

Volumen 11, nº 1
Marzo 1995
ISSN 02 13-4101

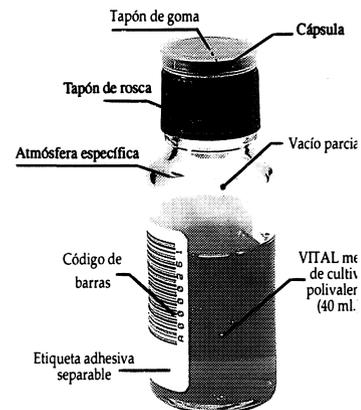
PUBLICACION DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGIA

Microbiología



VITAL

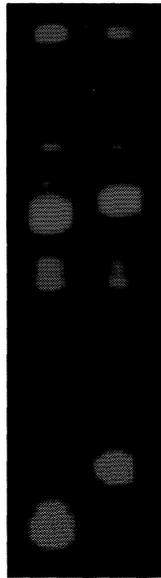
Sistema automático para hemocultivos



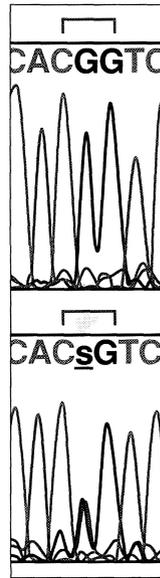
- Tecnología H.F.T.
- Lectura no invasiva:
 - en continuo las 24 horas del día cada 15 minutos.
- Introducción inmediata de frascos nuevos en el ciclo de análisis.
- Detección del crecimiento bacteriano mediante:
 - producción CO_2 .
 - variación del PH.
 - modificación del potencial de oxido-reducción.
- Facilidad de Manejo.
- Interfase windows.
- Sistema modular.
- Conexión bidireccional.



bioMérieux

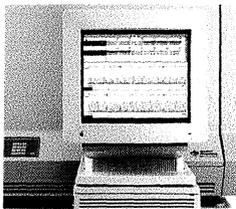


Barridos. Use métodos PCR como SSCP (ilustrado aquí) para buscar las diferencias entre los genes mutante (izquierda) y natural (derecha).



Secuenciación. Rápidamente localice los heterocigotos (secuencia inferior) con un software de análisis de secuencia especializado.

Imagine que productividad podría lograr con un sistema que pudiese realizar ambos.



Hemos automatizado el proceso completo de detección de mutaciones - desde la preparación de la muestra hasta la localización de los heterocigotos. De esta forma no tendrá que imaginarse nuevos niveles de productividad. Los alcanzará fácilmente.

Combinando técnicas de barrido con secuenciación comparativa, nuestro sistema puede ayudarle a aumentar su productividad y finalizar antes sus proyectos de investigación. Tendrá la flexibilidad que necesita para una caracterización genética más productiva.

La base de este sistema exacto y versátil es nuestro afamado equipo de electroforesis modelo 373, que incluye las herramientas más especializadas y necesarias para los análisis de datos más complejos.

Nuevo software Sequence Navigator para ofrecerle comparaciones de secuencias de alta resolución y exactitud. Elimina datos superfluos, alinea secuencias automáticamente y marca claramente los heterocigotos.

Con el analizador de fragmentos GenesCAN software junto con la tecnología GeneAmp PCR puede usar las más avanzadas técnicas de barrido, tales como polimorfismo conformacional de simple-hebra (SSCP) y análisis heteroduplex.

Además los reactivos de análisis PCR y de secuenciación ADN PRISM le facilitan la preparación de la muestra. Con nuestra tecnología básica de los cuatro-colorantes fluorescentes este sistema le permite incluir controles internos en cada carril para lograr una exactitud y una productividad que ninguna otra técnica es capaz.

Ahora dispone de un sistema que le permite expandir sus opciones experimentales en lugar de limitárselas.

Imagine la productividad. Imagine su valor.

Llame a la división Applied Biosystems de Perkin Elmer hoy mismo al teléfono: 91 / 803 42 10.



PERKIN ELMER

MADRID: Dr. Antonio Bradley y D^a Soledad Sánchez. Tel. (91) 803 42 10 . Fax (91) 804 04 14. Ronda de Poniente, 5 - 28760 Tres Cantos (Madrid)

BARCELONA: D. Julio Martínez. Tel. (93) 212 22 58 . Fax (93) 212 60 01. General Vives, 25-27 - 08017 Barcelona

BILBAO: D. J. Mantecón. Tel. (94) 447 10 21 . Fax (94) 476 15 39. Lehendakari Aguirre, 11 - 48014 Bilbao

SEVILLA: D. J. L. de la Matta. Tel. (95) 445 70 22 . Fax (95) 445 19 06. Avda. República Argentina, 39 - 41011 Sevilla

Sequence Navigator, GENESCAN, and ABI PRISM are trademarks of The Perkin-Elmer Corporation.

The GeneAmp PCR process is covered by the U.S. patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Perkin-Elmer is a registered trademark of The Perkin-Elmer Corporation.

Hemocultivos ESP

LA NUEVA
TECNOLOGIA
CONDUCE A
UNA MAYOR
RAPIDEZ

ESP ofrece lectura
continua, no invasiva,
de los hemocultivos
con automatización
total y monitorización
tanto de consumo como
de producción
de cualquier gas.

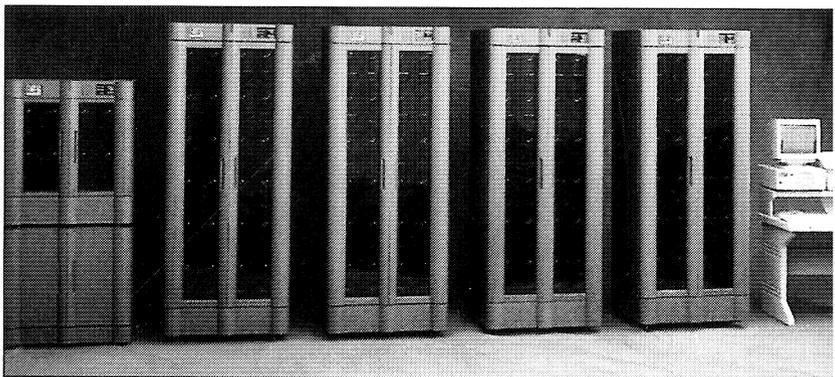
Configuraciones

El sistema de Hemocultivos ESP, se
ajusta con precisión a su volúmen
de trabajo. Los instrumentos están
disponibles en dos tamaños, 128 y 384
botellas. El ordenador controla hasta 5
instrumentos de cualquier capacidad.

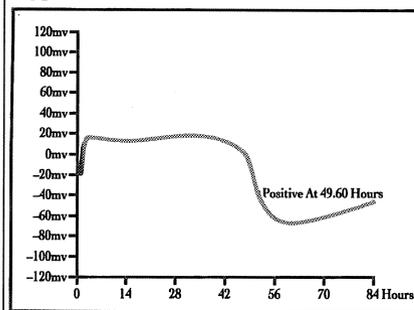


Formatos de botellas

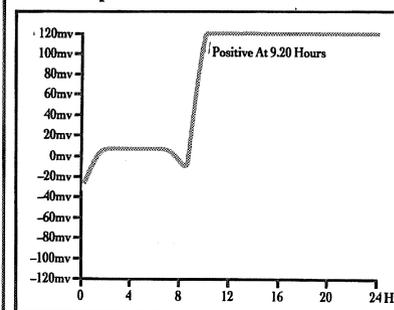
Los medios de nuevo desarrollo se
ofrecen en una selección de tamaños.
La botella de 30 ml. acepta muestras entre
0,1 y 10 ml. La botella pediátrica acepta
hasta 5 ml. en extracción directa.
La botella bifásica contiene además una
lengueta con Agar Chocolate y Sabouraud
Dextrose.



Cryptococcus neoformans



Klebsiella pneumoniae



Mayor recuperación. Mayor rapidez

Los sensores están continuamente monitorizando tanto el consumo como la producción
cualquier gas de forma que los positivos son detectados antes que con sistemas que
monitorizan la producción de CO₂.

DISTRIBUIDOR PARA ESPAÑA:



**FRANCISCO
SORIA MELGUIZO, S.**

Caramuel, 38 - 28011 MADRID
Telf.: 464 94 50 - 464 36 00 • Fax: 464

MICROBIOLOGÍA SEM

Publicación de la Sociedad Española de Microbiología

Editorial Board/Consejo Editorial*

Editor-in-Chief/Director-Coordinador

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona

Bacterial Taxonomy/Taxonomía Bacteriana

Antonio Ventosa, Universidad de Sevilla

Hans G. Trüper, University of Bonn, FRG

Biodeterioration/Biodeterioro

Margarita Flores, Universidad Complutense de Madrid

Harold W. Rossmore, Wayne State University, Detroit, USA

Environmental Microbiology/Microbiología Ambiental

Victoriano Campos, Universidad Católica de Valparaíso, Chile

José M. López Pila, Institute for Environmental Hygiene, Berlin, FRG

Food Microbiology/Microbiología de los Alimentos

M. Luisa García López, Universidad de León

David A. A. Mossel, Eijkman Found. for Medical Research, Utrecht, Netherlands

Industrial Microbiology/Microbiología Industrial

Paloma Liras, Universidad de León

Manuel Benjamín Manzanal, Universidad de Oviedo

Microbial Biochemistry and Physiology/Bioquímica y Fisiología Microbianas

Germán Larriba, Universidad de Extremadura, Badajoz

Miquel Viñas, Universidad de Barcelona

Microbial Ecology/Ecología Microbiana

Juan J. Borrego, Universidad de Málaga

Juan Iriberry, Universidad del País Vasco

Microbial Genetics/Genética Microbiana

Josep Casadesús, Universidad de Sevilla

Moselio Schaechter, Tufts University, Boston, USA

Medical Microbiology/Microbiología Clínica

José Claudio Pérez Díaz, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Manuel de la Rosa, Hospital Virgen de las Nieves, Granada

Morphology and Ultrastructure/Morfología y Ultraestructura

Enrico Cabib, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Isabel Esteve, Universidad Autónoma de Barcelona

Mycology/Micología

Salomón Bartnicki-García, University of California-Riverside, USA

Josep M. Torres-Rodríguez, Universidad Autónoma de Barcelona

Virology and Immunology/Virología e Inmunología

Esteban Domingo, Centro de Biología Molecular, CSIC-UAM, Madrid

Mariano Esteban, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

Former Editors-in-Chief/Directores-Coordinadores anteriores

Rubens López, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid

Juan A. Ordóñez, Universidad Complutense de Madrid

* See addresses in pp. 137–138.

[MICROBIOLOGÍA SEM 11 (1): 1–138 (1995)]

Dirección: Sociedad Española de Microbiología. Serrano, 117
28006 Madrid (España). Tel. y Fax (91) 561 32 99

Aparecen cuatro números al año (1995), que se integran en un volumen.

Precio de suscripción anual. Año 1995: España 12.000 ptas. (IVA incluido);
Internacional 111 US \$.

IMPRIME: Graesal, Madrid.

DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985.



EDITORIAL GARSÍ, S.A.
GRUPO MASSON

Edita: EDITORIAL GARSÍ, S. A. Juan Bravo, 46. 28006 Madrid.
Teléfono (91) 402 12 12. Avda. Príncipe de Asturias, 20.
08012 Barcelona. Teléfono (93) 415 45 44.

APP
ASOCIACION
DE PRENSA
PROFESIONAL

Publication Board/Comité de Redacción

Editor-in-Chief/Director-Coordinador:

Ricard Guerrero, Universidad de Barcelona

Secretary General/Secretario General:

Jordi Mas-Castellà, Universidad de Barcelona

Members/Miembros:

Jordi Barbé, Universidad Autónoma de Barcelona

Josep Guarro, Universidad Rovira Virgili, Reus (Tarragona)

Enric Herrero, Universidad de Lleida

Josep M. Monfort, IRTA, Monells (Girona)

Emili Montesinos, Universidad de Girona

Carles Pedrós-Alió, Instituto de Ciencias del Mar, CSIC, Barcelona

Guillem Prats, Universidad Autónoma de Barcelona

Managing Coordinator/Coordinación General:

Carmen Chica

Staff Editor/Organización y Asesoramiento:

Mercè Piqueras

Editorial office/Dirección editorial:

Microbiología SEM

Apartado 16009

08080 Barcelona

Tel. +34-3-4482373. Fax +34-3-3341079

**E-mails: guerrero@porthos.bio.ub.es
guerrero@servicom.es**

Preparación y composición de originales:

Eulàlia Massana

Ana Fernández de Castillo

La revista *Microbiología SEM* y la Sociedad Española de Microbiología agradecen la ayuda recibida de distintas personas y centros de la **Universidad de Barcelona**.

[MICROBIOLOGÍA SEM 11 (1): 1–138 (1995)]

Instructions to Authors:

Information about the Journal, including instructions on the preparation and submission of manuscripts, is published on pp. 135–136 of this issue, and may also be obtained from the Editorial Office.

ÍNDICE

	Página
Editorial. <i>Ordóñez, J. A., Sanchis, V.</i>	5
Eficacia de las atmósferas modificadas frente a los microorganismos patógenos psicrotrofos en alimentos proteicos. <i>García de Fernando, G. D., Mano, S. B., López, D., Ordóñez, J. A.</i>	7
La conservación de los alimentos mediante procesos combinados. <i>Sala Trepal, F. J.</i>	23
Safety aspects of "sous vide" products and prevention of microbial risks. <i>Martens, T.</i>	33
Aspectos microbiológicos de la elaboración del cava. <i>Bartra, E.</i>	43
Los microorganismos del jerez. <i>García Maiquez, E.</i>	51
Técnicas instrumentales para la detección de microorganismos en cervecería. <i>Orive, M.</i>	59
Aplicaciones de la biología molecular en enología. <i>Ramón, D., González-Candelas, L., Pérez-González, J. A., González, R., Ventura, L., Sánchez-Torres, P., Vallés, S., Piñaga, F., Gallego, M. V., Fernández-Espinar, M. T., Querol, A.</i>	67
<i>Escherichia coli</i> , otras Enterobacteriaceae e indicadores adicionales como marcadores de la calidad microbiológica de los alimentos: ventajas y limitaciones. <i>Mossel, D. A. A., Struijk, C. B.</i>	75
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva. Patogenia y epidemiología. <i>Prats, G., Llovet, T.</i>	91
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. <i>Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J.</i>	97
Tendencias actuales en la conservación refrigerada de frutos, como marcadores de la calidad higiénica de los alimentos. <i>Martínez Javega, J. M.</i>	111
Control biológico en la conservación de frutas de pepita. <i>Viñas, I.</i>	115
Revisión de libros	125
Correcciones	133
Normas para los autores	135
Direcciones de los miembros del Consejo Editorial	137

CONTENTS

	Page
Editorial. <i>Ordóñez, J. A., Sanchis, V.</i> [In Spanish]	5
Effects of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic pathogenic microorganisms on proteinaceous foods. <i>García de Fernando, G. D., Mano, S. B., López, D., Ordóñez, J. A.</i> [In Spanish]	7
Combined processes for food preservation. <i>Sala Trepat, F. J.</i> [In Spanish]	23
Safety aspects of "sous vide" products and prevention of microbial risks. <i>Martens, T.</i>	33
Microbial aspects of cava production. <i>Bartra, E.</i> [In Spanish]	43
The microorganisms of Sherry. <i>García Maiquez, E.</i> [In Spanish]	51
Instrumental techniques for the detection of brewery microorganisms. <i>Orive, M.</i> [In Spanish]	59
Applications of molecular biology to enology. <i>Ramón, D., González-Candelas, L., Pérez-González, J. A., González, R., Ventura, L., Sánchez-Torres, P., Vallés, S., Piñaga, F., Gallego, M. V., Fernández-Espinar, M. T., Querol, A.</i> [In Spanish]	67
Advantages and limitations of <i>Escherichia coli</i> , other Enterobacteriaceae and additional indicators as markers for the microbiological integrity of foods. <i>Mossel, D. A. A., Struijk, C. B.</i> [In Spanish]	75
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> . Pathogenic mechanisms and epidemiology. <i>Prats, G., Llovet, T.</i> [In Spanish]	91
Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in foods and clinical samples. Role of animals as reservoir of pathogenic strains for humans. <i>Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J.</i> [In Spanish]	97
Current trends in cold storage of fruits as indicators of foods hygienic quality. <i>Martínez Javega, J. M.</i> [In Spanish]	111
Biological control in the conservation of pome fruits. <i>Viñas, J.</i> [In Spanish]	115
Book reviews	125
Corrections	133
Instructions to authors	136
Editorial Board addresses	137

Editorial

En 1993 se publicó un número monográfico de la revista *Microbiología SEM* dedicado a los alimentos. En él se recogía una serie de artículos correspondientes a las ponencias presentadas en las mesas redondas de la VIII Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos (Cáceres, septiembre de 1992).

