su identificación.

### - Resultados y Discusión

Los parámetros edafológicos indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los suelos de los dos manejos. VT mantuvo niveles de humedad y materia orgánica por debajo de VC a lo largo de todo el ciclo anual y un nivel de compactación muy superior. Se ha descrito que la humedad y la materia orgánica del suelo son factores esenciales en el desarrollo de las poblaciones microbianas. Cuanto más se reduce la humedad y la materia orgánica con el arado del suelo, más se deteriora la biomasa microbiana (Calderon *et al.*, 2000). De acuerdo con esto, el suelo VT tuvo una diversidad microbiana considerablemente menor ( $p < 0.05$ ) que el VC (tanto en EC como en H) durante todo el ciclo anual y un menor número de bacterias y levaduras. Se observó una correlación positiva ( $p < 0.01$ ,  $r = 0.624$ ) entre el contenido de materia orgánica y el número de microorganismos totales del suelo. La presencia de levaduras en el suelo de los dos viñedos estuvo condicionada ( $p < 0.01$ ,  $r = 0.765$ ) por la fecha de muestreo, correspondiendo la mayor cantidad de levaduras con fechas cercanas a vendimia.

En el experimento de inoculación de mosto estéril con suelo para buscar levaduras fermentativas en el viñedo, ninguna de las tres repeticiones de mosto estéril control (sin inocular) inició la fermentación, mientras que sí iniciaron las 12 vinificaciones inoculadas con suelo, aunque no todas lograron completarla. Las fermentaciones inoculadas con suelo recogido justo después de vendimia (M3) tuvieron un  $T_{15}$  y un  $T_{100}$  menor que las inoculadas con el resto de las muestras. Esto indica una presencia en el suelo de levaduras fermentativas resistentes al alcohol, y capaces de terminar la fermentación de mosto. La presencia de levaduras fermentativas tras la vendimia en todos los puntos de muestreo puede deberse a la presencia de azúcares procedentes de las uvas maduras en el suelo. Las levaduras pueden crecer en el mosto que se libera en el entorno de los estomas de las uvas sanas o en uvas dañadas por hongos, insectos, o pájaros; y, posteriormente, ser diseminadas por insectos, pájaros, roturas en los hollejos, viento, etc. Probablemente, la cantidad de levaduras fermentativas del suelo VC-EC tras la vendimia (M3), un lugar más apartado de los racimos que los otros dos puntos de muestreo (VC-H y VT), se deba al proceso de vendimia. En este momento caen al suelo ciertas cantidades de zumo y uva por todo el viñedo, que aumentan el azúcar disponible favoreciendo el desarrollo y diseminación de levaduras fermentativas. Las fermentaciones

inoculadas con suelo de VC-H fueron significativamente más rápidas (menor  $T_{15}$  y  $T_{100}$ ) que las inoculadas con suelo de VC-EC y VT recogidas a lo largo del año. Es decir, el suelo VC-H parece ser un reservorio de levaduras fermentativas durante todo el año, mientras que en el resto de suelos su presencia se circunscribió a las fechas de maduración de la uva y vendimia (Tabla 1). Se ha descrito que más de la mitad de la diversidad de levaduras del suelo se encuentra en la materia en descomposición de la superficie, produciéndose un descenso cuantitativo al descender en profundidad (Wuczkowski y Prillinger, 2004). En concordancia, nosotros encontramos más levaduras en el suelo de VC que en VT, pues el primero mantiene una cubierta vegetal con más residuos orgánicos en descomposición y no se mezcla con el arado, como sí ocurre en VT, donde las zonas más profundas, con menor cantidad de levaduras, son trasladadas a la superficie, originándose un efecto de dilución.

**Tabla 1.** Medias de  $T_{15}$  y  $T_{100}$  (días) de las fermentaciones inoculadas con suelo

Manejo	M1		M2		M3		M4	
	$T_{15}$	$T_{100}$	$T_{15}$	$T_{100}$	$T_{15}$	$T_{100}$	$T_{15}$	$T_{100}$
VC H	4,85a	13,96a	4,50a	15,00a	5,26a	15,52a	6,17a	17,60a
VC EC	13,18b	35,00b	7,50b	35,00b	6,93a	19,60a	11,10a	35,00b
VT	11,53b	35,00b	7,80b	35,00b	5,13a	13,96a	10,18a	35,00b

ANOVAs y tests de Duncan para comparar los diferentes manejos. Los datos en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel  $P < 0.05$ .  $T_{15}$  y  $T_{100}$ : tiempo necesario para consumir el 15% o 100% de los azúcares reductores del mosto respectivamente.

Las levaduras que dominaron el proceso de fermentación fueron *Torulaspora*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces cerevisiae* "sensu stricto". Las levaduras *Saccharomyces* se impusieron en las fermentaciones inoculadas con muestras M3 (>40% en VC-EC, y >80% en VC-H y VT) y en el resto de muestras de VC-H (>60% en M1, M2 y M4). Por otra parte, indicar que se aislaron numerosos hongos en aquellas muestras que no consiguieron terminar la fermentación del mosto.

#### - Conclusiones

Las inoculaciones de mosto estéril con muestras de suelo confirmó la presencia de levaduras fermentativas en el suelo después de la vendimia tanto en viñedo de conservación como en viñedo tradicional, e incluso en otras épocas del año para en la zona bajo hilera de vides en viñedo de conservación, indicando que este punto de muestreo puede actuar como un reservorio anual de levaduras fermentativas responsables de las fermentaciones espontáneas de los mostos.

#### - Referencias Bibliográficas

- Calderon, F.J., Jackson, L.E., Scow, K.M., Rolston, D.E., 2000. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1547-1559.
- Longo, J., Cansado, D., Agrelo, D., Villa, T.G., 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 141-144.
- Martini, F., Federichi, F., Rosini, G., 1980. A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology* 26, 856-859.
- Parrish, M.E., Carroll, D.E., 1985. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis Rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture* 12, 3-31.
- Poulard, L., Simon, L., Cuinier, C., 1980. Variabilité de la microflore levurienne de quelques terroirs viticoles du pays Nantais. *Connaissance Vigne et Vin* 14, 219-238.
- Pretorius, J., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20 (1999), pp. 61-74. *South Africa Journal of Enology and Viticulture* 20, 61-74.
- Wuczkowski, M., Prillinger, H., 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria (Nationalpark Donauauen). *Microbiological Research* 159, 263-275.

**POLIMORFISMO CROMOSÓMICO DE LAS LEVADURAS DE FLOR  
DE UN VINO FINO ECOLÓGICO**

**Sancho Prieto M., Sancho ED.**

Dpto. de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes,  
Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 - Córdoba, [edsancho@uco.es](mailto:edsancho@uco.es)

**- Introducción y Objetivos**

Las levaduras responsables de la elaboración de vinos finos de crianza en la región vitivinícola de “Montilla-Moriles” (Córdoba) corresponde a distintas razas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Dicha microbiota ha sido caracterizada, destacando la estabilidad de las poblaciones, el aislamiento sexual existente entre ellas y el bajo grado de polimorfismo genético (Fernández A, 2006; Sancho y col., 1986). Por otra parte, en la misma zona y desde 1999, se viene elaborando un vino fino de crianza “ecológico”, mediante procedimientos naturales respetuosos con el medio ambiente. En ningún momento se aplican productos químicos no naturales; además, la fermentación debe ser realizada por cepas silvestres y las operaciones enotécnicas de correcciones y ajustes están muy restringidas. En el presente trabajo se estudia el grado de polimorfismo cromosómico presente en las levaduras de la crianza de un vino fino ecológico, elaborado en unas condiciones de vinificación notablemente diferentes a las tradicionales.

**- Material y Métodos**

Se tomaron muestras de las botas de envejecimiento correspondientes a la elaboración de un vino fino ecológico (Bodegas Robles, Montilla). El aislamiento de las levaduras, se realizó por siembra en placas (YPD + tetraciclina 100 µg/ml) y posterior incubación (28 °C, 48 h), eligiéndose 160 cepas de crianza (3ª, 2ª y 1ª criaderas y solera, a razón de 40 cepas por escala).

La identificación de los aislados se basó, en primera instancia, en determinaciones fisiológicas y metabólicas: crecimiento en lisina como única fuente nitrogenada, asimilación de nitrato, fermentación de azúcares (gal, mal, sac), formación de velo y comportamiento frente al litio (10 – 200 mM LiCl). Dado que las pruebas taxonómicas convencionales pueden resultar insuficientes para discriminar a nivel de razas, se completó la caracterización con la determinación del cariotipo por electroforesis de campo pulsante –PFGE-, según el protocolo de Casaregola y col.(1998), parcialmente modificado. Se utilizó un equipo de la firma Bio-Rad (CHEF-DRIII System y cámara GelDoc-3000).

**- Resultados y Discusión**

La observación microscópica de la morfología celular de los aislados, así como los resultados de las primeras pruebas (crecimiento en lisina, asimilación de nitrato) permitieron descartar 28 cepas que no pertenecían al género *Saccharomyces*. Las cepas restantes fueron identificadas en base a su patrón de fermentación de azúcares más las pruebas adicionales antes mencionadas. Los resultados obtenidos (formación de velo por la totalidad de las cepas; alta sensibilidad al litio, ninguna cepa creció en 50 mM y el 85 % toleró 30 mM LiCl; fermentación de la sacarosa) denotaron el predominio casi absoluto de la raza *capensis* (96 %). Este porcentaje es muy similar al encontrado en los vinos finos tradicionales de la misma región vitivinícola.