Con la periodicidad bianual que caracteriza las reuniones científicas del Grupo de Microbiología de los Alimentos de la SEM, se ha celebrado la IX Reunión —elevada a la categoría de Congreso— en Lérida, los días 3 y 4 de octubre de 1994. Los firmantes de este editorial, presidente del Grupo de Microbiología de los Alimentos y presidente del Comité Organizador del IX Congreso, pidieron a la revista *Microbiología SEM* publicar un número que recogiera las principales ponencias del Congreso, con el doble objetivo de informar a todos los socios de la SEM de las actividades del Grupo y de analizar los recientes avances en esta disciplina. En nombre del Grupo de Microbiología de los Alimentos, queremos expresar al director y equipo de la revista nuestro agradecimiento por el trabajo realizado y, por supuesto, también a los autores, sobre los que ha recaído la responsabilidad de escribir los artículos y que, a fin de cuentas, son los verdaderos protagonistas del presente número.

Las contribuciones del IX Congreso se articularon en torno a cuatro mesas redondas, divididas, a su vez, en diversas ponencias. El Comité Científico del Congreso seleccionó los artículos de mayor impacto, cuyos textos se recogen en esta publicación. Los artículos que se recogen en este número corresponden a las ponencias. A continuación se indica entre paréntesis el primer autor de cada una; el título completo y los demás autores aparecen en el índice de las pp. 3–4.

En la primera mesa redonda, “Nuevas estrategias en la conservación de los alimentos”, se analizaron los últimos avances destinados a preparar productos con el menor procesado posible, pero larga vida útil, o a aumentar la eficacia bactericida, reduciendo al mínimo los efectos secundarios para mantener al máximo la calidad sensorial y la retención de nutrientes. Uno de estos avances es el envasado de carne y pescado frescos en atmósferas modificadas (enriquecidas en dióxido de carbono y otros gases, dependiendo del producto); es una tecnología que permite duplicar la vida útil del producto refrigerado. Sin embargo, los investigadores se han preocupado menos de las respuestas de las bacterias psicrotrofas patógenas en alimentos envasados en atmósferas modificadas. Se presentaron tres ponencias. La primera (García de Fernando) versó sobre estos aspectos. El estudio del efecto de procesos combinados en microorganismos y enzimas correspondió a la segunda ponencia (Sala Trepal); en ella se expuso la forma de aumentar la eficacia en la destrucción de microorganismos, y en el control de su crecimiento, mediante la combinación adecuada de diversos métodos de conservación clásica (aplicación de ultrasonidos, altas

presiones, calor y frío) y condiciones disgenéticas. La tercera ponencia (Martens) trató de los alimentos envasados a vacío a los que se aplica posteriormente un tratamiento térmico suave (alimentos “sous vide”), para conseguir una vida útil razonable y retener al máximo el sabor, el aroma y la textura del producto fresco.

La segunda mesa redonda versó sobre “Bebidas alcohólicas”, y se dividió en cuatro ponencias. En la primera (Bartra) se abordaron los aspectos microbiológicos del cava, y el papel primordial de las levaduras. Primero actúa *Saccharomyces cerevisiae* para elaborar el vino base y después, en la segunda fermentación, una vez embotellado el cava, interviene *S. bayanus* (más resistente al etanol). La segunda ponencia (García Maiquez) trató de los aspectos microbiológicos del jerez, en el que, igualmente, las levaduras tienen una doble función: en la elaboración del vino base y en la crianza biológica, con especial relevancia de la “levadura flor”. La tercera ponencia (Orive) se dedicó al estudio de la cerveza, señalando las precauciones que requiere su elaboración para evitar la contaminación por bacterias que hasta ahora se han observado únicamente en este hábitat. Finalmente, la cuarta ponencia (Ramón), se dedicó a las modernas técnicas de biología molecular que pueden utilizarse con éxito para mejorar la calidad de las bebidas alcohólicas. Como ejemplo se ha utilizado el vino de mesa, para mostrar algunos de los avances obtenidos con técnicas tales como la fermentación dirigida con una sola cepa de levadura, o la codificación de celulasas y hemicelulasas para mejorar el aroma de los mostos.

La tercera mesa redonda, “*Escherichia coli*: su importancia en higiene de los alimentos”, trató de los avances en el conocimiento de las enfermedades causadas por esta bacteria y el papel que los alimentos desempeñan en su transmisión, destacando el grupo de cepas enterohemorrágicas (O157:H7), que tanto preocupa actualmente. La primera ponencia (Mossel) versó sobre la utilidad de la determinación de *E. coli* en higiene de los alimentos. La segunda (Prats) y tercera (Blanco) se dedicaron al análisis de las técnicas de tipificación utilizadas en los últimos años para conocer la epidemiología de los procesos patológicos originados por *E. coli*, además de otros aspectos actuales de las cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, desde la perspectiva de la higiene de los alimentos y de la salud pública.

En la cuarta mesa redonda, “Aspectos microbiológicos de la conservación de productos vegetales por frío”, se revisó, en primer lugar, la importancia que adquiere el control microbiológico de puntos críticos en las hortalizas, una vez han sufrido el tratamiento de escaldado, bien por técnicas convencionales para microorganismos patógenos o por métodos rápidos, como la impedancia, para conocer la carga total de microorganismos viables. En la segunda ponencia (Martínez Javega) se estudió la influencia de la refrigeración de las frutas, proceso que no sólo demora la maduración sino que también retrasa el crecimiento fúngico—aunque en las frutas sensibles al frío debe conocerse perfectamente las temperaturas críticas para cada tipo de producto—. En la tercera ponencia (Viñas) se presentaron las tendencias actuales en el control biológico de los microorganismos que alteran las frutas, entre las que se destaca el uso de microorganismos antagónicos en frutas para inhibir o evitar el desarrollo de mohos, así como el problema de la aceptación de estos métodos por parte del consumidor.

Los abajo firmantes expresan, una vez más, su profundo reconocimiento a todos los que han participado en esta labor. Creemos que es la mejor forma de difundir las actividades del Grupo de Microbiología de los Alimentos y dejar constancia de los últimos avances en esta ciencia, así como de la labor científica que desarrollan muchos equipos españoles en este campo.

Juan A. Ordóñez y Vicente Sanchis
Editores

Eficacia de las atmósferas modificadas frente a los microorganismos patógenos psicrotrofos en alimentos proteicos

Gonzalo D. García de Fernando,* Sergio B. Mano, Daniel López,
Juan Antonio Ordóñez

*Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos),
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid*

Recibido 12 diciembre 1994/Aceptado 3 marzo 1995

Summary

Modified atmosphere packaging (MAP) of proteinaceous raw foods (meat, poultry and fish) extends their shelf-lives. It is well established that modified atmospheres (MA) inhibit the psychrotrophic aerobic Gram-negative bacteria, the main spoilage microflora of proteinaceous raw foods stored under refrigeration. Several researchers have warned about the possible growth of food poisoning microorganisms on them. Considering the minimal growth temperatures of pathogens, this review only deals with *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *C. botulinum* produces its toxin in many different atmospheres, but it is unable to grow at temperatures below 3.3°C, and its production rate of the toxin at temperatures below 4.5°C is very low, to the extent that fish can be spoiled before the toxin is detected. Therefore, the control of the storage temperature of MAP fish seems to be indispensable to assure the absence of botulinal toxin. With regard to the other pathogens, vacuum is the atmosphere that may support more readily its growth; the higher the CO₂ concentration in the atmosphere, the lower the growth rate is. Some investigations have shown that the growth rates of the psychrotrophic pathogens in MAP are lower than those of the spoilage flora. It has been shown also that *A. hydrophila* and *L. monocytogenes* growth rates are lower under MA than under aerobic storage. In relation to *Y. enterocolitica*, more investigations should be carried out in order to clear up its behaviour, because the available data in the literature are still confusing and sometimes even

* *Correspondencia*: Gonzalo D. García de Fernando. Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Tel.: 91-3943751. Fax: 91-3943743.

contradictory. In conclusion, there are no evidences that support the concern about MAP of proteinaceous raw foods representing a greater hazard than its conventional storage under air.

Key words: modified atmospheres, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*

Resumen

El envasado de alimentos proteicos frescos (carnes y pescados) en atmósferas modificadas prolonga su vida útil. Se ha demostrado que las atmósferas modificadas inhiben el crecimiento de la flora psicrotrofa aerobia Gram-negativa, principal responsable de la alteración de este tipo de alimentos cuando se mantienen en aerobiosis bajo refrigeración. No obstante, varios investigadores han advertido del posible crecimiento de microorganismos causantes de toxiinfecciones en los alimentos así envasados. Considerando las temperaturas mínimas de crecimiento de los microorganismos patógenos, en este artículo sólo se han revisado los datos relativos a *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*. *C. botulinum* produce su toxina en atmósferas muy diversas. Sin embargo, se ha observado que esta bacteria no se desarrolla a temperaturas inferiores a 3,3°C, y que cuando se incuba a 4,5°C o menos, la producción de toxina es muy lenta, de tal forma que el pescado se altera antes de que se detecte la toxina. Por tanto, parece imprescindible controlar la temperatura de almacenamiento para garantizar la ausencia de toxina botulínica en el pescado envasado en atmósferas modificadas. Con respecto a los otros patógenos, puede decirse, en términos generales, que las condiciones que se crean mediante el envasado a vacío son las menos inhibitorias de su crecimiento, y que cuanto más elevada sea la concentración de CO₂ en la atmósfera más se inhibirá el crecimiento de dichas bacterias. En diversas investigaciones se ha observado que la velocidad de crecimiento de las bacterias psicrotrofas patógenas en atmósferas modificadas son menores que la de la flora alterante. Asimismo se ha demostrado que las velocidades de crecimiento de *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes* son menores en atmósferas modificadas que en aire. En relación con *Yersinia enterocolitica*, son necesarias más investigaciones para esclarecer este extremo ya que los resultados disponibles en la bibliografía son algo confusos y, a veces, contradictorios. Puede concluirse que no existen pruebas de que el envasado de alimentos proteicos en atmósferas modificadas represente un riesgo mayor que el del almacenamiento convencional bajo refrigeración.

Introducción

El oxígeno del aire es un factor que influye poderosamente en la vida útil de muchos alimentos, debido a su efecto químico y a que permite el crecimiento de los microorganismos aerobios. Los cambios producidos por estos dos fenómenos modifican las características organolépticas del alimento y provocan su deterioro. Son diversos los sistemas clásicos de conservación, pero se está buscando mejorarlos dado que no colman las expectativas de la industria alimentaria. La congelación es uno de los

métodos más eficaces desarrollados por la tecnología de los alimentos para prolongar la vida útil de la carne y del pescado sin modificar profundamente sus propiedades sensoriales. No obstante, los productos congelados pueden presentar unas propiedades sensoriales deficientes y, sobre todo, si la congelación y descongelación se realizan en condiciones inadecuadas, sufren una considerable depreciación. Por tanto, se han investigado otros métodos para prolongar la vida útil de los alimentos refrigerados. Entre ellos, cabe citar el envasado en atmósferas modificadas, que puede definirse como el almacenamiento de un producto alimenticio en un material barrera herméticamente cerrado, en el que el aire ha sido evacuado o sustituido por un gas o mezcla de gases, para inhibir el crecimiento microbiano. Ya en los años 30 se comprobó que la vida útil de la carne y del pescado podía prolongarse si se almacenaban bajo refrigeración en una atmósfera enriquecida en CO₂ (50). El envasado en atmósferas modificadas permite, al menos, duplicar su vida útil. El CO₂ inhibe el crecimiento microbiano, sobre todo el de la flora aerobia Gram-negativa, pero su efecto sobre otros microorganismos es escaso o nulo; algunas bacterias (ej. *Brochothrix thermosphacta*) toleran hasta un 75% y otras, como la flora láctica, pueden crecer en el 100% de CO₂ (5, 18). La edad del cultivo también es una variable a destacar; se ha demostrado que conforme la bacteria deja la fase de latencia y entra en la exponencial, el efecto inhibitorio se reduce. Por tanto, conviene envasar el producto cuanto antes, ya que es más probable que las bacterias no estén aún en fase exponencial (5, 18). La temperatura es importante, ya que el CO₂ es mucho más inhibitorio a temperaturas de refrigeración debido a que en estas condiciones es más soluble, por lo que estará más concentrado en la fase acuosa del alimento (5, 18, 50). La concentración de CO₂ ha de ser al menos del 20% para que sea eficaz, habiéndose utilizado concentraciones entre el 20 y el 100%, dependiendo de las características del alimento a envasar (58).

La flora típica de la carne envasada en atmósferas modificadas suele constar, en magnitud decreciente, de flora láctica y/o *Brochothrix thermosphacta* y, en menor medida, de enterobacterias y *Pseudomonas* spp., dependiendo sus porcentajes de la concentración de CO₂ en la atmósfera (1, 48, 49).

Diversos investigadores (16, 25, 26, 50) se han preguntado qué ocurre con los microorganismos psicrotrofos causantes de toxiinfecciones alimentarias en los productos envasados en atmósferas modificadas. A primera vista cabe pensar que si el CO₂ inhibe la flora alterante típica (psicrotrofas aerobias Gram-negativas), los microorganismos más resistentes al CO₂ no tendrán flora competidora y su multiplicación se verá favorecida. Por ello, aunque la carga inicial del patógeno no sea muy elevada, si es resistente a este gas, puede alcanzar tasas peligrosas, siendo ésta una razón esgrimida por los detractores del envasado en atmósferas modificadas. Sin embargo, Marshall et al. (45) han demostrado que la presencia y proliferación de *Pseudomonas fluorescens* potencia la multiplicación de *L. monocytogenes*, lo que puede deberse a la liberación de péptidos (fácilmente metabolizables por el patógeno) provocada por la reconocida capacidad proteolítica de las pseudomonas.

Dado que las carnes y pescados frescos envasados en atmósferas modificadas deben mantenerse en refrigeración, los microorganismos patógenos que pueden causar problemas son principalmente: *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum* tipo E y los no proteolíticos de los tipos B y F, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*. Todos son capaces de crecer en los alimentos a 4°C y a ellos exclusivamente nos referiremos en la presente revisión. Otros microorganismos con temperaturas mínimas de crecimiento cercanas a las de los antes citados son *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Plesiomonas shigelloides*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. Si se producen abusos en la temperatura de conservación, estas bacterias podrían causar problemas.

Aeromonas hydrophila

La incidencia de esta bacteria en los alimentos puede ser considerable. En un estudio realizado por Barnhart et al. (4), se detectó *Aeromonas* spp. en el 98% de las canales de pollo estudiadas. Otros autores han tenido resultados menos desalentadores; así Myers et al. (47) aislaron *Aeromonas* spp. en el 20% de las muestras de carne de cerdo envasada a vacío. En otros productos cárnicos los datos disponibles son muy variables, oscilando los valores medios entre 28 y 35% (28). Aproximadamente el 70% de los moluscos bivalvos se encuentran contaminados con *A. hydrophila* y *A. sobria*, mientras que en pescados la incidencia es menos importante (28). La temperatura mínima de crecimiento de las cepas aisladas de alimentos oscila entre $-0,1$ y $+1,2^{\circ}\text{C}$ (61), más baja que la de las *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas (35), aunque recientemente (29) se ha visto que *A. hydrophila* puede multiplicarse a temperaturas más bajas.

En la Tabla 1 se recopilan los resultados más destacados aparecidos en la bibliografía sobre la posible multiplicación de *A. hydrophila* en carnes y pescados refrigerados envasados en atmósferas modificadas y mantenidos en refrigeración. Se ha afirmado que el nitrógeno favorece la multiplicación de *A. hydrophila* en comparación con su crecimiento en aire (20, 60), aunque esto no se ha confirmado en carne de cerdo y pavo envasadas en una atmósfera del 100% de N_2 y mantenidas a 1 y 7°C , ya que, a pesar de que los recuentos de este microorganismo aumentaron durante el almacenamiento, los tiempos de generación (g) en nitrógeno fueron algo más prolongados que los observados en aire (Mano y col., datos no publicados). Se ha detectado crecimiento de *A. hydrophila* en diversos productos envasados al vacío y almacenados entre -2 y 10°C , como carne de vacuno (17), “roast beef” (29), colas de cangrejo cocinadas (30) y carne de cerdo a 1°C (38, 57), aunque en algún caso (38) se obtuvieron resultados contradictorios, ya que en una serie de muestras no se observó crecimiento de la cepa inoculada. En resumen, puede decirse que las probabilidades de crecimiento de este microorganismo en vacío son muy elevadas, incluso a temperaturas por debajo de 0°C .

Diversos autores (20, 61) han afirmado que el CO_2 inhibe *A. hydrophila*. Sheridan et al. (57) no detectaron crecimiento alguno de esta bacteria en carne de cordero envasada en CO_2/O_2 [20/80], CO_2/N_2 [50/50] ni en 100% de CO_2 a 5°C , ni siquiera con medios de enriquecimiento tras 21 días de almacenamiento. También se ha observado (29) la inhibición de este psicrotrofo en “roast beef” envasado en una atmósfera compuesta por 100% de CO_2 y mantenido a $-1,5^{\circ}\text{C}$; en cambio, se detectó crecimiento a 3°C en ese mismo alimento y atmósfera. Gill y Reichel (17) obtuvieron resultados similares al comprobar la multiplicación de esta bacteria en carne de vacuno (pH 6,0) mantenida en una atmósfera controlada de CO_2 a 10°C , pero no a 6°C . Ingham (30) observó la multiplicación a 8°C y no a 2°C en colas de cangrejo cocinadas y mantenidas en una atmósfera del 80% de CO_2 ; Mano y col. (datos no publicados), comprobaron crecimiento en carnes de cerdo y pavo envasadas en CO_2/O_2 [20/80] y mantenidas a 7°C y no lo detectaron a 1°C . Sin embargo, no detectaron crecimiento alguno, ni siquiera a 7°C , cuando ambas carnes se envasaban en una atmósfera de CO_2/O_2 [40/60]. También se ha descrito el crecimiento de este patógeno en surimi y en pescado picado almacenados en $\text{CO}_2/\text{O}_2/\text{N}_2$ [36/13/51] a 5°C (32). Los datos aparecidos en la bibliografía no permiten concluir que el CO_2 detenga el crecimiento de esta bacteria, sólo que lo inhibe. Por regla general, las fases de latencia y los valores g de *A. hydrophila* en alimentos envasados en atmósferas enriquecidas en CO_2 son más prolongados que los medidos en los

TABLA 1. Crecimiento de *Aeromonas hydrophila* en alimentos refrigerados y envasados en atmósferas modificadas

Alimento	Atmósfera	Temperatura (°C)	Crecimiento	Referencia
Vacuno	Vacío	-2	+	17
“Roast beef”	Vacío	-1,5	+	29
Cangrejo cocinado	Vacío	2	+	30
Cerdo	Vacío	1	+/- ^a	38
Cordero	Vacío	0 y 5	-	57
Cerdo y pavo	100% N ₂	1 y 7	+	*
Cordero	20/80 CO ₂ /O ₂ ,			
	50/50 CO ₂ /N ₂ , 100% CO ₂	5	-	57
Pavo y cerdo	20/80 CO ₂ /O ₂	1	-	*
Pavo y cerdo	20/80 CO ₂ /O ₂	7	+	*
Pescado picado y surimi	36/13/51 CO ₂ /O ₂ /N ₂	4	+	32
Pavo	40/60 CO ₂ /O ₂	1 y 7	-	*
Cerdo	40/60 CO ₂ /O ₂	1 y 7	-	*
Cangrejo cocinado	80% CO ₂	2	-	30
Cangrejo cocinado	80% CO ₂	8	+	30
“Roast beef”	100% CO ₂	-1,5	-	29
“Roast beef”	100% CO ₂	3	+	29
Vacuno	100% CO ₂	6	-	17
Vacuno	100% CO ₂	10	+	17

^a Se observó crecimiento en una experiencia y no en otra, con la misma cepa y condiciones.

* Mano y col. (datos no publicados).

envasados en vacío o aeróbicamente. Por tanto, cabe concluir que *A. hydrophila* no representa un peligro añadido en el envasado de carnes y pescados en atmósferas modificadas, en comparación con el sistema tradicional de almacenamiento, ya que si se mantiene la temperatura suficientemente baja se impide la multiplicación de *A. hydrophila* en alimentos envasados en atmósferas enriquecidas en CO₂ y, si se producen abusos en la temperatura de almacenamiento, los tiempos de duplicación de este microorganismo son más prolongados en presencia de este gas.

Clostridium botulinum

Uno de los riesgos más importantes del envasado de alimentos en atmósferas enriquecidas en CO₂ es la potenciación del crecimiento de *Clostridium botulinum*. Este supuesto se basa en su capacidad para multiplicarse en condiciones anaerobias, en el efecto estimulante del CO₂ en la germinación de esporas,

en la inhibición de la flora aerobia alterante y en los posibles abusos de temperatura durante el almacenamiento (64).

En relación con la conservación de pescado refrigerado en atmósferas modificadas, los microorganismos que más preocupan son los del tipo E y las cepas no proteolíticas de los B y F de *Clostridium botulinum*. Todos ellos pueden aislarse de los productos de la pesca y multiplicarse y producir toxina, aunque lentamente, a 3,3°C (61). El tiempo de generación de *C. botulinum* B en medio de cultivo (pH 6,7) a 3,9°C es de 42 horas (21). En cambio, la temperatura mínima de crecimiento de las cepas proteolíticas es 12,5°C (61).

Se ha constatado (3) una incidencia significativa (entre un 22 y un 67%) de *C. botulinum* en productos marinos. Por regla general, los clostridios tipo E y los B y F no proteolíticos no causan alteraciones organolépticas en el pescado, pudiendo darse el caso de existir una carga suficiente para que la producción de toxina sea previa a la aparición de signos de alteración causados por otros microorganismos. Diversos investigadores (15, 51, 59, Llobrera, A. T. 1983. Tesis doctoral, Texas A & M University, College Station, Texas) han detectado toxina botulínica en pescados envasados en diversas atmósferas modificadas (Tabla 2) y mantenidos a temperaturas inferiores a 5°C. Pero en casi todos los casos el pescado ya presentaba signos evidentes de alteración antes de que se detectase la toxina botulínica; la excepción la ofrecen Post et al. (51), quienes observaron la producción de toxina antes del deterioro del bacalao a 4°C, envasado en 100% de CO₂. En cambio, es relativamente frecuente la detección de la toxina con anterioridad a la alteración cuando el pescado envasado en atmósferas modificadas se almacena a temperaturas superiores (51). En otras experiencias no se ha observado producción de toxina botulínica, por ejemplo, en vieiras inoculadas con los tipos A, B, E y F tras mantenerlas a 4 y 10°C en vacío (13), o en carne de cerdo envasada en varias atmósferas (véase más adelante) a 4°C (39, 40, 41).

Aparte del aumento del riesgo con el incremento de la temperatura (2), hay otros factores que pueden jugar un papel destacado. Cuanto mayor es el número de esporas, mayor es el peligro de producción de toxina (53). También es importante el punto de contaminación. Stier et al. (59) comprobaron que apilando filetes de salmón con inóculo entre ellos, no se daban las condiciones para la producción de toxina, mientras que Cann et al. (7) observaron que inoculando intramuscularmente se producía toxina antes que cuando el inóculo era superficial.

Lambert et al. (39, 40, 41) han estudiado los efectos de diversas atmósferas en la producción de toxina botulínica en carne de cerdo. Comprobaron que se producía toxina a 15°C en las siguientes atmósferas: 100% de N₂, O₂/N₂ [10/90] y O₂/N₂ [20/80]. Sin embargo, a 5°C la toxina no se detectó tras 44 días de almacenamiento (39). Este grupo de investigadores también ha constatado que la producción de toxina era más rápida cuando en una atmósfera de N₂ existía inicialmente un 20% de O₂ (39, 41), lo cual parece rebatir la recomendación de Hotchkiss (27) de incluir O₂ en la atmósfera para reducir el riesgo de producción de toxina. Se ha observado también (40) que la producción de toxina a 15°C se reducía, contrariamente a lo esperado, en atmósferas con un elevado porcentaje de CO₂ (45–75%), en las que el gas complementario era N₂. Ya anteriormente se había comprobado el efecto inhibitorio del CO₂ (9), al observarse una mayor liberación de toxina con el 100% de N₂ que con el 100% de CO₂. Tratamientos adicionales pueden inhibir la producción de toxina; se ha propuesto la irradiación (39, 40, 41, 52), o la inmersión en soluciones antisépticas (52).

Parece, pues, que para garantizar la inocuidad de los alimentos envasados en atmósferas modificadas y susceptibles de contener toxina botulínica, hay que exigir un riguroso control de la temperatura. El

TABLA 2. Producción de toxina botulínica en alimentos refrigerados y envasados en atmósferas modificadas

Alimento	Atmósfera	Temperatura (°C)	Detección de toxina	Producción de toxina antes de alteración	Referencia
Vieira	Vacío	4 y 10	-		13
Bacalao y bacaladilla	Vacío	8	+	No	51
Bacalao	100% N ₂	8	+	Coincidente	51
Bacalao	100% CO ₂ ,				
	90/8/2 CO ₂ /N ₂ /O ₂	8	+	Sí	51
Bacalao	65/31/4 CO ₂ /N ₂ /O ₂	8	+	Sí	51
Bacaladilla	100% N ₂ ,				
	100% CO ₂	8	+	No	51
Bacaladilla	90/8/2 CO ₂ /N ₂ /O ₂	8	+	Sí	51
Bacaladilla	65/31/4 CO ₂ /N ₂ /O ₂	8	+	Sí	51
Salmón	60/15/25 CO ₂ /N ₂ /O ₂	4,4	+	No	59
Platija	70/30 CO ₂ /aire,				
	100% CO ₂	4,4	+	No	*
Salmón	Vacío,				
	70/30 CO ₂ /aire,				
	100% CO ₂	4	+	No	14, 15
Bacalao	100% CO ₂	4	+	Sí	51
Bacaladilla	100% CO ₂	4	+	No	51
Cerdo	80/20 N ₂ /O ₂ ,				
	90/10 N ₂ /O ₂ ,				
	100% N ₂	4	-		39

* Llobrera, A. T. 1983. Tesis doctoral, Texas A & M University, College Station, Texas.

clostridio no se desarrolla por debajo de 3,3°C, y todos los datos aquí recogidos apuntan a que si se sobrepasa ligeramente esa temperatura, la producción de toxina es posterior a la alteración del pescado. No obstante, siempre se corre cierto riesgo de que se produzca un abuso en la temperatura de almacenamiento, lo cual es mucho más probable en la cadena de distribución, en los puntos de venta y más aún en los hogares de los consumidores (53).

Listeria monocytogenes

Las listerias son ubicuas. Pueden encontrarse en hábitats tan distintos como el intestino de animales y hombres sanos, en el ámbito doméstico (refrigeradores, paños), alimentos y suelos. Los alimentos están

frecuentemente contaminados con listerias, pero en bajo número. Por ejemplo, se ha comprobado (54) que aproximadamente el 8% de carnes listas para consumo, el 15% de carnes de ave cocinada, el 2,5% de leche y productos lácteos y el 5% de vegetales estaban contaminados con listeria, pero siempre había menos de 100 unidades formadoras de colonia/g de alimento. Los alimentos que se han apuntado como más peligrosos son quesos blandos de poca acidez (Camembert y Brie) y patés. Quizás sea recomendable evitar su consumo por los grupos de riesgo, ya que puede causar elevadas tasas de mortalidad en ellos (10).

Al ser este microorganismo psicrotrofo y descubrirse que se transmite por los alimentos y provoca listeriosis, se hizo necesario conocer su comportamiento en los alimentos conservados en refrigeración. Carnes y pescados son potencialmente peligrosos porque la presencia de esta bacteria en ellos es frecuente y porque *L. monocytogenes* puede crecer o sobrevivir en las condiciones normales de almacenamiento de estos productos (6). La proliferación de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración es lenta pero, en términos generales, puede afirmarse que se desarrolla a 1°C (61), aunque también se ha comprobado su crecimiento a -1,5°C (29).

Diversos investigadores han estudiado el destino de *L. monocytogenes* en carnes envasadas en atmósferas modificadas. Los resultados más relevantes están recogidos en la Tabla 3. En la bibliografía hay cierta controversia en relación con el efecto de las atmósferas modificadas. Se ha afirmado (65) que esta bacteria no era inhibida significativamente por el envasado en vacío o en atmósferas enriquecidas en CO₂, y que podría predominar en carnes o productos cárnicos refrigerados así envasados. Esta afirmación se basa en que *L. monocytogenes* se desarrolló más que la flora alterante en carne de pollo cruda (62) y precocinada (31, 46) envasada en atmósferas modificadas. En cambio, otros autores han comprobado que el envasado en estas atmósferas inhibe el crecimiento de listeria (17, 29).