La electroforesis del ADN total en campo pulsante se realizó a 56 cepas de crianza (raza *capensis*, 14 cepas de cada escala). Se determinaron 4 cariotipos distintos, que se numeraron por orden de aparición (I, II, III y IV). Las diferencias más destacables encontradas, al compararse con un marcador de *S. cerevisiae* (YNN295) fueron (Tabla 1): desaparición del cromosoma XII; existencia de un cromosoma entre el IV y XV, existencia de un cromosoma sobre el XV, cromosomas II y X separados del XIV, y cromosomas VI y I separados. La figura 1 muestra la distribución de los cariotipos detectados. A lo largo de la escala de envejecimiento predominó el patrón II, que se distribuye a lo largo del proceso, coexistiendo en las primeras escalas con los patrones restantes. Dicho patrón terminó por imponerse en la solera, donde fue el único encontrado.

Tabla 1. Cariotipos de las cepas de levadura de crianza.

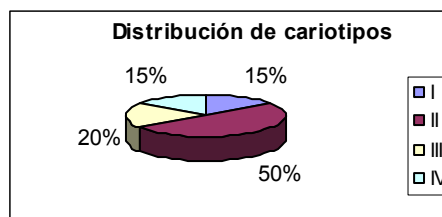
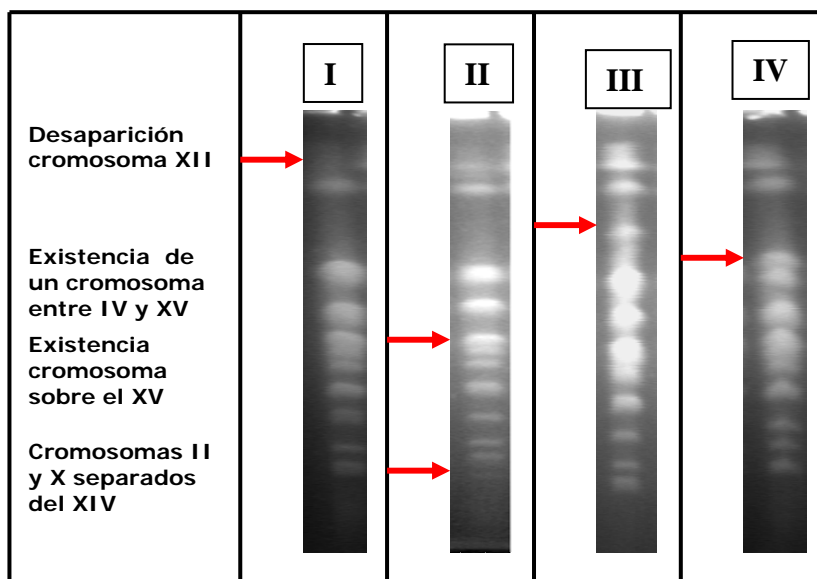


Figura 1. Distribución de los cuatro cariotipos encontrados.

### - Conclusiones

Las cepas de levadura aisladas durante la crianza del vino fino pertenecían en su mayoría (82,5 %) a *Saccharomyces cerevisiae*, y el 96 % de dicha especie correspondió a la raza *capensis*.

El grado de polimorfismo cromosómico detectado en el vino fino ecológico (7,12 %) fue algo superior al del vino fino tradicional (5 %), lo que parece concordar con las condiciones menos limitantes, menor presión selectiva y mayor biodiversidad que se da durante la elaboración del primero.

La imposición de una línea poblacional a lo largo de los estadios de la crianza confirma la idea de que las poblaciones silvestres terminan por adaptarse a los nichos ecológicos donde se encuentran. El asentamiento de las cepas de las levaduras de velo parece aconsejar tomar como base este tipo de cepas estabilizadas, cuando de trate de seleccionar inóculos para ser utilizados en la propia bodega.

### - Referencias Bibliográficas

- Casaregola S, Nguyen HV, Lepingle A, Brignon P, Gnedre F, Guillardin C. 1998. A family of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry rearrangements involving chromosomes I and III. *Yeast*, 14:551-561.
- Fernández A. 2006. Caracterización y ecología de las levaduras de los vinos finos de la D.O. de Montilla-Moriles. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba.
- Sancho ED, Hernández E, Rodríguez A. 1986. Presumed sexual isolation in yeast population during production of sherrylike wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 395-397.

EVOLUCION DE LAS LEVADURAS COMERCIALES EN EL AMBIENTE. PRIMER AÑO DE ESTUDIO.

**Serrano A.<sup>1</sup>, Arroyo T.<sup>1</sup> Cordero G.<sup>1</sup> y Valero E.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Agroalimentación, IMIDRA, Madrid.  
[teresa.arroyo@madrid.org](mailto:teresa.arroyo@madrid.org)

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.  
[evalero@upo.es](mailto:evalero@upo.es)

### Introducción y Objetivos

Desde la década de los 80, el uso de levaduras secas activas como iniciadores de la fermentación ha sido extensamente generalizado. Esta práctica asegura una fermentación rápida y fiable y disminuye el riesgo tanto de entencimientos y paradas de fermentación como de contaminaciones microbianas. Estos y otros avances tecnológicos han contribuido a mejorar la calidad del vino así como a aumentar la posibilidad del control de la fermentación y la consecución de objetivos específicos. Algunos de estos avances han ido en el sentido de la mejora de levaduras enológicas por ingeniería genética. La aplicación de estas nuevas tecnologías a la industria alimentaria es siempre motivo de un complejo debate. En este sentido continúa hoy siendo necesaria la aportación de nuevos datos que nos ayuden a evaluar los riesgos asociados a la utilización de estas levaduras y una de las principales cuestiones que se plantean, es su impacto medioambiental. En este sentido las levaduras comerciales son un buen modelo de estudio para evaluar su evolución en el medio ambiente.

Las levaduras comerciales son generalmente utilizadas en las bodegas sin ningún control especial. Las bodegas son sistemas abiertos y una vez finalizada la vinificación son eliminadas, en gran cantidad, junto con las aguas residuales y orujos procedentes de la vinificación, dispersándose en el medio ambiente. En numerosas ocasiones la bodega está situada en las proximidades del viñedo, por lo que las levaduras pueden llegar al mismo como lo demuestran los estudios llevados a cabo en viñedos de Francia y Portugal (1,2). En relación al comportamiento ecológico de estas levaduras en el viñedo hay actualmente una gran falta de información, ¿son capaces estas cepas de sobrevivir en el ambiente pudiendo llegar a formar parte de la microbiota de la uva?, ¿cual es su principal reservorio?, etc. Para responder a estas y otras preguntas, en este trabajo se presenta el primer año de una experiencia de diseminación voluntaria de una levadura comercial (K1M, Lalvin) en el viñedo, con el objetivo de evaluar su evolución y permanencia en la naturaleza.

### Material y Métodos

El estudio se realizó sobre una parcela del viñedo experimental del IMIDRA (Comunidad de Madrid), con cepas de la variedad Mazuelo. Las cepas estaban distribuidas en hileras, en espaldera. Al comienzo de la vendimia se diseminó la levadura K1M-Lalvin (Lallemand) que posee dos marcadores de resistencia (diurón y eritromicina), con objeto de facilitar su identificación. Se diseminó una solución de  $10^6$  céls/mL de la levadura K1M en agua, a razón de 1 L por planta y suelo circundante, mediante una mochila de fumigación.

Se recogieron muestras por triplicado y en condiciones asépticas, antes (control) y a diferentes tiempos después de la diseminación, de uva y hoja (según estacionalidad), así como de tronco y suelo. Las muestras se transportaron al laboratorio donde se realizó un conteo en placa de YPD de las poblaciones de levaduras totales. Al mismo tiempo, 10 mL de extracto salino procedente del lavado de 1 g de hoja, tronco y suelo, fueron inoculados, cada uno de ellos, en 100 mL de mosto sintético. Las muestras de uva (2 Kg aproximadamente) se estrujaron en condiciones asépticas y se tomaron 100 ml de mosto. Con los mostos de uva y los extractos en mosto sintético se realizaron fermentaciones espontáneas a 20°C con agitación, para el estudio de la flora fermentativa. Las muestras de fermentación se tomaron cuando se habían consumido 70 g/L de azúcar, las levaduras fermentativas se aislaron en placas de YPD, de las que se tomaron 30 levaduras al azar, haciendo un total de 360 aislados/muestra. Las levaduras aisladas se sembraron en medio selectivo diurón y eritromicina para evaluar la presencia de la cepa K1M procedente del viñedo.

## Resultados y Discusión

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos durante el primer año de estudio. Las poblaciones de levaduras encontradas tras la diseminación, en todos los muestreos estuvieron en torno a  $10^6$ - $10^7$  células/mL (figura 1).

Comprobamos que la diseminación fue efectiva ya que los porcentajes de la cepa K1M-Lalvin encontrados en la muestra tiempo 0, el mismo día de la diseminación, fueron elevados en todas las partes de la planta muestreadas y en el suelo (figura 2). Al cabo de una semana se mantienen poblaciones elevadas de levaduras totales en todas las muestras, aunque la cepa K1M-Lalvin sólo se aisló en las uvas y en el suelo, volviéndose a encontrar de nuevo en todas las partes de la planta y en suelo a los 30 días. A los tres meses y sucesivos, cuando ya no hay fruto ni hojas, las mayores poblaciones corresponden a las muestras de suelo, disminuyendo éstas a lo largo del invierno, no obstante continúan aislándose levaduras de la cepa K1M-Lalvin. Las nuevas muestras de uva tomadas al año de iniciarse el estudio, durante la siguiente vendimia también mostraron la presencia de la levadura K1M-Lalvin, diseminada el año anterior, aunque los porcentajes encontrados fueron menores, coincidiendo también con una menor población de levaduras totales presentes durante esta campaña.