La capacidad de crecimiento en vacío ha quedado bien demostrada en carne de vacuno a temperaturas de refrigeración (22), cordero a 5°C (57), cerdo a 1°C (38) y “roast beef” a -1,5°C (29). También se ha detectado su crecimiento en el 100% de N₂ en carne de pavo (pH 6,0) a 7°C, no habiéndose apreciado en este mismo alimento a 1°C, ni en carne de cerdo (pH 5,3) a 7°C (43). El efecto del CO₂ en el crecimiento y supervivencia de la listeria no está claro. Diversos estudios coinciden en que esta bacteria no se desarrolla en carnes de pollo a 1 y 6°C (24), vacuno a 5°C (17), cordero a 5°C (57) y “roast beef” a -1,5°C (29) envasadas en atmósferas compuestas exclusivamente por CO₂, pero se ha descrito (29) que pueden crecer en “roast beef” en esa atmósfera a 3°C. Parece ser que la ausencia de oxígeno en la atmósfera no es ningún obstáculo para el desarrollo de este microorganismo. Se ha comprobado crecimiento de listeria en cordero a 5°C en una atmósfera de CO₂/N₂ [50/50] (8, 57), en salchichas tipo “frankfurt” envasadas en diversas proporciones de CO₂/N₂ a 4, 7 y 10°C (37) y en carne de cerdo envasada en CO₂/N₂ [40/60] a 4°C (44). En cambio, otros autores no han detectado crecimiento en ausencia de O₂ (aparte de los antes reseñados en 100% de CO₂), ya que no se ha observado crecimiento en carne de pollo a 6°C envasada en CO₂/N₂ [30/70] (24) ni a 4°C envasada en CO₂/N₂ [75/25] (62).

El efecto de la inclusión de O₂ en atmósferas enriquecidas en CO₂ es también confuso. Wimpfheimer et al. (62) comprobaron que al incluir O₂ en una atmósfera que no permitía el crecimiento, éste se inducía. Es decir, la inclusión del 5% de O₂ (CO₂/O₂/N₂) [72,5/5/22,5] en una atmósfera anaeróbica (CO₂/O₂/N₂) [75/0/25] provocaba el crecimiento de listeria. En cambio, no se ha apreciado (44) diferencia alguna en el crecimiento de la listeria a 4°C en carne de cerdo envasada en anaerobiosis (CO₂/O₂/N₂) [40/0/60] o

TABLA 3. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en carnes y productos cárnicos refrigerados y envasados en atmósferas modificadas

Alimento	Atmósfera	Temperatura (°C)	Crecimiento	Referencia
Vacuno (pH 5,6 y 6,0)	Vacío	0 y 5	+	8, 22
Vacuno (pH 6,0)	Vacío	-2	-	17
Vacuno (pH 6,0)	Vacío	0, 2 y 5	+	17
Vacuno	Vacío	5	-	8
Vacuno (pH 5,6)	Vacío	2, 4 y 7	-	34
Vacuno (pH 5,8 y 5,9)	Vacío	2 y 4	-	34
Vacuno (pH 5,8 y 5,9)	Vacío	7	+	34
Cordero	Vacío, 50/50 CO ₂ /N ₂	5	+	57
Cerdo	Vacío	1	+	38
“Roast beef”	Vacío	-1,5 y 3	+	29
Cerdo (pH 5,3)	100% N ₂	1 y 7	-	43
Pavo (pH 6,0)	100% N ₂	1	-	43
Pavo (pH 6,0)	100% N ₂	7	+	43
Pollo	30/70 CO ₂ /aire	1 y 6	-	24
Salch. “frankfurt”	20/80, 30/70, 50/50 CO ₂ /N ₂	4, 7 y 10	+	37
Pollo	30/70 CO ₂ /N ₂	1 y 6	-	24
Vacuno	50/50 CO ₂ /N ₂	5	-	8
Cerdo	40/60 CO ₂ /N ₂ , 40/10/50 CO ₂ /O ₂ /N ₂	4	+	44
Pollo	75/25 CO ₂ /N ₂	4	-	62
Cerdo	25/65/10 CO ₂ /O ₂ /N ₂	3	-	12
Pollo	72,5/5/22,5 CO ₂ /O ₂ /N ₂	4	+	62
Vacuno	20/80 CO ₂ /O ₂	5	-	8
Cordero	20/80 CO ₂ /O ₂	5	+	57
Cerdo (pH 5,3)	20/80, 40/60 CO ₂ /O ₂	1 y 7	-	43
Pavo (pH 6,0)	20/80, 40/60 CO ₂ /O ₂	1	-	43
Pavo (pH 6,0)	20/80, 40/60 CO ₂ /O ₂	7	+	43
Pollo	90/10 CO ₂ /O ₂	6	+	64
Pollo	100% CO ₂	1 y 6	-	24
Vacuno	100% CO ₂	5	-	8, 17
Cordero	100% CO ₂	5	-	57
“Roast beef”	100% CO ₂	-1,5	-	29
“Roast beef”	100% CO ₂	3	+	29

con O₂ (CO₂/O₂/N₂) [40/10/50]. Para aumentar la confusión, no se ha detectado crecimiento alguno de diversas cepas en carne picada de vacuno sin envasar en atmósfera modificada ni a 4°C (33, 55) ni a 25°C (55).

Otros autores (43) no han detectado crecimiento en carne de cerdo (pH 5,3) a 1 y 7°C y pavo (pH 6,0) a 1°C envasadas en CO₂/O₂ [20/80] y [40/60], mientras que sí se ha observado en pavo a 7°C en esas mismas atmósferas. Más arriba se han indicado resultados similares para la atmósfera de 100% de N₂. De estos resultados puede deducirse la importancia del pH de la carne, como ya ha sido apuntado (19, 34); se ha observado (34) crecimiento en carne de vacuno de pH 5,8 envasada a vacío a 7°C, pero no en carne de pH 5,6.

Mano et al. (43) han medido los valores g de la flora de carnes de cerdo y pavo envasadas en atmósferas modificadas, concluyendo que los valores g de listeria, cuando se multiplica, son mayores que los de la flora alterante. Así mismo, dichos valores se prolongan a medida que aumenta la concentración de CO₂, constatándose, pues, el efecto inhibitor del CO₂.

Por regla general, las atmósferas que no permiten la multiplicación de *L. monocytogenes* no son bactericidas. En aquellos casos en los que se ha apreciado una disminución de la carga de listerias durante el almacenamiento, fue de escasa importancia (43).

Los datos mencionados permiten concluir que no es posible considerar la modificación de la atmósfera por sí sola como el único factor de inhibición de la listeria, sino que otros factores pueden ser también decisivos, sobre todo temperatura y el pH, aunque la flora competitiva pueda también tener cierta relevancia. Puede asegurarse, por tanto, que el envasado en atmósferas modificadas no tiene por qué entrañar un peligro adicional de crecimiento de *L. monocytogenes*, en comparación al envasado convencional en aerobiosis.

Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica y especies afines están omnipresentes tanto en ecosistemas terrestres como de aguas dulces. Quizá sean los productos del cerdo los principales responsables de la aparición de yersinias en el hombre. Se reconoció su patogenicidad hace unos 50 años, aunque su significación como patógeno puede pasar inadvertida, ya que su consumo no implica necesariamente la aparición de yersiniosis (42).

El crecimiento/supervivencia de este microorganismo en la carne depende del pH, la temperatura y las condiciones ambientales (envasado en atmósferas modificadas) empleadas para su almacenamiento (48). La temperatura mínima de crecimiento más aceptada es 4°C (61), pero se ha detectado su multiplicación en carne a 1°C (23) e incluso a -1,5°C (29) y -2°C (17).

La Tabla 4 recoge los resultados más relevantes obtenidos sobre el posible crecimiento de *Y. enterocolitica* en carnes envasadas en atmósferas modificadas. Por lo que respecta al envasado en vacío, no se ha observado (38) crecimiento en carne de cerdo a 1°C; es más, sólo se aisló esporádicamente alguna colonia de yersinia durante los 9 días de almacenamiento. En cambio, otros autores detectaron crecimiento de este microorganismo en carne de cordero a 0°C (56, 57), en carne de vacuno a -2°C (17) y en "roast beef" a 3°C, aunque no a -1,5°C (29).

TABLA 4. Crecimiento de *Yersinia enterocolitica* en carne y productos cárnicos refrigerados y envasados en atmósferas modificadas

Alimento	Atmósfera	Temperatura (°C)	Crecimiento	Referencia
Vacuno	Vacío	-2	+	17
"Roast beef"	Vacío	-1,5	+	29
Cordero	Vacío	0 y 5	-	56, 57
Cerdo	Vacío	1	-	38
Cerdo	Vacío, 20/80 CO ₂ /N ₂ , 40/60 CO ₂ /N ₂	4	+	44
Cordero sin picar	50/50 CO ₂ /N ₂	0 y 5	+	56, 57
Cordero picado	50/50 CO ₂ /N ₂	0	-	56, 57
Cordero picado	50/50 CO ₂ /N ₂	5	+	56, 57
Cerdo	25/65/10 CO ₂ /O ₂ /N ₂	Refrigeración	-	12
Cerdo	40/10/50 CO ₂ /O ₂ /N ₂	4	+	44
Cordero	20/80 CO ₂ /O ₂	0	-	56, 57
Cordero	20/80 CO ₂ /O ₂	5	+	56, 57
Vacuno picado	20/80 CO ₂ /O ₂	4	-	36
Vacuno	100% CO ₂	5	+	17
Cordero	100% CO ₂	0	-	56, 57
Cordero picado	100% CO ₂	5	-	56, 57
Cordero sin picar	100% CO ₂	5	+	56, 57
"Roast beef"	100% CO ₂	3	+	29

No está suficientemente aclarado el efecto del CO₂ en el crecimiento de *Y. enterocolitica*. En estudios in vitro se ha comprobado que, en general, una concentración de CO₂ de más del 40% inhibe el crecimiento de la yersinia (63), no habiéndose detectado en carne de cerdo envasada en CO₂/O₂/N₂ [25/65/10] (12), pero sí, y rápidamente, en chuletas de cerdo envasadas en vacío y en CO₂/O₂/N₂ [20/0/80, 40/0/60 y 40/10/50] e incubadas a 4°C, temperatura en la que no se observó fase de latencia, siendo el microorganismo predominante al final de la experiencia (44). En cambio cuando la yersinia se incubó en aire, el crecimiento fue más lento y concluyó antes, posiblemente a causa de la flora competidora, con lo que su tasa final fue considerablemente menor que la carga microbiana total (44). En esta misma línea se ha observado (17) que *Y. enterocolitica* se desarrolla en carne de vacuno (pH 6,0) a 5°C en una atmósfera controlada del 100% de CO₂, mientras que Eklund y Jarmund (11) informaron que el crecimiento de *Y. enterocolitica* se reducía el 100%, 98% y 43% en una atmósfera de 100% de CO₂ respecto al crecimiento en aire a 2, 6 y 20°C en un sistema modelo. Por su parte, Sheridan et al. (56, 57) no detectaron crecimiento en carne de cordero ni en 100% de CO₂ ni en CO₂/O₂ [20/80] a 0°C, pero sí lo hicieron a 5°C. Paradójicamente, estos últimos autores observaron la multiplicación de esta bacteria en una atmósfera de CO₂/N₂ [50/50], teóricamente más inhibitoria que la última, a 0°C, por lo que cabe pensar que el O₂ ejerce un efecto inhibitor, lo que concuerda con los resultados de otros autores (44). Además, Sheridan

et al. (56, 57) comprobaron que en carne de cordero picada la yersinia no creció a 0°C en una atmósfera de CO₂/N₂ [50/50] pero sí lo hizo en una pieza de cordero (sin picar) en las mismas condiciones. El picado de la carne también fue un obstáculo para el crecimiento de *Y. enterocolitica* a 5°C y 100% de CO₂. Es decir, la bacteria se multiplicó en la pieza íntegra, pero no en la carne picada. Por su parte, Kleinlein y Untermann (36) observaron que *Y. enterocolitica* no crecía en carne de vacuno picada a 4°C en una atmósfera de CO₂/O₂ [20/80].

Se ha observado (29) que la fase de latencia de *Y. enterocolitica* es la misma en vacío que en el 100% de CO₂ a 3°C, pero el valor g es más de 5 veces mayor en CO₂, y que *Yersinia enterocolitica* podía desarrollarse a la misma velocidad que la flora alterante en carne de vacuno (pH 6,0) envasada en el 100% de CO₂ a 5°C (17).

Aunque los datos en la bibliografía son confusos, y a menudo contradictorios, Hudson et al. (29) concluyeron que puede ser imprescindible un porcentaje de CO₂ superior al 75% en ausencia de O₂ para asegurar la inhibición total del crecimiento de *Y. enterocolitica*. De todas formas, con las experiencias realizadas hasta el momento no pueden extraerse conclusiones inequívocas. Parece recomendable profundizar más en la investigación del efecto sobre el crecimiento de esta bacteria del pH, la temperatura y el envasado en atmósferas modificadas, atendiendo especialmente al posible efecto inhibitor del aire sugerido por Manu-Tawiah (44).

Conclusiones generales

Puede concluirse, en general, que el vacío es la atmósfera modificada que menos efecto inhibitor tiene en el crecimiento de la flora psicrotrofa patógena, sin que entrañe un riesgo añadido en comparación con el envasado convencional en aerobiosis. La inhibición de psicrotrofos patógenos observada en atmósferas modificadas se debe principalmente al CO₂, que actúa sinérgicamente con la temperatura y el pH. Sin embargo, no deben olvidarse otros factores, que pueden influir de forma concomitante, como la tensión de oxígeno y la competencia microbiana, sobre todo con bacterias lácticas, que suelen constituir un porcentaje importante en carnes y pescados envasados en atmósferas modificadas.

Los autores del presente artículo hacen suya la opinión de Smith et al. (58), quienes concluyeron: “there is little conclusive evidence that gas packaging represents a significantly greater hazard than packaging in air”, es decir hay pocas pruebas que induzcan a pensar que el envasado en atmósferas modificadas entrañe un riesgo mayor que el que se corre con el envasado convencional en aerobiosis.

Agradecimientos

El trabajo de nuestro grupo sobre el envasado de carnes y pescados en atmósferas modificadas está subvencionado por la CICYT, proyecto ALI94-0350. Los autores agradecen a la CAPES-DAFA (Brasil) la beca que disfruta S. Mano.