## Conclusiones

Los resultados preliminares, muestran una permanencia de la levadura diseminada en el viñedo, al menos durante el siguiente año a su diseminación, siendo mayor su presencia en las uvas y en las hojas durante el periodo vegetativo. Cuando la cepa entra en reposo parece existir mayor población en el suelo alrededor de la cepa. Los siguientes años de muestreo nos darán respuesta sobre la remanencia de la levadura diseminada en el viñedo y su incorporación o no a la microbiota natural de la uva.

## Referencias Bibliográficas

1. Valero, E.; Schuller, D., Cambon, B., Casal, M. and Dequin, S. 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three years study. *FEMS Yeast Res.* 5: 959–969.
2. Valero, E.; Cambon, B.; Schuller, D.; Casal, M. and Dequin, S. 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starters commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* 7: 317-329.

Figura 1. Poblaciones de levaduras totales en uva, hoja, tronco y suelo.

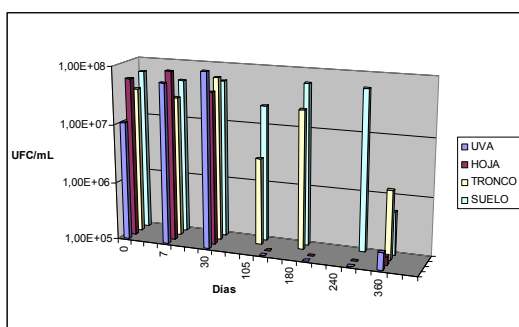
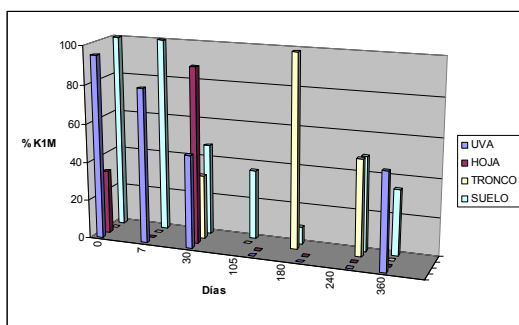


Figura 2. Porcentajes encontrados de la cepa K1M-Lalvin tras su diseminación.



VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE RECuento DE *E. coli*  $\beta$ -  
GLUCURONIDASA POSITIVO Y COLIFORMES EN ALIMENTOS

Arranz A.<sup>1</sup>, Ortolá S.<sup>1</sup> y Gómez, C.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología, Salud Pública de Castellón, arranz\_ana@gva.es

**- Introducción y Objetivos**

La validación de dos métodos microbiológicos: recuento de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasa positivo y Coliformes en alimentos.

**- Material y Métodos**

Se procesaron diferentes matrices representativas de las muestras de alimentos analizadas habitualmente: comidas preparadas sin tratamiento térmico, con tratamiento térmico, productos cárnicos y preparados de carne. Se eligieron muestras previamente procesadas en el laboratorio en las que se descartó la presencia de *E. coli* y coliformes. Todas ellas fueron contaminadas con *Escherichia coli* y/o *Citrobacter freundii*, y se adicionó *Salmonella* spp y/o *Pseudomonas aeruginosa* como flora acompañante.

Preparación inóculos:

Se emplearon cepas de trabajo estandarizadas de concentración conocida procedentes de cepas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Preparación de la muestra:

Por cada ensayo de validación, dos técnicos pesaron 10g de una misma muestra y prepararon las diluciones madres de ambas submuestras en un diluidor automático (90 ml agua de peptona tamponada). Se doparon con una suspensión de *E. coli* y/o *C. freundii* con una concentración de  $\approx 10^4$  ufc/ml; también se añadió 1 ml de una suspensión de  $\approx 10^5$  ufc/ml de los microorganismos acompañantes.

Realización:

Las dos muestras se analizaron en condiciones de reproducibilidad: diferentes técnicos, equipos (estufas) y diferentes lotes de medios de cultivo, en la medida de lo posible. Se sembraron las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Se procesaron siguiendo las normas ISO16649-2(1) para *E. coli* e ISO 4832(2) para Coliformes. Tras el recuento(3) se obtuvieron los diferentes valores  $Y_i$ :  $Y_{ia}$  e  $Y_{ib}$  (submuestra a y b).

Valor de referencia:

Se obtuvo a partir de la siembra, sobre un medio no selectivo (agar Plate Count), de la misma cantidad de los microorganismos diana inoculada en cada muestra. Las placas se incubaron en paralelo a las del método (mismas condiciones de tiempo/temperatura). Tras el recuento se obtuvieron los valores de referencia  $X_i$ .

Cálculos:

Partiendo de los valores de X e Y obtenidos en los ensayos de validación, se calcularon unos parámetros básicos:

- $Y_m$ : media de los duplicados de valores obtenidos con el método.
- $d_{REP}$ : media de las diferencias entre  $\log Y_{ia}$  y  $\log Y_{ib}$ .
- $Sd_{REP}$ : desviación estándar de las diferencias entre  $\log Y_{ia}$  y  $\log Y_{ib}$ .
- $d_{rec}$ : media de las diferencias entre  $\log X$  y  $\log Y_m$ .
- C: media geométrica de los valores de X.

A continuación se detallan los cálculos que se siguieron para la obtención de los resultados:

- Precisión(4): a partir de los valores obtenidos para la desviación estándar de reproducibilidad  $S_R$  debida a los duplicados de los valores Y.

$$S_R = \sqrt{\sum ((Y_{ia} - Y_{ib})^2 / 2) / n}$$

$$RSD_{Poisson} = 1 / \sqrt{C}$$

- Exactitud (recuperación)(5):  $Rec \% = 10 - d_{rec}^- * 100$
- Incertidumbre(4):  $U_C = S_R$

Por tanto, la incertidumbre debida a la reproducibilidad  $U_C$  por ufc es:  $U_C(ufc) = (10^{SR})/C$

La incertidumbre expandida asociada al método U por ufc es:

$$U_{TOTAL} = K * U_C \quad \text{Siendo } K=2 \text{ para un nivel de confianza del 95\%}$$

Requisitos previos:

Previamente a la realización de los ensayos de validación, se establecen unos criterios que deben cumplir los métodos microbiológicos:

- precisión:  $S_R \leq 1.2 * RSD_{Poisson}$ .
- Recuperación media:  $\geq 80\%$ .

**- Resultados y Discusión**

Los resultados de los valores obtenidos de los cálculos se recogen en la siguiente tabla:

	$d_{REP}^-$	$Sd_{REP}$	n	C	Recuperación (%)	$RSD_{Poisson}$	$U_C$ (ufc)	$U_{TOTAL}$ (%)
<b>Recuento <i>E.coli</i></b>	-0.0240	0.0583	10	66.62	91.21	0.1225	0.0166	3.31
<b>Recuento Coliformes</b>	0.0121	0.0438	12	67.23	95.08	0.1220	0.0160	3.19

A continuación, se comparan los resultados de la validación con los requisitos previos establecidos:

PARÁMETRO	REQUISITO	VALOR OBTENIDO		RESULTADO
		<i>E. coli</i>	COLIFORMES	
Recuperación	$\geq 80\%$	91,21 %	95,08 %	cumple
Reproducibilidad	$\leq 1,2 * RSD_{Poisson}$	0,0166 ( $\leq 0,147$ )	0,0160 ( $\leq 0,146$ )	cumple
Incertidumbre (%)		3,31 %	3,19 %	

**- Conclusiones**

Tras la comparación de los valores experimentales con los requisitos planteados previamente se considera que los dos métodos están validados.

**- Referencias Bibliográficas**

- 1.- ISO 16649-2:2001(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli*-Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide.
- 2.- ISO 4832:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.
- 3.- ISO 7218:2007(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
- 4.- ISO/TS 19036:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- 5.- “Curso de validación e incertidumbre en análisis microbiológico”, Jesús Laso Sánchez, 2001.

## LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL CLUSTER DE PRODUCCIÓN DE UN EXOPOLISACÁRIDO (EPS) EN *LACTOBACILLUS PENTOSUS* LPS26

Campelo-Diez A.B.<sup>1</sup>, Martínez B.<sup>1</sup> y Rodríguez A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Ctra. de Infiesto s/n, 33300, Villaviciosa, Asturias, anarguez@ipla.csic.es

### - Introducción y Objetivos

Los exopolisacáridos (EPSs) microbianos son polímeros secretados al medio por los microorganismos productores, dentro de los cuales están determinadas especies bacterianas del ácido láctico (BAL). Según su composición química, los EPSs pueden estar compuestos por monómeros de un solo tipo de azúcar (homopolisacáridos) o por monómeros de azúcares diferentes (heteropolisacáridos). Según su localización, se pueden distinguir polisacáridos capsulares y extracelulares; los primeros están localizados en la superficie celular formando una capa adherente, los segundos tienen una unión a la célula muy débil o inexistente.

Los EPSs producidos por BAL tienen distintas aplicaciones tecnológicas en la industria alimentaria.

La cepa *Lactobacillus pentosus* LPS26 (inicialmente clasificada como *Lactobacillus plantarum*) fue aislada de fermentaciones de aceituna de mesa (Ruiz-Barba *et al.*, 1991), donde se vio que mejoraba la viscosidad de la salmuera durante la fermentación de las mismas. Este microorganismo produce un polímero capsular constituido por dos exopolisacáridos (EPSs): uno de alto peso molecular compuesto por glucosa y ramnosa (EPS A) y otro de bajo peso molecular compuesto de glucosa y manosa (EPS B) (Sánchez *et al.*, 2006).

De forma general, las agrupaciones génicas de producción de EPSs contienen genes reguladores, genes implicados en la determinación de la longitud de la cadena del polímero, glucosiltransferasas (GTs) requeridas para la biosíntesis de la unidad de repetición (denominándose priming GT a la primera que interviene) y genes involucrados en el transporte y la polimerización.