Bibliografía

1. Asensio, M. A., Ordóñez, J. A., Sanz, B. (1988). Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on the shelf-life of refrigerated pork packed in plastic bags. *J. Food Prot.* **51**, 356–360.
2. Baker, D. A., Genigeorgis, C. (1990). Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. *J. Food Prot.* **53**, 131–140.
3. Baker, D. A., Genigeorgis, C., García, G. W. (1990). Prevalence of *Clostridium botulinum* in seafood and significance of multiple incubation temperatures for determination of its presence and type in fresh retail fish. *J. Food Prot.* **53**, 668–673.
4. Barnhart, H. M., Pancorbo, O. C., Dresden, D. W., Shotts, E. B. (1989). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from carcasses and processing water in a broiler processing operation. *J. Food Prot.* **52**, 646–649.
5. Brody, A. L. (1989). *Controlled/Modified Atmosphere/Vacuum Packaging of Foods*. Food and Nutrition Press Inc., Trumbull, Connecticut.
6. Buchanan, R. L., Stahl, H. G., Whiting, R. C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**, 844–851.
7. Cann, D. C., Smith, G. L., Houston, N. G. (1983). *Further Studies on Marine Fish Stored under Modified Atmosphere Packaging*. Technical Report, Torry Research Station, Aberdeen, UK.
8. Church, P. N., Davies, A. R., Slade, A., Hart, R. J., Gibbs, P. A. (1992). Improving the safety and quality of meat and meat products by modified atmosphere and assessment by novel methods. FLAIR 89055 Iterim. 2nd year report, EEC DGXII, Brussels.
9. Doyle, M. P. (1983). Effect of CO₂ on toxin production by *Clostridium botulinum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 53–56.
10. Doyle, M. P. (1994). The emergence of new agents of foodborne disease in the 1980s. *Food Res. Int.* **27**, 219–226.
11. Eklund, T., Jarmund, T. (1983). Microculture model studies on the effect of various gas atmospheres on microbial growth at different temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 119–125.
12. Elzen, A. M. G. Van den, Houben, J. H., Sniijders, J. M. A. (1994). Effect of modified atmosphere packaging on the survival of pathogens on artificially contaminated pork. Proc. 40th Int. Cong. Meat Sci. Technol. S.2A.11. The Hague.
13. Fletcher, G. C., Murrel, W. G., Statham, J. A., Stewart, B. J., Bremner, H. A. (1988). Packaging scallops with sorbate: An assessment of the hazard from *Clostridium botulinum*. *J. Food Sci.* **53**, 349–352, 358.
14. García, G. W., Genigeorgis, C. (1987). Quantitative evaluation of *Clostridium botulinum* non-proteolytic types B, E and F growth risk in fresh salmon tissue homogenates stored under modified atmospheres. *J. Food Prot.* **50**, 390–397.
15. García, G. W., Genigeorgis, C., Lindroth, S. (1987). Risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* non-proteolytic types B, E, and F in salmon fillets stored under modified atmospheres at low and abused temperatures. *J. Food Prot.* **50**, 330–336.
16. Genigeorgis, C. (1985). Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *Int. J. Food Microbiol.* **1**, 237–251.
17. Gill, C. O., Reichel, M. P. (1989). Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* **6**, 223–230.
18. Gill, C. O., Tan, K. H. (1980). Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 317–324.

19. Glass, K. A., Doyle, M. P. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1565–1569.
20. Golden, D. A., Eyles, M. J., Beuchat, L. R. (1989). Influence of modified-atmosphere storage on the growth of uninjured and heat-injured *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3012–3015.
21. Graham, A., Lund, B. M. (1993). The effect of temperature on the growth of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 158–160.
22. Grau, F. H., Vanderlinde, P. B. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *J. Food Prot.* **53**, 739–741, 746.
23. Hanna, M. O., Stewart, J. C., Zinc, D. L., Carpenter, Z. L., Vanderzant, C. (1977). Development of *Yersinia enterocolitica* in raw and cooked beef and pork at different temperatures. *J. Food Sci.* **42**, 1180–1184.
24. Hart, C. D., Mead, G. C., Norris, A. P. (1991). Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 40–46.
25. Hintlian, C. B., Hotchkiss, J. H. (1986). The safety of modified atmosphere packaging: a review. *Food Technol.* **40**, 70–76.
26. Hood, D. E., Mead, G. C. (1993). Modified atmosphere storage of fresh meat and poultry. In Parry, R. T. (ed.), *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*, pp. 269–298. Blackie Academic & Professional, London.
27. Hotchkiss, J. H. (1988). Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres. *Food Technol.* **42**, 55–64.
28. Hudson, J. A., DeLacy, K. M. (1991). Incidence of motile aeromonads in New Zealand retail foods. *J. Food Prot.* **54**, 696–699.
29. Hudson, J. H., Mott, S. J., Penney, N. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J. Food Prot.* **57**, 204–208.
30. Ingham, S. C. (1990). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* on cooked crayfish tails during cold storage under air, vacuum, and modified atmosphere. *J. Food. Prot.* **53**, 665–667.
31. Ingham, S. C., Escude, J. M., McCown, P. (1990). Comparative growth rates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked chicken loaf stored under air and two modified atmospheres. *J. Food Prot.* **53**, 289–291.
32. Ingham, S. C., Potter, N. N. (1988). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fragi* on mince and surimis made from Atlantic pollock and stored under air or modified atmosphere. *J. Food Prot.* **51**, 966–970.
33. Johnson, J. L., Doyle, M. P., Cassens, R. G. (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 243–247.
34. Kaya, M., Smith, U. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed beef. *Fleischwirtschaft* **71**, 424–426.
35. Kirov, S. M., Anderson, M. J., McMeekin, T. A. (1990). A note on *Aeromonas* spp. from chicken as possible foodborne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 327–334.
36. Kleinlein, N., Untermann, F. (1990). Growth of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in minced meat with and without protective gas with consideration of the competitive background flora. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 65–71.
37. Krämer, K. H., Baumgart, J. (1992). Brühwurstaufschnitt hemmung von *Listeria monocytogenes* durch eine modifizierte atmosphäre. *Fleischwirtschaft* **72**, 666–668.
38. Laack, R. L. J. M. van, Johnson, J. L., Van der Palen, C. J. N. M., Smulders, F. J. M., Snijders, J. M. A. (1993). Survival of pathogenic bacteria on pork loins as influenced by hot processing and packaging. *J. Food Prot.* **56**, 847–851, 873.
39. Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991). Combined effect of modified atmosphere packaging and low-dose irradiation on toxin production by *Clostridium botulinum* in fresh pork. *J. Food Prot.* **54**, 94–101.

40. Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991). Effect of headspace CO₂ concentration on toxin production by *Clostridium botulinum* in MAP, irradiated fresh pork. *J. Food Prot.* **54**, 588–592.
41. Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991). Effect of initial O₂ and CO₂ and low-dose irradiation on toxin production by *Clostridium botulinum* in MAP fresh pork. *J. Food Prot.* **54**, 939–944.
42. Madden, J. M. (1994). The enterics as foodborne pathogens. *Food Res. Int.* **27**, 227–232.
43. Mano, S. B., García de Fernando, G. D., López, D., Selgas, M. D., García, M. L., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A. (1995). Growth/survival of *Listeria monocytogenes* on refrigerated pork and turkey packaged under modified atmospheres. *J. Food Safety*, in press.
44. Manu-Tawiah, W., Myers, D. J., Olson, D. G., Molins, R. A. (1993). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *J. Food Sci.* **58**, 475–479.
45. Marshall, D. L., Andrews, S. L., Wells, J. H., Farr, A. J. (1992). Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. *Food Microbiol.* **9**, 303–309.
46. Marshall, D. L., Wiese-Lehnhg, P. L., Wells, J. H., Farr, A. J. (1991). Comparative growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. *J. Food Prot.* **54**, 841–843.
47. Myers, B. R., Marshall, R. T., Edmonson, J. E., Stringer, W. C. (1982). Isolation of pectinolytic *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* from vacuum packaged pork. *J. Food Prot.* **45**, 33–37.
48. Nychas, G. J. E. (1994). Modified atmosphere packaging of meats. In Singh, R. P., Oliveira, F. A. R. (ed.), *Minimal Processing of Foods and Process Optimization: an Interface*, pp. 417–436. CRC Press Inc., London.
49. Ordóñez, J. A., Pablo, B. de, Pérez de Castro, B., Asensio, M. A., Sanz, B. (1991). Selected chemical and microbiological changes in refrigerated pork stored in carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 668–672.
50. Parry, R. T. (1993). Introduction. In Parry, R. T. (ed.), *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*, pp. 1–18. Blackie Academic & Professional, London.
51. Post, L. S., Lee, D. A., Solberg, M., Furang, D., Specchio, J., Graham, C. (1985). Development of botulinum toxin and sensory deterioration during storage of vacuum and modified atmosphere packaged fish fillets. *J. Food Sci.* **50**, 990–996.
52. Przybylski, L. A., Finerty, R. M., Grodner, R. M., Gerdes, D. L. (1989). Extension of shelf-life of iced fresh channel catfish fillets using modified atmospheric packaging and low-dose irradiation. *J. Food Sci.* **54**, 269–273.
53. Reddy, N. R., Armstrong, D. J., Rhodehamel, E. J., Kautter, D. A. (1992). Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. *J. Food Safety* **12**, 87–118.
54. Ryser, E. T., Marth, E. H. (1991). *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Marcel Dekker, New York.
55. Shelef, L. A. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4 and 25°C. *J. Food Prot.* **52**, 379–383.
56. Sheridan, J. J., Doherty, A. (1994). Growth of *Yersinia enterocolitica* on modified atmosphere packaging lamb. Proc. 40th Int. Cong. Meat Sci. Technol. The Hague.
57. Sheridan, J. J., Doherty, A., Allen, P. (1992). Improving the safety and quality of meat and meat products by modified atmosphere and assessment by novel methods. FLAIR 89055 Iterim. 2nd year report EEC DGXII, Brussels.
58. Smith, J. P., Hosahalli, S., Ramaswamy, H. S., Simpson, B. K. (1990). Developments in food packaging technology. Part II: Storage aspects. *Trends Food. Sci. Technol.* **1**, 111–118.
59. Stier, R. F., Bell, L., Ito, K. A., Shafer, B. D., Brown, L. A., Seeger, M. L., Allen, B. H., Porcuna, M. N., Lerke, P. A. (1981). Effect of modified atmosphere storage on *C. botulinum* toxigenesis and the spoilage microflora of salmon fillets. *J. Food Sci.* **46**, 1639–1642.

60. Varnam, A. H., Evans, M. G. (1991). Foodborne Pathogens. An Illustrated Text. Wolfe Publishing Ltd., London.
61. Walker, S. J., Stringer, M. F. (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. Tech. Memo. 462. CFPRA: Chipping Campden.
62. Wimpfheimer, L., Altman, N. S., Hotchkiss, J. H. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A, serotype 4 and competitive spoilage organism in raw chicken packaged under modified atmospheres and in air. Int. J. Food Microbiol. 11, 205–214.
63. Zee, J. A., Bouchard, C., Simard, R. E., Pichard, B., Holley, R. A. (1984). Effect of N₂, CO, and CO₂ on the growth of bacteria from meat products under modified atmospheres. Microbiol. Alim. Nut. 2, 354–356.
64. Zeitoun, A. A. M., Debevere, J. M. (1991). Inhibition, survival and growth of *Listeria monocytogenes* on poultry as influenced by buffered lactic acid treatment and modified atmosphere packaging. Int. J. Food Microbiol. 14, 161–170.
65. Zhao, Y., Wells, J. H., Marshall, D. L. (1992). Description of log phase growth for selected microorganisms during modified atmosphere storage. J. Proc. Engin. 15, 299–317.

La conservación de los alimentos mediante procesos combinados

Francisco J. Sala Trepap

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Recibido 3 octubre 1994/Aceptado 16 marzo 1995

Summary

Food preservation by combined processes is based on the combination of two or more existing preservation methods with the objective of developing milder preservation procedures. Currently two combined processes (CP) deserve a special attention, the preservation of food by high pressures (HP) and the preservation of food with the combined use of heat and ultrasounds under pressure (Mano-Thermo-Sonication). In the preservation by HP, the food, at room temperature or at very mild temperature, is held during relatively long periods under very high pressures (100–1000 MPa) to inactivate its enzymes and/or microorganisms. This procedure has proved to be effective to inactivate vegetative cells but much less effective to inactivate most enzymes and bacterial spores. Several kinds of food preserved by this method have already been launched into the market. In Mano-Thermo-Sonication (MTS Process) microorganisms and enzymes are inactivated by a combined heat/ultrasounds treatment under pressure. By this method, the lethality of heat treatments at the same temperature is highly increased. Therefore, the intensity of heat treatments can be drastically reduced. Heat resistance of spores is reduced by a factor of 1/10 and that of enzymes and vegetative cells is reduced by a factor of 1/50 approximately. The applicability of this procedure is currently being investigated.

Key words: high pressure, ultrasounds, combined process, sterilization

Correspondencia: Francisco J. Sala Trepap. Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. Tel.: 976-428205. Fax: 976-591994.

Resumen

La conservación de los alimentos mediante procesos combinados se basa en la utilización de dos o más procedimientos clásicos para desarrollar métodos más eficaces de conservación. De los procesos combinados (PC) existentes destacan dos por su actualidad e interés para la investigación. Uno utiliza presiones ultraelevadas (PU) y el otro calor y ultrasonidos simultáneo bajo presión (Mano-Termo-Sonicación). La conservación de alimentos por PU consiste en someterlos, a temperatura ambiente o moderada, a presiones muy elevadas (100–1000 MPa) durante tiempos relativamente largos, con objeto de inactivar su flora microbiana y/o sus enzimas. Es eficaz para la inactivación de formas vegetativas, pero no para la inactivación de enzimas y esporas bacterianas. En los últimos años se han lanzado al mercado distintos alimentos conservados por este método. La Mano-Termo-Sonicación somete el alimento bajo presión a un tratamiento simultáneo de calor y ultrasonidos e incrementa la letalidad de los tratamientos térmicos, lo que permite reducir drásticamente su intensidad. De esta forma, se ha conseguido reducir la termorresistencia de las esporas bacterianas en un factor de 1/10, y la de las formas vegetativas y enzimas en un factor de 1/50, aproximadamente. Se está investigando la aplicabilidad de este método.

Introducción

Desde que a principios del siglo pasado Nicolás Appert descubriera la posibilidad de conservar alimentos durante períodos de tiempo muy prolongados mediante la acción de calor, este procedimiento, conocido en su honor como appertización, ha sido uno de los más importantes para la conservación de alimentos. De hecho, calor y frío son los dos métodos de conservación a largo plazo más utilizados por la industria alimentaria. En el caso del frío ha influido el extraordinario desarrollo experimentado en los últimos años por esta tecnología.

La appertización posee, frente a la conservación por frío, la ventaja esencial de que el efecto letal del calor sobre los microorganismos asegura la salubridad de los alimentos. Sin embargo, el calor comporta también desventajas muy importantes, como son los efectos no deseados sobre las características organolépticas y la reducción del valor nutritivo. Por ello es necesario crear nuevos métodos de conservación que sustituyan con ventaja al calor. En los últimos tiempos ha ido adquiriendo una mayor importancia la combinación de varios métodos de conservación clásicos, que aprovechan sus ventajas individuales, evitando los inconvenientes. Este nuevo procedimiento de conservación de alimentos se conoce como “Conservación de alimentos mediante procesos combinados” (CAPC).

La CAPC no es en realidad un método nuevo. Desde tiempos antiguos se ha utilizado el efecto conjunto de diversos métodos para la conservación de la mayor parte de los alimentos. Lo único nuevo es el interés por parte de la tecnología de los alimentos hacia este sistema, a medida que se ha ido profundizando en el conocimiento científico de los distintos mecanismos de acción que intervienen. Si bien el enfoque de los grupos investigadores, de laboratorios y organizaciones internacionales, puede ser

diverso, el objetivo es común y consiste en reducir la intensidad de los tratamientos térmicos con objeto de suministrar a los consumidores alimentos “más naturales”, de características organolépticas genuinas y mayor valor nutritivo. La moderna tecnología de los alimentos está haciendo frente a este reto, que constituye su objetivo desde distintas disciplinas. La Microbiología de los alimentos, o Microbiología predictiva, trata de prever con mayor exactitud el comportamiento de los microorganismos en los distintos alimentos a partir de los datos acumulados en la bibliografía. La Higiene de los alimentos, mediante el Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos, trata de evaluar los riesgos en los procesos de elaboración para la salubridad de los alimentos. Finalmente, la Tecnología de la conservación de alimentos, mediante la CAPC, intenta mejorar los actuales sistemas de conservación. Estos enfoques han constituido el objetivo específico de sendos proyectos de investigación dentro del programa FLAIR, de la Unión Europea, en los que participan distintos grupos de investigación, incluidos españoles.