El objetivo de este trabajo fue localizar y caracterizar el cluster de producción de uno de los dos EPSs de *L. pentosus* LPS26.

### - Material y Métodos

*L. pentosus* LPS26 se creció a 30 °C en medio MRS.

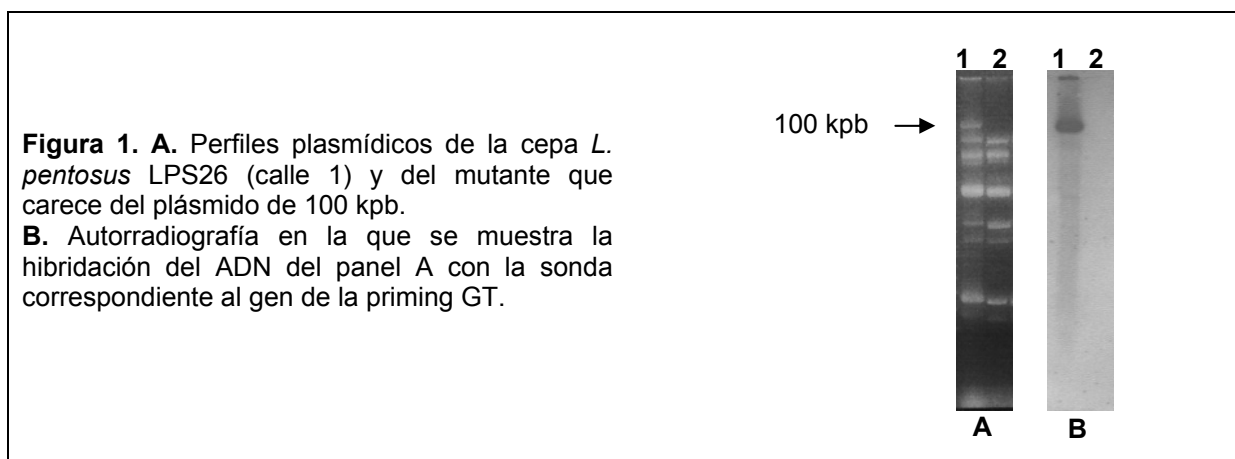
Mutantes de *L. pentosus* LPS26 que carecen de alguno de los plásmidos de la cepa original se obtuvieron mediante tratamiento con novobiocina y temperatura elevada.

Las manipulaciones rutinarias de ADN se llevaron a cabo según las indicaciones de Sambrook y Russell (2001).

Los oligos utilizados en la reacción de amplificación fueron los oligos híbridos F-36 y R-27 descritos por Provencher *et al.* (2003). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 9' a 94 °C, 5 ciclos de 30" a 94 °C, 30" a 62 °C, 30" a 72 °C, 40 ciclos de 30" a 94 °C, 30" a 52 °C, 30" a 72 °C y un ciclo de 10' de extensión a 72 °C.

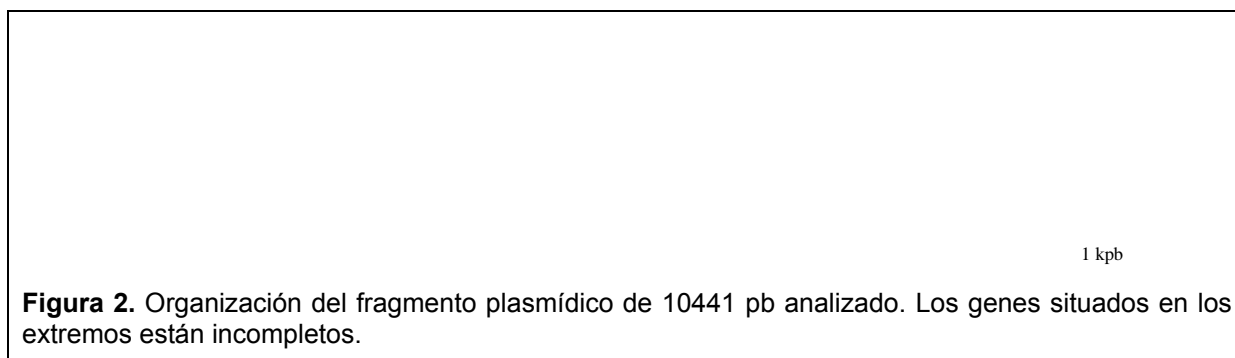
### - Resultados y Discusión

Se amplificó por PCR un fragmento de 193 pb que contenía parte de la secuencia de una priming GT. Se utilizó el fragmento amplificado como sonda para localizar, por hibridación, el cluster *eps* del que formaba parte. El cluster se localizó en el plásmido de mayor tamaño (100 kpb) que contiene la cepa productora (Fig. 1). La hibridación, con la misma sonda, de ADN de un mutante que carecía de este plásmido no dio ninguna señal.



El análisis por HPLC de las muestras de EPS extraídas del mutante que carece del plásmido de 100 kpb, pone de manifiesto la ausencia del pico correspondiente a EPS A. Por lo tanto, el cluster *eps* localizado es el de producción de EPS A.

Se realizaron experimentos de “DNA walking”, utilizando como sonda inicial el fragmento de 193 pb, con el fin de clonar el cluster de producción de EPS A (Fig. 2). Las comparaciones con las secuencias depositadas en las bases de datos nos permitió asignar una función a las proteínas que codifica cada una de las pautas de lectura, identificándose 8 genes pertenecientes al cluster *epsA* (*orf4* y *orf6*: determinación de la longitud de la cadena de repetición del EPS, *orf5*: determinación de la longitud de la cadena de repetición y polimerización, *orf7*: priming GT, *orf8*: ramnosiltransferasa, *orf9*: glucosa deshidrogenasa, *orf10*: GT, *orf11*: GT/acetiltransferasa). Estas funciones deducidas han sido confirmadas con el estudio de la estructura química de la unidad de repetición (resultados no mostrados). Los otros 3 genes secuenciados codifican proteínas que participan en la replicación plasmídica (*orf1* y *orf2*) y en el mantenimiento de funciones del plásmido (*orf3*).



### - Conclusiones

La agrupación génica de producción del exopolisacárido EPS A de *L. pentosus* LPS26 se encuentra en un plásmido de aproximadamente 100 kpb y está formada por, al menos, 8 genes.

### - Referencias Bibliográficas

Ruiz-Barba J.L., Piard J.C., Jiménez-Díaz R. 1991. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. J. Appl. Bacteriol. 71:417-21.

Sánchez J.I., Martínez B., Guillén R., Jiménez-Díaz R., Rodríguez A. 2006. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. App. Environ. Microbiol. 72:7495-7502.

Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Provencher C., LaPoint G., Sirois S., Van Calsteren M.R., Roy D. 2003. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. Appl. Environ. Microbiol. 69:3299-3307.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DE USO EN INDUSTRIA PANADERA**

**Dueñas-Sánchez R.<sup>1</sup>, Codón AC.<sup>1</sup>, Rincón AM<sup>1</sup>. y Benítez T.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avd. Reina Mercedes s/n, 41012, Sevilla. tahia@us.es

**1-. Introducción y Objetivos**

La identificación de las distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con interés biotecnológico se ha venido realizando en base a su morfología y su capacidad para asimilar distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Barnett, 1992). Sin embargo, se hacen necesarios procedimientos de identificación rápidos y precisos, que nos permita distinguir la cepa de interés de cualquier otra contaminación o para asegurar su presencia durante todo el proceso (Codón AC, 1998).

En este trabajo, se pretende identificar y caracterizar cepas industriales mediante los siguientes procedimientos: (1) Análisis de cariotipos e hibridación con sondas de genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de carbono y sondas de elementos transponibles. (2) Análisis de polimorfismos de restricción de los loci LEU2, SUC2 y URA3. (3) Establecimiento de relaciones filogenéticas entre las cepas estudiadas. (4) Establecimiento de un método para la determinación de aneuploidías en una cepa panadera.

**2-.Materiales y Métodos.**

Las cepas empleadas en este estudio son las que se presentan en la tabla:

Cepa (alias)	Origen.	Cepa (alias)	Origen.
V1 (V)	CGL (Valladolid)	Dadi (d)	Colección Cruzcampo, Sevilla
DOG21 (D)	Universidad de Sevilla	ALKO554 (554)	ALKO Finland
ABO	AB Mauri Food, Córdoba	ALKO743 (743)	ALKO Finland
AB1	AB Mauri Food, Córdoba	ALKO1611 (1611)	ALKO Finland
AB2	AB Mauri Food, Córdoba	TS146 (146)	ALKO Finland
AB3	AB Mauri Food, Córdoba	CT	Horno de San Buenaventura, Sevilla
V2	CGL (Valladolid)	SB2	Horno de San Buenaventura, Sevilla
VS	Colección Cruzcampo, Sevilla	369 (3)	IMB Salamanca
S288C (S)	Yeast Genetic Stock Center Berkeley	PDC	Pie de Cuba de Domecq, Jerez de la Frontera

Las condiciones de separación de cromosomas son las que se describen en Codón AC, 1998. Las digestiones de ADN genómico se realizaron con distintas enzimas de restricción siguiendo las condiciones del fabricante. La transferencia y posterior hibridación, así como el marcaje de las sondas se realizaron mediante los protocolos descritos en Sambrook, 2001. Los árboles filogenéticos se establecieron mediante el procedimiento descrito en Martínez C, 2004. Los análisis de aneuploidías se realizaron en las cepas V1 y DOG21, previamente transformadas (según procedimiento descrito por Gietz, 2002) con un marcador de resistencia a G418 en copia única. Posteriormente se diseñaron oligos cercanos a los centrómeros y se procedió, mediante qRT-PCR, al establecimiento del número de cromosomas mediante relativización con el gen exógeno en copia única,

**3-.Resultados y Discusión.**

Como podemos observar en la figura 1, las cepas estudiadas presentan una gran variabilidad. En las cepas AB0, AB1, AB2 y AB3 parece observarse un patrón con diferencias en los cromosomas de alto peso molecular. También es llamativa la similitud entre la cepa AB0 y la cepa 3, y el alto parecido entre la cepa 146 y la cepa S.

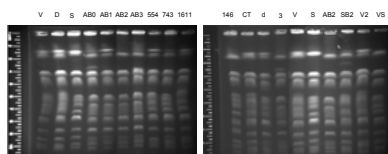


Figura 1-. Cariotipo de las cepas panaderas estudiadas.

A continuación se procedió a la localización cromosómica mediante hibridación con sondas del elemento Ty2, SUC2 y MAL23. Cuando los filtros se hibridaron con la sonda Ty2 (figura 2) se observó su presencia en casi todos los cromosomas, y que como ya se había constatado anteriormente son menos frecuentes en cepas vínicas que en las cepas panaderas. Además el patrón de hibridación entre la cepa AB0 y 3 es idéntico.

Las hibridaciones con el gen SUC2, indicaron (figura 3) que las cepas panaderas presentan un gran número de copias de este gen

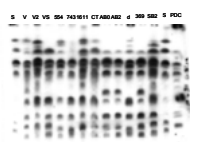


Figura 2-. Hibridación del elemento Ty2 en cepas panaderas.

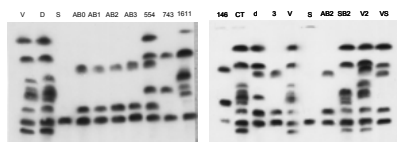


Figura 3-. Hibridación del gen SUC2 en cepas panaderas.

en muchos de los cromosomas. Cabe destacar la existencia de una copia en una posición fija y coincidente con la cepa S, lo cual podría estar indicando el origen de las demás copias de SUC2 en el resto de las cepas estudiadas. Además se podrían hacer varios grupos dependiendo del número de localizaciones de SUC2. Por un lado un subgrupo de alto número de localizaciones el cual englobaría a las cepas V-D- CT-d-SB2-V2 presentando patrones muy parecidos y por otro lado otro subgrupo que corresponde con las demás cepas. En cuanto al gen MAL23 la distribución es algo más homogénea, aunque existe un alto número de localizaciones.

Usando la base de datos de levaduras (yeastgenome.org) se ha procedido a la búsqueda de dianas para enzimas de restricción que cortaran por fuera de la ORF del gen estudiado y enzimas que cortaran al menos una vez dentro de la misma ORF. Los genes que se han analizado son tres: LEU2, SUC2 y URA3.

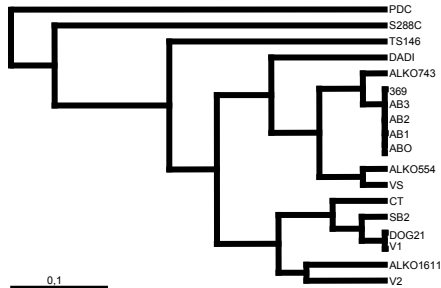


Figura 4.- Dendrograma UPGMA y coeficiente Dicer, en el cual se han integrado todas las matrices obtenidas de las hibridaciones de LEU2 y SUC2.

La razón de usar estos tres genes son: por un lado LEU2 es un gen que en la cepa S presenta un elemento Ty a una distancia relativamente cercana, por lo que es una región que a priori debe de tener diferencias entre las distintas cepas. Además, en dirección 3' existe una ORF muy conservada. SUC2 presenta un alto número de localizaciones en distintos cromosomas. En cuanto al URA3, cabe indicar que datos previos de nuestro grupo para la cepa V y el análisis de dos tetradas completas parecen indicar que presenta tres localizaciones en distintos cromosomas, por lo que también es interesante su estudio. Con todo esto se ha realizado un árbol filogenético que se muestra en la figura 6, en el que sólo se han incluido las hibridaciones con LEU2 y SUC2, puesto que la

hibridación con URA3 genera fragmentos de igual tamaño en todas las cepas estudiadas. Mediante el uso de RT-PCR hemos podido determinar un número variable de cromosomas en las cepas V1 y DOG21. De esta forma se han establecido la presencia de al menos 4 copias del cromosoma 3, 5 del cromosoma 5, 3 cromosoma del 8 y 3 del cromosoma 9.

#### 4-. Conclusiones.

Se han determinado los patrones cariotípicos de distintas cepas utilizadas en la industria panadera. Muchas de ellas presentan patrones cariotípicos distintos, aunque en ocasiones pueden presentar similitudes o patrones prácticamente idénticos.

Las hibridaciones con distintos genes nos permite constatar que existe un alto número de copias repartidas a lo largo de los cromosomas que pueden haber sido originados por duplicaciones de regiones cromosómicas.

El análisis de las digestiones de ADN genómico con distintas enzimas y posterior hibridación con genes que presentan un alto número de copias nos permiten determinar relaciones filogenéticas entre las distintas cepas. Así como su separación de otros grupos de levaduras como serían cepas de laboratorio (S288C), vínicas (PDC) o cepas que han sido aisladas de fermentaciones espontáneas de harinas de centeno (TS146).

Datos preliminares indican que mediante RT-PCR se puede determinar un número de cromosomas aproximado, y que este coincide en gran parte con el número que se estimó mediante estudios de segregación de marcadores en esporas de la cepa V1.

#### 5-. Bibliografía.

- Barnett, J.A (1992). The taxonomy of the genus *Saccharomyces*. Meyeen ex Reess: A short review for Non-Taxonomists. *Yeast* **8**: 1-23.
- Codón AC, et al (1998). Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 154-163.
- Gietz, R.D, et al. (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.
- Martinez, C, et al (2004). Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J Appl Microbiol.* 2004;96(5):1161-8.
- Sambrook, J. Et al (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**LA CECT, CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS MICROBIANOS AL SERVICIO DE LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Giménez R.M., Pinto B. y Garay E.**

*Colección Española de Cultivos Tipo-CECT, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Burjassot, Valencia cect@cect.org*

**- Introducción**

Con casi 50 años de historia desde su fundación en 1960, y 30 desde su llegada a la UVEG, La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; <http://www.cect.org>) es la única colección de microorganismos oficial y de carácter público en España que mantiene y suministra bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Es miembro de la WFCC desde 1977 y está recogida con el registro WDCM412. Desde 1983 pertenece a la Organización Europea de Colecciones de Cultivo (ECCO; <http://www.eccosite.org/>). En 1992, y ante una petición por parte del Ministerio para poder contar en España con una institución reconocida internacionalmente para poder tramitar las solicitudes de patentes en las que intervienen microorganismos, realizó las correspondientes gestiones y obtuvo el reconocimiento como Autoridad Internacional de Depósito (IDA) de microorganismos para fines de patentes según el tratado de Budapest (<http://www.wipo.int/treaties/en/registration/budapest>). La CECT es actualmente la única autoridad internacional de depósito de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) para fines de patentes existente en España. En 1991 fue reconocida como servicio de la Universitat de València, y desde 1996 es Unidad Asociada al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia (CSIC).

La CECT mantiene más de 7000 cepas microbianas, entre las que se encuentran numerosas especies de importancia en alimentos, bien por su papel beneficioso como responsables de diversos procesos fermentativos, bien por constituir cepas de referencia para estudios taxonómicos, para controles en ensayos de calidad, para investigaciones sobre nuevos métodos de detección de microorganismos, etc. En el momento actual, los principales usuarios son las empresas, seguidos de los laboratorios.

La CECT ofrece a los investigadores y empresas los datos de las cepas depositadas en régimen público a través de su página web, donde es posible realizar consultas al catálogo on-line.

**- Actividades de la CECT**

**FUNCIONES Y SERVICIOS**

- suministro de microorganismos en cultivo activo o liofilizados para investigación, docencia, como material de referencia en control de calidad, para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, etc
- depósito y conservación de microorganismos a largo plazo bajo tres modalidades (público, restringido y para fines de patente según el tratado de Budapest)
- identificación de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras)
- formación de personal en el manejo, cultivo y conservación de microorganismos
- asesoramiento en nomenclatura y taxonomía
- liofilización por encargo
- preservación de la biodiversidad microbiana ex situ
- funcionamiento según normas de calidad internacionales
- desarrollo de investigación propia y en colaboración con otros grupos e instituciones
- intercambio de conocimientos y fondos con otras colecciones de cultivo a nivel internacional

- creación, ampliación y mantenimiento de bases de datos biológicos de uso público e interconexión con las de otras colecciones internacionales
- participación en reuniones y foros nacionales e internacionales

#### CEPAS CERTIFICADAS

Es importante resaltar que, ante la creciente necesidad de cepas de referencia autenticadas y certificadas para los más diversos usos en investigación, ensayos de comparación interlaboratorios, acreditaciones en distintas técnicas de detección de microorganismos, controles de calidad en hospitales y laboratorios de salud pública, etc., la CECT ha puesto a disposición de sus usuarios una serie de cepas certificadas que muestran las características fenotípicas necesarias para dichos fines. En la página web (<http://www.cect.org>) aparece un enlace directo a dichas cepas.

#### NUEVOS PRODUCTOS

Asimismo, ha desarrollado dos nuevas presentaciones (ACTICULT 3R y CECT 6R), que facilitan y simplifican el trabajo con las con las mismas. Estas presentaciones, cuyas características están recogidas en la página web de la CECT son:

ACTICULT 3R: Tiene todas las ventajas de un cultivo ya crecido procedente de la CECT. Contiene 3 viales listos para inocular además de un cultivo activo, de esta forma se obtiene fácilmente un lote de reserva.