La CAPC constituye el objetivo de la Acción Concertada nº 7, que dirige el Prof. Leistner (Külmbach, Alemania) y a la que pertenece nuestro grupo. El Prof. Leistner, gran impulsor de este método, lo describe como la “teoría de las vallas”, donde la CAPC sería una carrera de vallas, donde éstas representan los obstáculos (temperatura, pH, potencial redox, etc. inadecuados) que los atletas (microorganismos) deben salvar para poder llegar a la meta (supervivencia). El esfuerzo realizado durante la carrera les dejaría exhaustos impidiéndoles alcanzar la meta. Si bien la “teoría de las vallas” describe el principio general en el que se basa la CAPC, no destaca algunos beneficios importantes que pueden obtenerse mediante la combinación adecuada de distintos métodos. Por ejemplo, el incremento sinérgico del efecto letal que se obtiene mediante la combinación de distintos métodos individuales, aspecto éste intensamente estudiado en la actualidad por distintos grupos de investigadores.

Los métodos de CAPC han sido clasificados en dos grupos:

(i) aquellos en los que el efecto conservador se obtiene por la suma de los efectos producidos por los métodos que se combinan, y

(ii) aquellos mediante cuya combinación se obtiene un efecto sinérgico.

En este último grupo se hallan los resultados más importantes. La mayor parte de estas combinaciones ha sido utilizada ya de forma empírica, incluso mucho antes de que se conociera la identidad del principal agente causal de las alteraciones, los microorganismos. Recordemos el caso de los alimentos desecados, salazonados y ahumados que el hombre ha consumido desde tiempos antiguos y en los que a la acción bacteriostática, ejercida por los bajos valores de actividad de agua, se suma el efecto de concentraciones elevadas de cloruro sódico y la acción bacteriostática de algunos componentes del humo. Pero el desarrollo alcanzado por la tecnología en las últimas décadas ha propiciado la aparición de otros métodos de CAPC que, por su actualidad y posibilidades de aplicación futura, destacan de una forma especial. Son:

(i) tratamientos a presiones isostáticas ultraelevadas (PU) solos o en combinación con tratamientos térmicos suaves, y

(ii) tratamientos simultáneos bajo presión con calor y ultrasonificación (Mano-Termo-Sonificación; Proceso MTS).

Conservación de alimentos por presiones ultraelevadas

El conocimiento de que las PU, al igual que las temperaturas elevadas, podían inactivar microorganismos y enzimas y modificar la textura de los alimentos, no es nueva. Ya a finales del siglo pasado y comienzos del presente algunos investigadores (1, 6) estudiaron la conservación de los alimentos por este método. Sin embargo, no fue hasta 1985 cuando la industria alimentaria percibió el aprovechamiento industrial del efecto de tan elevadas presiones. En la actualidad son ya bastantes los países que han demostrado su interés por este nuevo método. Hoover ha hecho una excelente revisión de esta nueva metodología y de los últimos avances en este campo (7). Seguidamente se resumen algunos de sus aspectos más importantes.

Japón fue el país donde esta idea tomó cuerpo y en los últimos años ha encabezado el esfuerzo más importante en I+D para poner a punto un nuevo sistema de conservación basado en este efecto. En 1989, 21 compañías japonesas, financiadas por el Ministerio de Agricultura Japonés, fundaron la Asociación de I+D para el uso de Elevadas Presiones en la Industria Alimentaria (Association of High Pressure in the Food Industry), y, como consecuencia de esta colaboración, en 1990 la compañía japonesa Meidi-Ya lanzaba al mercado el primer producto conservado por este procedimiento, una mermelada. El siguiente año aparecieron otros productos, como yogures de frutas, gelatinas de frutas, salsas para ensaladas, etc. Dos fabricantes (Pokka y Wakayama) instalaron en sus fábricas sistemas de tratamiento semi-continuo de zumos de frutas a presiones muy elevadas, con una producción de 4000–6000 litros/hora.

El interés por las presiones ultraelevadas se extendió a otras naciones, como Estados Unidos y distintos países europeos. Francia y el Reino Unido han lanzado recientemente programas de I+D en el campo de las altas presiones y la UE patrocina una Acción en Presiones Elevadas dentro del Programa AIR (Agro-Industrial-Research), que integra un grupo de investigadores de distintos países, entre ellos España, dirigidos por el Prof. Knorr, de la Universidad Técnica de Berlín. Algunas industrias alimentarias se han sumado también a este esfuerzo mediante sus propios programas de I+D. La razón del actual interés y desarrollo de la tecnología de las altas presiones en la industria alimentaria está plenamente justificada. Por una parte, está la demanda, cada vez más exigente, de un consumidor mejor informado que exige alimentos sin aditivos, más “naturales”, con características organolépticas más genuinas y mayor valor nutritivo. Por otra, el desarrollo experimentado por la correspondiente tecnología, aplicada cada día con mayor frecuencia a otros campos de la actividad industrial, como son la fabricación de materiales cerámicos, carburos o cuarzo sintético.

En las instalaciones de PU, a temperatura ambiente o a temperaturas bastante inferiores a las de pasteurización, los alimentos se someten durante tiempos relativamente largos (incluso algunas horas) a presiones de varios miles de atmósferas (hasta 10.000 atmósferas = 10^3 MPa) en una cámara de acero aleado (normalmente de pequeño diámetro). Una vez alcanzada esta presión, el recipiente se cierra, no requiriendo ya ninguna fuente de presión exterior. Como el alimento es comprimido por igual por todas sus caras, la presión a la que se halla sometido es homogénea en todos sus puntos y no sufre, por tanto, deformaciones. Las presiones requeridas para estos tratamientos son generadas por procedimientos directos o indirectos. En los primeros, el medio de compresión (normalmente agua) es comprimido directamente por un pistón impulsado en el extremo de la instalación por una bomba que comprime a una

presión muy inferior. En los indirectos, el incremento de presión se consigue por la adecuada diferencia entre el diámetro de los dos pistones y por el pequeño diámetro del pistón que comprime en la cámara de tratamiento. En los procedimientos directos la máxima presión alcanzable viene limitada por la necesidad de utilizar retenes dinámicos en el pistón de la cámara. En los procedimientos indirectos la presión ultraelevada se consigue mediante varias bombas que actúan en serie y, al no precisarse más que retenes estáticos, la presión alcanzable es superior. En la actualidad, la mayor parte de las instalaciones industriales existentes son de este último tipo.

El efecto de las PU se explica por los fenómenos que dan lugar a una reducción de tamaño, como son la rotura de enlaces iónicos. Parece que el efecto de las PU en las interacciones hidrofóbicas depende de la presión en cuestión: así, mientras a presiones inferiores a 1000 bar éstas se rompen, a presiones superiores resultan estabilizadas (14). Sin embargo, los enlaces covalentes no se ven afectados. Esta discriminación entre los enlaces covalentes y secundarios explica por qué las PU son capaces de alterar la estructura tridimensional de las macromoléculas o de las estructuras celulares (proteínas, polisacáridos, enzimas, membrana celular, etc.), pero no la estructura de compuestos más sencillos, como aminoácidos, vitaminas y compuestos responsables del color o del aroma. Este distinto comportamiento con los diferentes componentes de los alimentos determina que, además de su utilidad como nuevo método de conservación para algunos alimentos, sirva también para modificar ventajosamente la textura de otros (ablandamiento de la carne), o para la elaboración de nuevos productos en la moderna gama de alimentos extruidos.

El efecto conservador de las PU se debe a su efecto inactivador sobre microorganismos y enzimas. Se cree que el efecto letal de las PU sobre los microorganismos es ocasionado por la acción combinada y simultánea de distintos mecanismos (7). En primer lugar, se ha comprobado que presiones en el margen de 1000–3000 bar pueden provocar la desnaturalización reversible de algunas enzimas, mientras que presiones más elevadas provocan una desnaturalización irreversible. En segundo lugar, si bien las PU no afectan las moléculas de DNA, estabilizadas por enlaces de hidrógeno, el sistema genético de la célula sí se ve afectado, ya que se interfiere en los mecanismos de replicación y transcripción. Finalmente, las PU provocan alteraciones en la membrana celular que son vitales para su supervivencia (3).

El efecto de las PU ha sido estudiado solo o en combinación con temperaturas muy suaves (inferiores a las de pasteurización), y, a pesar de todos los esfuerzos para el mejor conocimiento y posibles aplicaciones de este nuevo método, muchos de los datos publicados no son concluyentes. En su efectividad influye, entre otros, la composición del alimento, el pH y la actividad de agua, y depende especialmente del microorganismo en cuestión. Las gráficas obtenidas son en ocasiones doblesigmoideas y de difícil interpretación, y el efecto de las presiones inconsistente. Algunos autores han comprobado que el efecto conseguido a una determinada presión desaparece a presiones superiores. Otros, en cambio, han comprobado la existencia de una presión óptima, por encima de la cual cualquier aumento de presión no incrementa el efecto conseguido. La existencia de esta presión óptima se ha interpretado como el resultado de un fenómeno que tiene lugar en dos fases: una primera en la que la resistencia de la espora resultaría muy debilitada al inducirse su germinación, y una segunda en la que la espora germinada, mucho menos resistente, sucumbiría al efecto de tan elevada presión. De los datos disponibles hasta el momento se deduce que, si bien este método puede ser de indudable utilidad para algunas aplicaciones específicas, su efectividad dista mucho de ser comparable a la que se consigue mediante los tratamientos

térmicos convencionales. Aunque las PU son eficaces en la inactivación de células vegetativas, son prácticamente incapaces de inactivar las formas de resistencia (como son las esporas de las bacterias que provocan las principales alteraciones en los alimentos conservados), para las que inactivaciones moderadas requieren tiempos de tratamiento muy prolongados (horas). La combinación de las PU con temperaturas moderadas incrementa apreciablemente el efecto.

Las enzimas suelen ser también bastante resistentes a estos tratamientos, sobre todo si no se combinan con temperaturas moderadas.

Conservación de alimentos por la acción bajo presión del calor y los ultrasonidos

Si bien los ultrasonidos se conocen ya desde hace casi un siglo, su desarrollo y aplicaciones ha sido relativamente lento y desigual. En algunos campos de la actividad industrial, como en alguna rama de la industria química (Sonoquímica), han experimentado un desarrollo considerable, desempeñando en la actualidad un papel muy importante como catalizadores en distintos procesos de síntesis. En cambio, en la industria alimentaria su papel ha sido muy secundario, utilizándose esencialmente en operaciones de emulsificación.

A pesar de que el efecto letal sobre los microorganismos ya fue indicado por Harvey y Loomis (5), diez años después de que lord Raleigh descubriera su existencia (1917), y de la intensa actividad de investigación generada en este campo, la utilidad de este efecto como nuevo método de conservación no ha logrado demostrarse hasta fechas recientes. En los últimos años, las investigaciones realizadas han permitido comprobar que un tratamiento simultáneo de calor y ultrasonidos bajo presión es capaz de incrementar, en algunos casos de forma espectacular, la letalidad sobre microorganismos y enzimas de un tratamiento térmico a la misma temperatura. Se está estudiando la aplicabilidad de este nuevo método de conservación al que se ha denominado Mano-Termo-Sonicación (Proceso MTS: Pat. n° 9200686, PCT n° 9300021). La información publicada al respecto es todavía muy escasa, por lo que resumimos algunos de los datos disponibles hasta el momento (8, 11, 12).

Los ultrasonidos son vibraciones sónicas que se producen más allá del rango de percepción del oído humano. Los generadores de ultrasonidos, que han experimentado mejoras sustanciales en los últimas décadas, consisten en la actualidad en un generador piezoeléctrico de zirconato de titanio que cambia de forma bajo los efectos de un campo eléctrico de 1000 voltios a una frecuencia de 20 kHz. Esta energía eléctrica, transformada en energía mecánica de la misma frecuencia, es conducida a un disruptor de una aleación de titanio que la amplifica hasta su punta, sumergida en el medio de sonicación, generando en éste una onda ultrasónica. Si bien los avances tecnológicos en los generadores de ultrasonidos han sido importantes en los últimos años, la física de los ultrasonidos y los conocimientos sobre sus mecanismos de acción distan mucho de estar claros, a pesar de la información disponible (9, 13). Cuando la onda sónica choca con un medio, origina en el punto de la colisión ondas longitudinales que se propagan en la masa del mismo creando zonas alternantes de compresión y expansión, que en condiciones favorables provocan lo que se denomina una "cavitación". La intensidad de la "cavitación" es un fenómeno afectado por las características del generador (potencia, frecuencia, amplitud, etc.), por muy diversas variables

microambientales (temperatura, tensión superficial, concentración y naturaleza de los gases y solutos disueltos, etc.), y a ella se achacan la mayor parte de los fenómenos que provocan los ultrasonidos en los líquidos.

Si bien existen dos tipos de cavitaciones, la "cavitación transitoria" se considera la más importante. Consiste, en esencia, en la implosión violenta de las burbujitas gaseosas formadas durante el proceso como consecuencia de un fenómeno súbito de condensación durante la fase de compresión. Esta implosión genera ondas de choque que, en determinados puntos de la masa líquida, produce, a gran velocidad y en muy corto tiempo (1 microsegundo), temperaturas y presiones muy elevadas (5500°C y 5×10^4 kPa). Estas elevadas presiones y temperaturas son las responsables últimas de los efectos generales de los ultrasonidos y también de los ejercidos sobre los microorganismos.

A pesar de las observaciones originales de Harvey y Loomis (5) sobre el efecto letal de los ultrasonidos sobre los microorganismos, y de su empleo ocasional para la rotura de la membrana celular en estudios bioquímicos de distintos componentes celulares, este efecto no ha sido aprovechado para la inactivación de los microorganismos que contaminan los alimentos. Ello se debe, por una parte, a que incluso las especies más sensibles requieren tratamientos muy largos, y por otra, a que las formas de resistencia (esporas bacterianas) causantes de la mayor parte de las alteraciones en los alimentos conservados son especialmente insensibles a los mismos.