CECT 6R: Contiene 6 criviales ya inoculados desde la CECT, por lo que únicamente hay que conservarlos en las condiciones especificadas.

#### - Política de calidad y reglamento de uso

Con fecha 16 de diciembre de 2004, la CECT fue certificada por SGS ICB Iberica, S.A. Systems and Services Certification según la norma ISO 9001:2000 con el alcance: "Preparación, venta y distribución de cultivos microbianos (bacterias, hongos filamentosos y levaduras)". En noviembre de 2007 ha superado satisfactoriamente la primera auditoria de renovación tras hacer lo propio en las auditorias de seguimiento de 2005 y 2006.

En 2004 elaboró un Acuerdo sobre Transferencia de Materiales (*Material Transfer Agreement*, MTA), siguiendo las directrices del Convenio sobre la Diversidad Biológica (<http://www.biodiv.org>)

#### - La CECT como CRBM (Centro de Recursos Biológicos Microbianos)

La concepción tradicional de las colecciones de cultivos ha ido evolucionando a medida que se ha tomado conciencia del potencial que representan los diversos recursos biológicos (microorganismos vivos, células, genes y la información que contienen), que constituyen las materias primas para el avance de la investigación y el desarrollo en todo lo relacionado con las ciencias de la vida y sus múltiples aplicaciones (salud humana y animal, biotecnología, bioremediación, etc.). La revolución que ha experimentado la Biología Molecular ha incrementado sustancialmente las posibilidades de caracterizar y utilizar dichos recursos para el beneficio de la humanidad.

La OCDE (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) definió en 1999 a los Centros de Recursos Biológicos (BRCs) como: "Una parte esencial de la infraestructura sobre la que descansan las Ciencias de la Vida y, muy particularmente, la Biotecnología".

Al igual que ha sucedido en los países europeos más avanzados, España debe contar con un centro de estas características para atender las demandas de la OCDE relativas a la conservación de los recursos biológicos. En el caso particular de los microorganismos, este centro es la CECT, que está desempeñando en la actualidad las funciones que definen a un BRC según la OCDE en el sentido de proporcionar servicios esenciales a la comunidad científica y a las empresas y otros organismos relacionados con la salud pública para la investigación básica o aplicada. Además, está participando junto con el resto de colecciones europeas en todas las iniciativas destinadas a conseguir la implementación de los criterios de calidad de la OCDE para este tipo de centros.

## ANÁLISIS GENÉTICO DE LOS CLUSTERS DE PRODUCCIÓN DE TIRAMINA Y PUTRESCINA EN EL GÉNERO *ENTEROCOCCUS*

Ladero V., Sánchez E., Calles M. M., Fernández M. y Álvarez M. A.

Dpto. de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA - CSIC). Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias. ladero@ipla.csic.es

### Introducción y Objetivos

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, con actividad biológica y que se sintetizan principalmente mediante la descarboxilación de un aminoácido. Son producidos en bajas concentraciones por todo tipo de organismos, donde participan en multitud de funciones fisiológicas. Sin embargo, su presencia en altas concentraciones en alimentos puede causar problemas toxicológicos [7], especialmente en aquellas personas que presentan alteraciones en el sistema de detoxificación (amino oxidasas), bien por defecto genético o por la ingesta de medicamentos con actividad inhibitoria [1]. Pescados y productos fermentados son los alimentos en los que se encuentran mayores cantidades de AB y que han sido relacionados con intoxicaciones alimentarias [6]. La tiramina, la histamina y la putrescina son las AB más abundantes en este tipo de alimentos. La presencia de altas concentraciones de histamina y/o tiramina puede provocar alteraciones cardíacas, circulatorias y neurológicas. Cabe destacar, que en pacientes con parkinson y esquizofrenia se han encontrado niveles alterados de tiramina [5]. Por otro lado, la presencia de esta AB incrementa la adherencia de *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal. Aparte de los problemas toxicológicos derivados de su toxicidad intrínseca, las aminas secundarias, como putrescina pueden reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas, con potencial carcinogénico [8]. Debido a estos efectos perjudiciales sobre la salud humana existe un consenso generalizado en la necesidad de reducir el contenido de AB presentes en alimentos.

El factor necesario para la síntesis de AB en alimentos es la presencia de cepas bacterianas con actividad descarboxilasa (DC), por lo que el estudio de estas cepas puede ayudar a comprender los factores que influyen en su síntesis y prevenir su acumulación. En el caso de la tiramina, todas las cepas productoras se han identificado como pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL), principalmente a especies de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Este último género bacteriano, se encuentra en el centro de un debate en el campo de la seguridad alimentaria. A pesar de pertenecer al grupo de las BAL, y por tanto ser consideradas como bacterias seguras, habiendo sido incluso propuestas algunas cepas para ser utilizadas como fermentos alimentarios o como probióticos, la aparición de cepas patógenas, con resistencias a antibióticos y en las que se han localizado diversos factores de virulencia, hace que se cuestione su seguridad. Por lo que el estudio y la identificación de la presencia de posibles factores de virulencia han adquirido una gran importancia para desestimar las cepas portadoras en aplicaciones alimentarias o como probióticos. Dentro de este contexto, en este trabajo nos planteamos la detección y localización de los genes responsables de la síntesis de tiramina y putrescina en diversas cepas de diferentes especies de *Enterococcus*, así como el estudio de la organización genómica de las regiones adyacentes.

### Material y Métodos

En este estudio se analiza mediante PCR la presencia y localización de los "clusters" de genes implicados en la síntesis de tiramina y putrescina en 52 cepas del género *Enterococcus* que fueron aisladas a partir de muestras de diferentes quesos (26), de heces humanas (13) y cepas de colecciones de cultivos y genomas secuenciados (13), comprobándose mediante secuenciación de los genes *ARNr 16S* y *sod* que pertenecían a 4 especies diferentes: *E. faecalis* (28), *E. faecium* (12), *E. durans* (11) y *E. hirae* (1). Para la detección de los genes se diseñaron oligonucleótidos específicos basados en las secuencias depositadas en las bases de datos, tanto de los genes implicados en la síntesis de las AB, como de aquellos adyacentes. La capacidad de producción de tiramina y/o putrescina se determinó mediante RP-HPLC [3].

### Resultados y Discusión

Todas las cepas analizadas en el presente trabajo mostraron capacidad de producir tiramina a partir de tirosina y en todas ellas se detectó mediante PCR con oligos específicos [2], la presencia del gen de la tirosin Descarboxilasa (*tdcA*). Aunque este fue el criterio de selección de todas las cepas aisladas en este trabajo, no fue así en el caso de las cepas obtenidas a partir de las colecciones de cultivo o las depositadas en las bases de datos. En cambio, sólo las cepas de *E. faecalis* mostraron los genes de producción de putrescina a partir de la agmatina, presentando la mayor parte de las cepas la capacidad de sintetizar putrescina en medio de cultivo. El hecho de que en algunas cepas no se haya podido comprobar la producción de putrescina podría deberse a la presencia de mutaciones puntuales, o a no haber encontrado las condiciones de cultivo adecuadas para su síntesis. En las cepas pertenecientes al resto de especies analizadas no se detectaron los genes, ni se detectó la producción de putrescina en medio de cultivo. En el caso de las cepas de *E. faecalis* que presentaban los dos "clusters" pudimos comprobar la capacidad de

producir de forma simultánea ambas AB *in vivo*. Es importante destacar que la producción simultánea de ambas AB en alimentos potenciaría los efectos tóxicos de cada una de ellas [7].

Una vez detectados los “clusters” de producción de estas AB, nos planteamos llevar a cabo un estudio de su localización en el genoma. En primer lugar comprobamos mediante PCR si ambos “clusters” se encontraban unidos tal y como ocurre en *Lactobacillus brevis*, no obteniéndose en ningún caso banda de amplificación. Este resultado concuerda con el análisis de la localización genómica de ambos clusters en las cepas de *E. faecalis* secuenciadas, en la que ambos clusters están localizados en posiciones muy alejadas en el genoma. A partir del análisis de las secuencias adyacentes a ambos clusters en *E. faecalis* V583, *E. faecium* DO y *E. durans* IPLA655 se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes que flanquean ambos clusters. Para comprobar si la organización génica de ambas regiones era similar en las otras cepas, se llevaron a cabo, en un primer lugar, PCRs de fragmentos internos de dichos genes. En aquellas cepas en las que se obtuvo un resultado positivo, se realizaron PCRs solapantes. La aparición de una banda del tamaño esperado indica que ambos genes se encuentran unidos en el genoma. Los resultados obtenidos revelan una gran heterogeneidad inter- e intra-específica en el caso de *E. durans* y *E. faecium*. En las cepas de estas dos especies, la heterogeneidad encontrada puede deberse a que la adquisición de estos genes sea relativamente reciente. De hecho en el caso de *E. faecium* la incapacidad para producir tiramina se ha considerado un carácter diferencial frente a *E. faecalis*, aunque ante el aumento del número de cepas aisladas de *E. faecium* productoras de tiramina se ha desechado [4]. En este contexto, y dada la diversidad de orígenes de los aislados (alimentos, heces, clínica), podemos sugerir la producción de putrescina a partir de agmatina como un nuevo test diferencial adicional, si bien habría que aumentar el número de cepas analizadas para generalizar las conclusiones. Hay que destacar la gran homogeneidad de la localización genómica de ambos clusters en el caso de las cepas de *E. faecalis* analizadas. A pesar de la heterogeneidad de los orígenes de las mismas, todas las cepas presentan la misma organización genómica en la región del cluster de la agmatina. Además, el 93 % presenta la misma organización por delante del cluster de la tirosina. Esta homogeneidad parece indicar que ambos clusters no son caracteres adquiridos recientemente en la evolución. Por otro lado, el hecho de que todas las cepas analizadas presenten la capacidad de producir tiramina y putrescina hace que nos planteemos si realmente en el caso de *E. faecalis* estos caracteres están asociados a cepa, como siempre se ha descrito para las bacterias del ácido láctico, o a especie. Finalmente consideramos que la capacidad de producir AB debería considerarse entre los factores de virulencia a examinar en cepas de *Enterococcus*, a la hora de proponerlas para un uso alimentario o como probióticos, dada la influencia negativa que pueden tener sobre la salud humana.