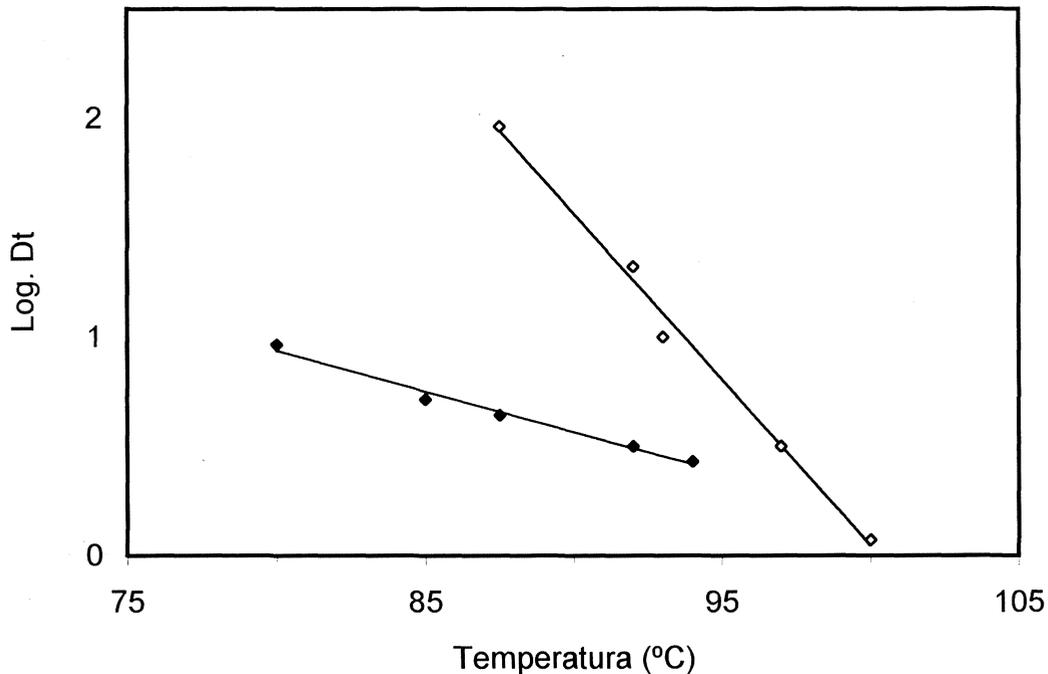


FIG. 1. Resistencia de *Bacillus subtilis* al calor (◇) y a un tratamiento combinado de calor y ultrasonidos (◆), a diferentes temperaturas (10).

El concepto de CAPC ha abierto nuevas posibilidades a métodos o efectos que por sí solos tuvieron que ser descartados. Es el caso de los ultrasonidos que, en combinación con el calor y la presión (Proceso MTS), puede transformarse en un nuevo sistema de conservación. Las primeras observaciones sobre el efecto de los ultrasonidos en la resistencia al calor de algunas especies microbianas se realizaron en los años setenta (2), pero fue el incremento de la letalidad de los tratamientos térmicos de pasteurización combinados con ultrasonicación simultánea sobre *Bacillus subtilis* (4) (Fig. 1), lo que estimuló el aprovechamiento de los ultrasonidos en la conservación de alimentos. Pero la pérdida del incremento de letalidad, observada a medida que aumentaba la temperatura, hasta desaparecer a temperaturas de ebullición (Fig. 1), restaba interés a este efecto, ya que, a temperaturas de pasteurización, el tiempo de ultrasonicación requerido era exageradamente largo, y a temperaturas de esterilización, con tiempos más cortos, el efecto desaparecía. La posibilidad de mantener el incremento de letalidad a temperaturas de esterilización, cuando el tratamiento podría ser tan sólo de unos segundos, despertaba interés. La hipótesis de que la pérdida de efecto a temperaturas de ebullición podía deberse a que la elevada tensión de vapor del medio impedía la "cavitación", condujo a la investigación del efecto combinado calor/ultrasonidos a presiones compensatorias de la presión de vapor (10). Los resultados obtenidos con *B. subtilis* fueron enteramente satisfactorios. Se comprobó que el efecto combinado del proceso MTS era sinérgico (Fig. 2) y permitía reducir la duración del tratamiento en un factor de 1/10. El efecto podía mantenerse incluso a temperaturas de esterilización (Fig. 3). Se ha comprobado que la MTS es eficaz en todos los casos, dependiendo el grado de efectividad, de la especie en cuestión, de la presión y amplitud de sonicación, y de las características del medio de tratamiento. En levaduras, la letalidad de un

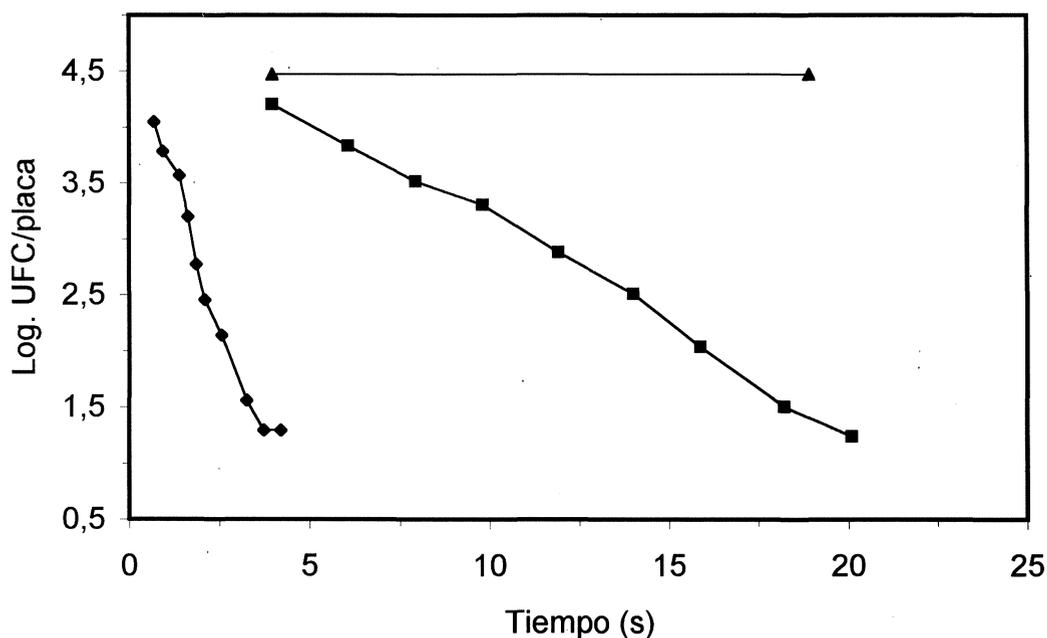


FIG. 2. Gráficas de supervivencia de *Bacillus subtilis*: (▲) Ultrasonación a 40°C; (■) tratamiento térmico a 112°C; (◆) Mano-Termo-Sonicación a 112°C (10).

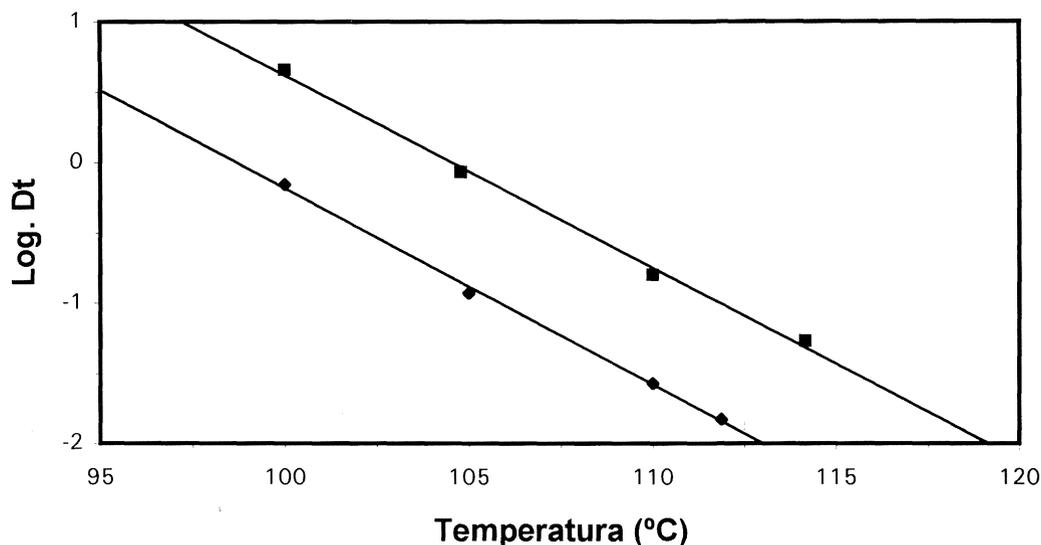


FIG. 3. Resistencia de *Bacillus subtilis* al calor (■) y al tratamiento combinado de calor y ultrasonidos bajo presión (Mano-Termo-Sonicación) (◆), a diferentes temperaturas (10).

tratamiento térmico a la misma temperatura se incrementa por un factor de 30 aproximadamente, y en especies de esporulados por factores en el margen de 4 a 10, aproximadamente.

La eficacia del proceso MTS es todavía mayor en enzimas, en las que la efectividad se incrementa en algunos casos por un factor de 100 (8).

Actualmente se estudia la aplicabilidad de la MTS como alternativa a los tratamientos clásicos de conservación para algunos productos.

La CAPC tiene, en las PU y en el proceso MTS, dos ejemplos clásicos de cómo la tecnología de la conservación de alimentos puede ser mejorada mediante la adecuada combinación de técnicas ya existentes.

Bibliografía

1. Brigman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *J. Biol. Chem.* **19**, 511–512.
2. Burgos, J., Ordoñez, J. A., Sala, F. J. (1972). Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores. *Appl. Microbiol.* **24**, 497–498.
3. Chong, G., Cossins, A. R. (1983). A differential polarized fluorometric study of the effect of high hydrostatic pressure upon the fluidity of cellular membranes. *Biochemistry* **22**, 409–415.
4. García, M. L., Burgos, J., Sanz, B., Ordoñez, J. A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 619–628.
5. Harvey, E., Loomis, A. (1929). The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *J. Bacteriol.* **17**, 373–379.

6. Hite, B. H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull. West Virginia Univ. Agric. Exp. Sta., Morgantown*, **58**, 15–35.
7. Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F., Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* **43**, 93–107.
8. López, P., Sala, F. J., Fuente, J. L., Condón, S., Raso, J., Burgos, J. (1994). Inactivation of peroxidase, lipoxigenase and polyphenoloxidase by manothermosonication. *J. Agr. Food Chem.* **42**, 552–556.
9. Neppiras, E. A. (1980). Acoustic cavitation. *Physics Reports* **61**, 159–251.
10. Raso, J., Palop, A., Condón, S., Burgos, J., Sala, F. J. (1992). *New Technologies for the Food and Drink Industries*. CFPRA, Stratford upon Avon, UK.
11. Raso, J., Condón, S., Sala, F. J. (1994). Manothermosonication: a new method of food preservation? *In* Leistner, L., Gorris, L. G. (ed.), *Food Preservation by Combined Processes*, pp. 37–41. FLAIR Concerted Action N° 7. Final Report. EUR 15776 EN, Wageningen.
12. Sala, F. J., Burgos, J., Condón, S., Lopez, P., Raso, J. (1992). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. *In* Gould, G. W. (ed.), *New Methods of Food Preservation*, pp. 176–204. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
13. Suslick, K. S. (1988). Homogeneous sonochemistry. *In* Suslick, K. S. (ed.), *Ultrasounds. Its Chemical, Physical and Biological Effects*, pp. 123–163. VCH Publishers, New York.
14. Suzuki, K., Taniguchi, Y. (1972). Effects of pressure on biopolymers and model systems. *In* Sleigh, M. A., Macdonald, A. G. (ed.), *The Effects of Pressure on Living Organisms*, pp. 103. Academic Press, New York.

Safety aspects of “sous vide” products and prevention of microbial risks

Toon Martens

ALMA Sous Vide Competence Centre, Katholishe Universität Leuven, Belgium

Received 15 February 1995/Accepted 3 March 1995

Summary

The diversity and quantities of vacuum packed and vacuum cooked prepared meals and menu components are rapidly growing on the European market. Because of the minimal heat processing, high water activity, absence of preservatives, and the use of many different often exotic ingredients, these products have a high risk potential. For this reason, Anglo-Saxon governments and industries are very sceptical about the safety of “sous vide” products. Industrial practice, as well as parallel tests and recent studies on inoculated packs have shown that, in many cases, it is more a potential than a real risk. Quality is the primary concern for “sous vide” products, and safety must be guaranteed by the application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) concept, along with an adequate combination of different inhibitory factors (temperature of heating and cooling, pH, incorporation of starter cultures, bacteriocins and some particular enzymes).

Key words: “sous vide”, safety, market, inhibitory factors, risks

Resumen

El mercado europeo está experimentando un rápido crecimiento en cantidad y diversidad de comidas preparaas, o componentes de menús, envasados y cocinados al vacío. Estos productos presentan un alto riesgo potencial debido al calentamiento previo mínimo, a la elevada actividad del agua, a la

Correspondence to: Toon Martens. ALMA Sous Vide Competence Centre, Katholishe Universitat Leuven. Ed. Van Evenstraat 2, C. B-3000 Leuven. Belgium. Tel.: +32-16-323011. Fax: +32-16-323015. E-mail: toon%ca%alma@cc3.kuleuven.ac.be.

ausencia de conservantes y al uso frecuente de ingredientes diversos, a menudo exóticos. Por ese motivo, el gobierno y las industrias de los países anglosajones se muestran muy escépticos en cuanto a la seguridad de los productos “sous vide”. La práctica industrial, los ensayos paralelos y los estudios sobre paquetes inoculados han mostrado que en muchos casos el peligro es potencial más que real. La calidad es la principal preocupación que debe tenerse en cuenta al preparar productos al vacío, y la seguridad debe estar garantizada por la aplicación del concepto HACCP (del inglés, *Hazard Analysis Critical Control Point*), junto a una combinación adecuada de diferentes factores inhibitorios (temperatura, calentamiento y enfriamiento, pH, incorporación de cultivos iniciadores, bacteriocinas y determinados enzimas).

Introduction

Many names have been suggested for pre-cooked food products that are to be stored under refrigeration. Some of these products are called “minimally processed” or “REfrigerated Processed Foods with an Extended Durability” (REPFED’s) (12, 14). In the catering sector, “sous vide” applies to products that have been cooked in a vacuumed bag. In many cases products that are cooked traditionally, and then vacuum packaged and pasteurised, are called also “sous vide” products. We prefer the french word “sous vide” to stress the point that the main objective is the improvement of sensorial quality of this technique.

Many different components, processes and types of equipment are used to prepare pre-cooked meals (17). No strict definition of a “sous vide” product can be given, but the product must have, at least, the following characteristics:

- vacuum packaged before cooking
- minimal heat treatment; lower than traditional cooking temperatures and product dependent
- stored below 4°C (mostly 3°C)

This temperature range of heating and cooling, as well as keeping the product in a microaerobic environment, makes “sous vide” products to be very specific in terms of microbiological risks.

Market of convenience products

The Food Products Intelligence Centre (FPIC) at the Campden Food and Drink Association has been monitoring new UK food and drink products since 1969. In the period 1972–1990 the number of new chilled products increased from 35/year to 945/year (2). The chilled food market (ready meals, recipe dishes, prepared salads, pizza and pasta, etc.) in the period 84–88 grew from 134 M£ to 290 M£ (116% in 4 years). For the period 1989–1993 the growth of ready meals, recipe dishes and pizzas was from 300 M£ to 474 M£ (160% in 4 years).