### Conclusiones

-Se han detectado los genes responsables de la producción de tiramina y/o putrescina en 52 cepas aisladas a partir de distintos tipos de quesos y de heces humanas, e identificadas mediante secuenciación del ARNr 16S y del gen *sod* como diferentes especies del género *Enterococcus*; comprobándose mediante HPLC la producción de tiramina y/o putrescina *in vivo*.

- Mediante PCRs intragénicas y solapantes se estudiaron los genes adyacentes en el genoma a los responsables de la producción de estas AB viendo que existe una gran heterogeneidad interespecífica. La homogeneidad intraespecífica en la organización genómica en *E. faecalis* contrasta con la heterogeneidad encontrada en *E. faecium* lo que sugiere que en esta última especie, la capacidad de producir tiramina ha sido adquirida recientemente.

- Se sugiere la utilización de un test de producción de putrescina a partir de agmatina como un posible carácter taxonómico para diferenciar *E. faecium* de *E. faecalis*.

### Bibliografía

1. Bodmer S, Imark C, y Kneühl M (1999) Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *InflamResearch* 48:296-300
2. Fernández M, Linares D, Alvarez MA (2004) Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *L. lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *J Food Protect* 67:2521-2529
3. Fernández M, Linares D, del Río B, Ladero V, y Alvarez MA (2007) HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *J Dairy Res* 74:276-282
4. Marcobal A, de las Rivas B, García-Moruno E, y Muñoz R (2004) The tyrosine decarboxylation test does not differentiate *Enterococcus faecalis* from *Enterococcus faecium*. *Syst Appl Microbiol* 27:423-426
5. Premont RT, Gainetdinov RR, y Caron MG (2001) Following the trace of elusive amines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9474-9475
6. Santos MH (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* 29:213-231
7. Shalaby AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int* 29:675-690
8. Ten Brick B, Damink C, Joosten H, y Huis in't Veld J (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* 11:73-84

## CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EXISTENTES EN LA CECT

Macián M.C., Lucena T., Pinto B. y Garay E.

Colección Española de Cultivos Tipo-CECT, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Burjassot, Valencia [cect@cect.org](mailto:cect@cect.org)

### - Introducción y Objetivos

Las bacterias del ácido láctico (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C dentro del filo "Firmicutes". La mayoría son bacilos o cocos, catalasa negativos, anaerobios facultativos o microaerófilos, no esporulados, ácido-tolerantes y con metabolismo de carbohidratos estrictamente fermentativo cuyo principal producto final es el ácido láctico.

Tradicionalmente las BAL han sido consideradas como bacterias de interés industrial por su papel relevante en diversos procesos fermentativos con numerosas aplicaciones. Algunas cepas, sin embargo, son consideradas alterantes de alimentos envasados al vacío o en atmósfera modificada, y conservados en refrigeración. Se encuentran en numerosos ambientes (agua, productos vegetales, intestino de animales, etc.) y forman parte asimismo de la microbiota de los alimentos. Además de sus conocidas repercusiones beneficiosas sobre la salud humana o animal (ya que ejercen acción bacteriostática frente a diferentes especies patógenas y/o alterantes), en la última década se han explorado otras actividades beneficiosas, como su posible acción anticancerígena o los efectos probióticos. Finalmente, algunas especies son consideradas como patógenas de peces.

El objetivo de este estudio ha sido la caracterización genotípica y fenotípica de las BAL existentes en la CECT, con el fin de poder garantizar su pureza y autenticidad previo a su suministro, lo cual resulta esencial para que los resultados de las investigaciones, controles de calidad, procesos biotecnológicos, etc., en los que participen las cepas suministradas por la CECT, sean fiables.

### - Material y Métodos

En la CECT existen actualmente 518 cepas pertenecientes a los 12 géneros de BAL (Garrity et al. 2004), de las cuales 413 están en catálogo público y el resto (105) son depósitos restringidos o en régimen de patente.

Las cepas se han cultivado siguiendo las recomendaciones de medio de cultivo y temperatura que aparecen para cada una de ellas en el catálogo on-line de la CECT (<http://www.cect.org>). Los métodos empleados para su caracterización han sido los sistemas miniaturizados (API y Biolog) que aportan perfiles bioquímicos, y la secuenciación parcial del 16S rRNA.

El empleo de los sistemas miniaturizados (API 20 STREP, API 50 CHL, rapid ID 32 STREP) se ha realizado siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la secuenciación parcial se ha realizado la extracción de DNA utilizando el kit de extracción Ultra Clean de MoBio Laboratories, Inc. La amplificación parcial del gen 16S rRNA se ha llevado a cabo mediante PCR en un termociclador Genius (Techne) utilizando cebadores universales (616V y 699R; Arahal et al. 2008). Los amplicones se han purificado usando el UltraClean PCR clean-up kit (Mo Bio Laboratories). La reacción de secuenciación se ha desarrollado en un secuenciador automático Abi Prism 3730 utilizando el Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit usando los mismos cebadores a una concentración de 5 pmol. El análisis BLAST de las secuencias se ha realizado frente a las bases de datos del NCBI, y frente a bases de datos curadas del gen 16S rRNA.

### - Resultados y Discusión

De las 413 cepas (132 cepas tipo) de bacterias lácticas que hay actualmente en la CECT en régimen de depósito público se han controlado hasta la fecha un total de 300 mediante diferentes métodos, quedando poco más de 100 pendientes, de las cuales tan sólo 10 son cepas tipo. Por tanto podemos decir que en este momento la cobertura de controles en las cepas tipo es prácticamente total.

Los análisis llevados a cabo para algunas de estas cepas, principalmente miembros de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, han aportado resultados que sugieren la adscripción de algunas cepas a otras especies, o que nos han permitido identificar a nivel de especie cepas depositadas únicamente con adscripción genérica. Este estudio también ha permitido constatar la existencia de algunas cepas (concretamente 2 del género *Pediococcus* y 2 del género *Streptococcus*) que presentaban algún tipo de problema (como falta de

viabilidad o contaminación), lo cual se ha solucionado mediante el redépósito de las mismas tras solicitarlas a otras colecciones de cultivo.

Asimismo se ha observado que, en algunas cepas, los controles basados en pruebas fenotípicas ofrecen por sí mismos resultados poco concluyentes, reflejados en los bajos porcentajes de identificación, si bien su uso simultáneo a la secuenciación nos permite disponer de una técnica fácil y rápida para comprobaciones futuras. Aunque el sistema BIOLOG recoge en su base de datos a todos los géneros de BAL (excepto *Oenococcus*), no está actualizado a nivel de especies sobre todo en lo que se refiere al género *Lactobacillus* que es el que mayor crecimiento ha experimentado durante los últimos años en cuanto a nuevas especies descritas. Esto unido a la laboriosidad de la técnica hace que su utilidad para identificar cepas de BAL sea limitada. En cuanto al uso de las tiras API, hemos constatado la falta de reproducibilidad de algunas cepas, principalmente miembros de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*, si bien la identificación es igualmente posible pues el sistema recoge la variabilidad intraespecífica, de tal modo que diferentes perfiles numéricos corresponden a una misma identidad.

Finalmente la resolución que ofrece la secuenciación del 16S rRNA es mayor que la de las otras técnicas (sistemas miniaturizados que estudian datos fenotípicos), por lo que el método de elección cuando no existen controles previos es la secuenciación.

#### **- Conclusiones**

Durante mucho tiempo, las colecciones se han limitado a mantener los microorganismos depositados en ellas sin cuestionar la designación taxonómica, considerando que eso era responsabilidad del depositante, y llevando a cabo controles con poco poder discriminatorio. En la CECT se han realizado tradicionalmente, al igual que en la mayoría de colecciones, controles de pureza y de viabilidad cada vez que se necesitaba preparar un nuevo lote de suministro de liófilos. La comprobación de su autenticidad mediante la realización de algunas pruebas bioquímicas (Gram, movilidad, catalasa, hemólisis, etc.) se realizaba de forma ocasional debido a la escasez de personal y al esfuerzo requerido. Sin embargo, en los últimos años, el avance de las técnicas genético-moleculares y la incorporación de personal cualificado ha facilitado la realización de los controles rápidos de autenticidad incluyendo, primero, los perfiles bioquímicos, y posteriormente la secuenciación del 16S rRNA.

El objetivo final del presente estudio es que todas las cepas de BAL depositadas en la CECT en régimen de depósito público se encuentren perfectamente caracterizadas a la disposición de sus usuarios para los diversos fines (docentes, investigadores y de aprovechamiento industrial).

#### **- Referencias Bibliográficas**

Arahal DR, Sánchez E, Macián MC, Garay E. 2008. Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "*Leuconostocaceae*". *Int. Microbiol.*, 11: 33-39.

Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. 2004. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York: 1-399.

UTILIZACIÓN SE SUBSTRATOS POSTCULTIVO DE HONGOS (SPCH) COMO TIERRA DE COBERTURA EN CULTIVO DE CHAMPIÑÓN. EFECTOS SOBRE LA MICROBIOLOGÍA.

San José Barrero F.<sup>1</sup>, Pérez Clavijo M.<sup>2</sup>, Urbina Sáenz C.<sup>2</sup> y López Vázquez R.<sup>1\*</sup>

1: Centro de Innovación y Tecnología Alimentaria de La Rioja Polígono Tejerías Norte, C/ Los Huertos Nº2; 26500 Calahorra (La Rioja) e-mail: [fjsanjose@cita-larioja.es](mailto:fjsanjose@cita-larioja.es), Web: <http://www.cita-larioja.es>.

2: Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja. Ctra. Calahorra, Km. 4. 26560 Autol (La Rioja) e-mail: [administracion@ctich.com](mailto:administracion@ctich.com), Web: <http://www.ctich.com>.

**- Introducción y Objetivos.**

El champiñón es un producto que tradicionalmente se ha caracterizado por presentar una elevada actividad fisiológica, gran sensibilidad a los daños mecánicos y al desarrollo de microorganismos. La alteración del color, por oscurecimiento del champiñón (*Browning*), produce cambios en sus parámetros de calidad y por tanto de rentabilidad comercial. Esto es debido fundamentalmente a la reacción de la enzima tirosinasa con los polifenoles del fruto al contacto del oxígeno, al producirse cortes o golpes en el producto [1].

En parte, este oscurecimiento también se atribuye a la acción de bacterias saprofitas responsables de las alteraciones y deterioros de los vegetales, consistentes en podredumbres blandas y de otros tipos, manchas y marcas superficiales, agrietado y marchitado del fruto. Las especies que con más frecuencia son causantes de los citados daños pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, (*Ps. fluorescens* o *marginalis*), *Erwinia* (*E. Caratovora*), *Corynebacterium*, Coliformes, *Micrococaceae*, Bacterias\_\_acidolácticas, *Xantomonadae*. En particular: las *Pseudomonas*, muy comunes en la microflora del champiñón, generan ciertos metabolitos que producen pigmentaciones impropias. Por ejemplo; Es sabido que *Pseudomonas tolaasii* produce una toxina, llamada *tolaasina*, que genera manchas marrones o “*Manchas bacterianas*” en los champiñones [2].

Con el fin de seleccionar el mejor método de cultivo para la comercialización en fresco de champiñón, el objetivo del presente estudio es: Estudiar la variación de la carga microbiana, en distintas floradas (1º, 2º, 3º), cultivadas en dos tierras de cobertura diferentes (“Mezcla SPCH” y “Turba”), a Tiempo 0 Días (T0=Recolección) y a Tiempo 9 Días (T9=Refrigeración).

**Material y Métodos.**

Se han utilizado champiñones híbridos (H-15) cultivados en un sistema semiclimatizado, utilizando dos tierras de cobertura diferentes: “Turba” y mezcla de turba con “SPCH”. Los champiñones se recolectaron a lo largo del ciclo de cultivo en cada una de las floradas (tres floradas por tierra de cobertura) que se producen. Tanto inicialmente (T0) como después de 9 días (T9) de conservación en refrigeración (4 °C y 85% HR), se han realizado análisis microbiológicos cuantitativos por recuento total de: Aerobios mesófilos totales (Medio PCA), Enterobacterias coliformes (MedioVRBL), Mohos y levaduras (Medio YGC) y *Pseudomonas* spp. (Medio CFC) Mediante medios de cultivo comerciales AES Chemunex, según los criterios y protocolos de calidad de la Norma UNE-EN ISO [3] y AENOR [4]. Respectivamente (ISO 4833-2003, ISO 9832:2002, ISO 7954:1987 y NF V 04-504:1998).

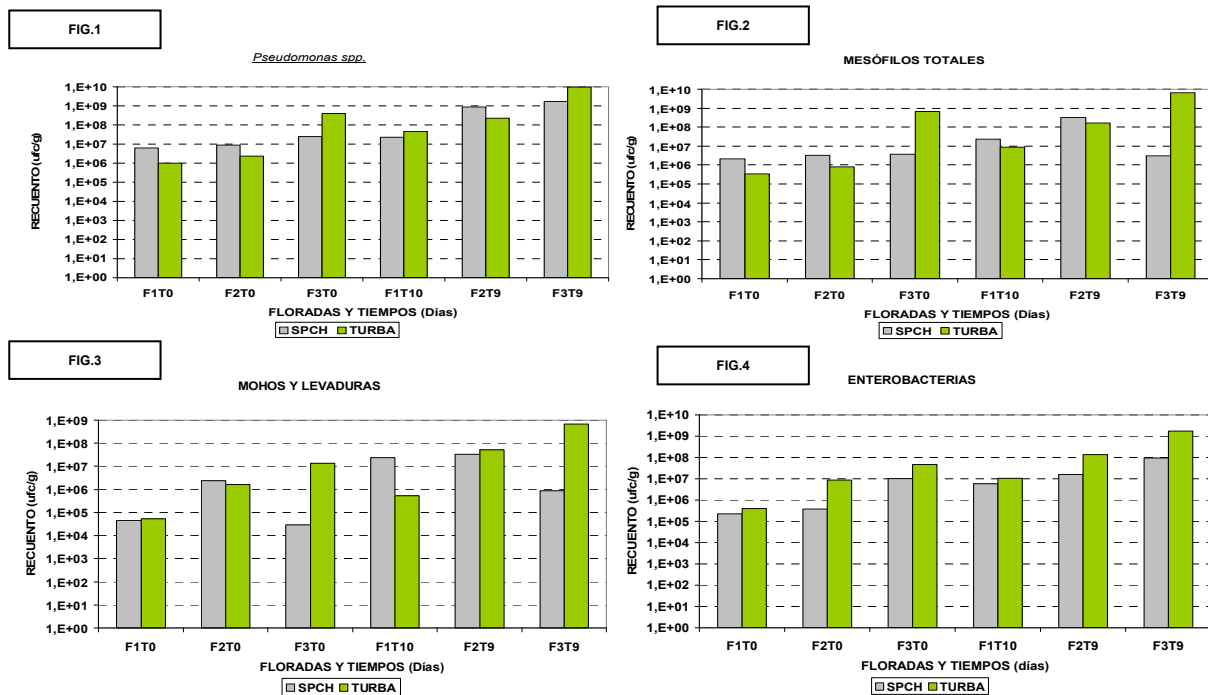
**Resultados y Discusión.**

Con los resultados obtenidos de los diferentes análisis de recuento, se han elaborado las siguientes gráficas para *Pseudomonas* spp. (Fig. 1), Mesófilos aerobios totales (Fig. 2), Enterobacterias (Fig. 3), Mohos y levaduras (Fig. 4), donde se han relacionando la carga microbiana de las floradas (F1, F2, F3) cultivadas en dos diferentes tierras de cobertura (SPCH y Turba) a dos tiempos diferentes (T0 y T9 ).

En ambos casos, se puede observar en las distintas gráficas de barras, la tendencia a aumentar de los recuentos con la florada y el tiempo de conservación (4 °C y 85% HR). Excepto en el caso de la 3º florada cultivada (F3) en SPCH donde los recuentos de Aerobios mesófilos totales (Fig. 2) y Mohos y levaduras (Fig. 3) a tiempo inicial y después de la refrigeración han descendido con respecto a las floradas previas.

En la comparación de la evolución de la carga microbiana entre las dos tierras de cobertura, aún siendo muy similares, se aprecia que las floradas cultivadas con “SPCH” tienen una carga microbiana inicial (T0) menor que los cultivados con “Turba”. Después del almacenamiento (T9) la carga microbiana final es mayor en las floradas cultivadas con “Turba” e incluso, a Tiempo inicial (T0), los recuentos en las 3º Floradas (F3) cultivadas con “Turba” superan los recuentos a las cultivadas en “SPCH”.

De la comparación de los recuentos entre Aerobios mesófilos totales (Fig. 2) y *Pseudomonas* spp. (Fig1) se observa que el protocolo utilizado para este último tiene una mayor tasa de recuperación, para los mismos Lotes, Florada y Tiempos, al presentar valores levemente mayores.



**- Conclusiones.**

Para ambas tierras de cobertura, se confirma la relación directa entre florada y tiempo de almacenamiento. "Al aumentar número de florada y tiempo, aumentan los recuentos de microorganismos".

Se deben confirmar las causas del descenso de los recuentos en los champiñones cultivados con "SPCH", en la 3º florada (F3) para *Pseudomonas* (Fig. 2), Mohos y levaduras (Fig.3), tanto a T0 como a T9. Ya que estos se podrían utilizar para la comercialización en fresco, contradiciendo la tendencia general de "a mayor florada y tiempo, mayores recuentos".

En las primeras floradas (F1 y F2) de los champiñones cultivados con "SPCH", se aprecian recuentos mayores, o muy similares, a los cultivados con "Turba" para la carga microbiana inicial (T0) y después de refrigeración (T9). En las últimas floradas (F3) se aprecia que los recuentos son mayores en los champiñones cultivados con "Turba".

Por tanto, se puede concluir diciendo que la utilización de mezcla de SPCH y turba como tierra de cobertura en el cultivo de champiñón aumenta la vida útil del producto. Este aspecto es especialmente importante cuando se trata de comercialización de champiñón fresco ya que la selección de una tierra de cobertura con SPCH permite disminuir la carga microbiana durante el periodo de refrigeración y venta.

**- Referencias Bibliográficas.**

- [1] Vedder P.J.C. "Cultivo moderno del Champiñón", Ediciones Mundi-prensa, Madrid (España), versión en Español. (1996).
- [2] Soler-Rivas, et al. "Bioquímicas y fisiológicas aspectos de la enfermedad mancha marrón de *Agaricus bisporus*". Los comentarios FEMS Microbiol 23: 591-614. (1999).
- [3] ISO - International Organization for Standardization-www.iso.org/iso/home.htm
- [4] Association Française de Normalisation (AFNOR)- www.afnor.org/portail.asp