Analysis of consumer basket data in Belgium showed that the consumption of fresh prepared meals increased by 65% in quantity in the period 1987–1990 and 204% in value. From this analysis was concluded that the Nielsen-numbers give a completely wrong view on the market of fresh prepared meals. According to Nielsen, the market share of fresh prepared chilled meals was 22%, the consumer

TABLE 1. Heat resistance of bacteria and bacterial spores (9)

Microorganism	Temperature (°C)	D-value (min)
<i>Campylobacter jejuni</i>	55	0.74–1.00
<i>Brucella</i> spp.	65.5	0.1–0.2
<i>Salmonella senftenberg</i> 775W	65.5	0.8–1.0
<i>Salmonella</i> spp.	65.5	0.02–0.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	65.5	0.2–2.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	66.1	16.7–16.9
<i>Enterococcus faecalis</i>	70	3
Yeast and moulds, and spoilage bacteria	65.5	0.5–3.0
Spores of mesophilic aerobes		
<i>Bacillus cereus</i>	100	5.0
<i>Bacillus subtilis</i>	100	11.0
<i>Bacillus polymyxa</i>	100	0.1–0.5
Spores of mesophilic anaerobes		
<i>Clostridium butyricum</i>	100	0.1–0.5
<i>Clostridium perfringens</i>	100	0.3–20.0
<i>Clostridium botulinum</i>		
Type A and type B proteolytic strains	100	50.0
Type E and non-proteolytic types B and F	80	ca. 1.0
Spores of thermophilic aerobes		
<i>Bacillus coagulans</i>	120	0.1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	120	4.0–5.0
Spores of thermophilic anaerobes		
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	120	3–4
<i>Desulfotomaculum</i> (<i>Clostridium</i>) <i>nigrificans</i>	120	2–3

panel data gave a market share of 67%. The difference between those numbers can be explained by the exclusion of the specialised shops in the Nielsen-numbers. Numbers on the market evolution should be interpreted depending on the source.

The annual growth rate of "sous vide" market is approximately 20%. The main application of "sous vide" is in the catering sector. The total amount of "sous vide" products in France was estimated at 12,000 tons in 1989: 8000 tons for catering, 4000 tons for supermarkets. In 1991 the share of supermarkets increased: 12,500 tons for catering and 8000 tons for supermarkets.

The consumers of prepared meals are not equally spread over Europe, and even not within a given country. Salmon (16) estimates that the main increase in the consumption of fresh and chilled food will

be in mid Europe (France, Germany, Denmark, Belgium, Luxemburg). The so called “dual career” families, young people (<36 years) and living in a big city are interested in prepared meals (11).

Microorganisms in “sous vide” products

Microorganisms that can cause intoxication or spoilage have the following characteristics:

1. Minimal heat resistance. In Table 1 the heat resistance of several bacteria and bacterial spores is shown.

2. Growth at low temperatures. Some examples of psychrotrophic (i.e. prolifically growing at 5°C, food-borne pathogens) microorganisms are: some types of *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*.

Pathogenic microorganisms that will grow in the region 5–12°C are: some strains of *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* (15).

Spoilage at low temperatures is mainly caused by lactic acid bacteria, *Pseudomonas* and *Brochothrix thermosphacta*.

3. Anaerobic or microaerophilic nature. After vacuuming of “sous vide” products, there is usually 1 to 5% oxygen left in the package at the beginning of the process. This allows facultative anaerobic bacteria to grow. But they consume gradually the remaining oxygen and the conditions in the package turn to anaerobic. This mechanism explains why clostridia, as obligate anaerobic microorganisms, can only be found after an extended storage period. Lactobacilli, however, because of their microaerophilic nature grow very well in “sous vide” products.

From these criteria, we can conclude that only the psychrotolerant obligate and facultative anaerobic microorganisms can cause problems in “sous vide” products (Table 2).

The threat posed by *C. botulinum* has received most attention. Table 3 summarises the time-temperature treatments that have been suggested by different authors to reduce spores of the *Clostridium* type.

There is a lot of controversy on the mandatory minimum heat treatment of “sous vide” products. In the UK the reduction of *C. botulinum* is a prime concern (1, 4, 18, 19). In France, *Enterococcus faecalis* is used as an indicator, and in function of the achieved pasteurisation value the shelf life is limited. Other microorganisms that have been proposed as reference are *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* (25). Other authors (6, 8, 17) recommend a minimal heat treatment, which only addresses the vegetative forms of the psychrotrophic anaerobes. The germination and growth of spores is controlled by low storage temperatures and additional inhibitory factors.

From the sensorial point of view, for protein-rich products, it is very important to cook at low temperature and for long times. Goussault (8) advocates cooking at temperatures lower than 60°C and states that, in terms of microbial risks, there is no much difference between cooking temperatures in the region 52–60°C and 80–90°C. For some products this can be true, but this statement can not be generalised.

TABLE 2. Psychrotolerant obligate and facultative anaerobes (3)

Organism	Pasteurisation resistance	Minimum growth temperature
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5 s at 70°C	0–4°C
<i>C. botulinum</i> type E (all), B and F (non)proteolytic		
- vegetative cells	20–30 min at 80°C	3.3°C
- spores	26 min at 80°C	3.3°C
- toxins	10 min at 80°C	–
<i>Listeria monocytogenes</i>	2 min at 70°C	0°C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12 min at 60°C	0°C

TABLE 3. Temperature-time treatments to reduce spores of *Clostridium*

Temp. (°C)	Time (min)	Spores of reduction (min)	log	Reference
55	3777	<i>C. botulinum</i> type E	3	Bucknavage et al. (1990)
80	5	<i>C. botulinum</i> type E	6	Bucknavage et al. (1990)
80	20	nonproteolytic clostridia	5	14
80	26	<i>C. botulinum</i> types B and E	6	19
82.2	9–200	<i>C. botulinum</i> type B	6	Scott and Bernard (1982)
82.2	3–5	<i>C. botulinum</i> type E	6	Lynt et al. (1977)
85	11	<i>C. botulinum</i> types B and E	6	19
90	3–7	nonproteolytic clostridia	6	Gaze and Brown (1990)
90	4.5	<i>C. botulinum</i> types B and E	6	19
90	10	nonproteolytic clostridia	6	Koelverse Maaltijden (1990)
90	4	nonproteolytic clostridia	5	14
95	2	<i>C. botulinum</i> types B and E	6	19
100	2	nonproteolytic clostridia	5	14

Six decimal reductions of non-proteolytic *C. botulinum* and *L. monocytogenes* are often recommended in Europe. Seven decimal reductions for *Salmonella* and *E. coli* seem to be acceptable in the USA (6).

Most data on the heat resistance of *C. botulinum* are collected in artificial media. From different studies (7, 20, 21), it is clear that data from artificial media can not be extrapolated to real products. Smith (20) reported that a core temperature of 71°C will allow a turkey roll a chilled storage life for more than 30 days. Gibbs (7) tested 511 samples of commercially available refrigerated packaged foods at 4°C and 10°C for 1 and 3 weeks. No botulinal toxin was detected in any stored uninoculated sample. Two surveys of products in the market place in the USA also observed a low incidence of *C. botulinum* in

TABLE 4. Time to produce toxin by psychrotrophic *Clostridium botulinum* at low temperatures

<i>C. botulinum</i> type	Growth medium	Temp. of storage (°C)	Time to produce toxin (days)	Reference
E	Vacuum packaged fresh fish	12	12	Lilly and Kautter (1990)
E	Crabmeat	12	14	Soloman et al. (1977)
E	Beef stew	11	6	Smidt et al. (1961)
E	Crabmeat	10	8	Cockey and Tatro (1974)
E	Vacuum packed potatoes	10	9	Notermans et al. (1981)
E	Fish fillets	10	8	Huss (1981)
B	Broth	8	15	Soloman et al. (1982)
B and E	Salmon fillets under modified atmosphere	8	12	Garcia et al. (1987)
E	Beef stew	6	19	Smidt et al. (1961)
B	Broth	5.6	27	Eklund (1967)
B	Broth	4.4	33	Eklund (1967)
E	Crabmeat	4.4	55	Cockey and Tatro (1974)
E	Broth	4.0	30	Soloman et al. (1977)
B	Broth	3.3	129	Eklund (1967)
E	Beef stew	3.3	31	Smidt et al. (1961)

vacuum packed products (23). Also inoculated pack studies of lasagne, carrots and jacket potatoes showed no toxin production at 10°C for 3 weeks (7). The incidence, growth and toxin formation in marine products seems to be much higher. Also the results of a parallel food testing of prepared meals by the European consumer organisation (5) showed a little incidence of pathogens. The results were very dependent on the application of Good Manufacturing Practices Codes and control by the national health authorities. In France, a detailed good manufacturing practice code for prepared meals exists, which is accepted by the federation of producers and national authorities. This code is also the basis for a draft code of the Codex Alimentarius Commission (25).

Industrial practice has shown that it is possible to make “sous vide” products, but the following safety criteria are not clear:

- reference microorganisms for calculation of pasteurising value
- pasteurising value of cooling cycle
- calculation or measurement of temperature
- relationship between pasteurisation value and shelf life
- pasteurisation value related to the product and hygiene conditions
- pasteurisation value in relation to other hurdles

TABLE 5. Cooling requirements in different EC countries

Country	Temperature range (°C)	Maximum time allowed (h)	Subsequent temperature (°C)
Denmark	65 to 10	3	<5
France	70 to 10	2	0 to 3
West Germany	80 to 15	2	
	15 to 2	24	<2
Sweden	80 to 8	4	<3
UK	70 to 3	2	0 to 3

Many guidelines have been proposed, but all of them lack a sound scientific basis. Standards are often the guess of one worker, easily sized upon, quoted and requoted until they assume a semblance of authority. The cooling requirements for "sous vide" products in different EC countries are a good example (Table 5).

Strict compliance with temperature control must be mandatory, not only for the "sous vide" producer but also for the distributor, retailer and consumer. Temperature abuses throughout distribution retail markets and by consumers are common. For this reason, most authors prefer not to rely on low temperature storage. This is true for the consumer market but not for the catering sector. Temperature control in a lot of traditional ovens is very bad and is inherent to the microwave system, that is often used to reheat these products. The new generation of air-steam ovens, which are often used to cook and reheat "sous vide" products have a much better temperature control.

A research topic very much related to the discussion of safety criteria and pasteurising values is the revival of vegetative bacteria after sublethal heating. The kinetics of vegetative cell heat inactivation is often less straightforward, and they seem to deviate from a simple log-linear relationship more than spores do. Vegetative cells may continue to metabolise, and therefore change in composition during heating, especially during low temperature-long time heating, and consequently to adapt during the heating process.

Vegetative cells exposed to a variety of environmental stresses including heat, react homeostatically to the stress in a variety of ways. Mild heating leads to the synthesis of "heat shock" proteins, e.g. in *E. coli* (26), in a reaction that is widespread, occurring in all organisms so far studied. Thompson (24) showed that cooking beef under realistic conditions increases the resistance of *Salmonella typhimurium* to heat from a D-value at 50°C of near 30 min to over 80 min.

Additional inhibitory factors for "sous vide" products

If we want to capitalise on the "sous vide" technology for superior product quality, we must not rely on heat treatment as the only safety factor and we have to use innovating preservation approaches. Let us see some examples:

1. Effect of acids, pH. The resistance to heat has the optimum in a narrow pH range. Only weak acids or alkalis are required to lower the resistance of microorganisms. The adjustment of pH with inorganic acids permits growth at lower pH than the adjustment with organic acids (i.e. with higher pK). Besides, the undissociated organic acids play a bacteriostatic role.

In the last few years there has been a lot of controversy on the potential role of lactic acids and their potassium and sodium salts. Inhibitory effects have been demonstrated for *L. monocytogenes*, *C. botulinum* and *Salmonella*. Genigeorgis (6) developed a predictive model for the length of the lag phase as affected by NaCl, NaL, inoculum (I) and temperature for turkey meat.

$$\log (1/LP) = -2.29 - 0.123 (\text{NaCl}) + 0.22 (\text{NaL}) + 0.4398 (T) + 0.02 (I) (T)$$

2. Microbial competition as an inhibitory factor. The mechanism by which microorganisms such as lactic acid bacteria can inhibit the growth of pathogens, can be mediated by competition for essential nutrients, production of acids and lowering of pH, production of hydrogen peroxide, volatile compounds, enzymes, antibiotic-like substances, bacteriocins and changes in redox potential.

In the last few years there has been an bloom of research activities to isolate LAB's able to produce antimicrobial compounds, and more specifically bacteriocins. Three interesting bacteriocins are available: nisin, pediocin and sakacins. The bacteriocins inhibit the growth of major Gram-negative pathogens, such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, and prevent spores of *Clostridium* and *Bacillus* from outgrowing. An interesting property of nisin is heat stability. Nisin is presently permitted in 46 countries. None of the other bacteriocins has a fully approved legal status. The Federal Drug Administration (USA) approved the application of a pediocin producing strain of *Pediococcus acidilactici*.

3. The use of bacteriolytic enzymes. Activity of lysozyme against *L. monocytogenes* and certain strains of *C. botulinum* has been shown. A variety of metal chelators have been found to promote the activity of lysozymes. Heat-stressed cells were more susceptible to lysozyme. Since the enzyme is relatively heat-stable, it can survive pasteurisation processes.

The interaction effects of inhibitory factors and modelling

Leistner and Rödel's (10) concept of "microbial hurdles" described pictorially the intrinsic and extrinsic factors used in food preservation. What this concept lacks is the quantification of the antimicrobial effect of each hurdle, and the interactions between different hurdles. All these hurdles have a simultaneous effect. Mathematical models have been developed in recent years to quantify these interactions. Initially simple regression models at a constant temperature were developed, whereas now more attention is devoted to the development of dynamic models for growth and inactivation. Recently, also stochastic models are constructed (13), to take into account the uncertainty due to both the biological variation of growth and inactivation variables.

Conclusion

The safety of high quality prepared food products can not rely on one only safety factor. Safety of "sous vide" products can be guaranteed by a careful product and process design, high level of hygiene of raw materials and production environment assured by a HACCP system.

References

1. ACMSF (1992). Report on Vacuum Packaging and Associated Processes. Advisory Committee on the Microbiological Safety of foods. HMSO, London.
2. Bond, S. (1992). Marketplace Product Knowledge in Chilled Foods: A Comprehensive Guide. *In* Dennis, C., Stringer, M. (ed.). Ellis Horwood, New York.
3. Church, I. (1993). Review: "sous vide" cook chill technology. *Int. J. Food Sci. and Technol.* **28**, 563–574.
4. Department of Health (1990). The Microbiological Safety of Food, Part I. HMSO, London.
5. De Winter, K. (1994). Consumentenbescherming in Europa. Proc. meeting "Microbiologische Veiligheid van Voeding in Europees Perspectief", ALMA - K. U. Leuven.
6. Genigeorgis, C. (1993). Additional Hurdles for "Sous Vide" Products. Proc. First European "Sous Vide" Cooking Symposium, ALMA-K. U. Leuven.
7. Gibbs, P. (1993). Incidence and growth of psychrotrophic *Clostridium botulinum* in foods. *J. Food Control* **5**, 5–7.
8. Goussault, B. (1993). Survival and Inactivation of Microorganisms in "Sous Vide" Products Heated at Low Temperature. Proc. First European "Sous Vide" Cooking Symposium, ALMA - K. U. Leuven.
9. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) of the International Union of Microbiological Societies (ed.) (1988). Microorganisms in Foods, 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
10. Leistner, L., Rödel, W. (1976). The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. *In* Davies, R., et al. (ed.), Intermediate Moisture Foods, pp. 120–124. Applied Science Publishers, London.
11. Martens, T. (1992). "Sous vide": an opportunity for small and medium sized enterprises. *Vita Magazine* June.
12. Mossel, D. A. A. et al. (1987). Processing for safety of meat and poultry by radication. Progress, penury, prospects. *In* Smulders, F. S. M. (ed.), Elimination of Pathogenic Organisms from Meat and Poultry, pp. 305–316. Elsevier, Amsterdam.
13. Nicolai, B. (1994). Modelling and uncertainty propagation analysis of thermal food processes. Ph. D. thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
14. Notermans, S., Dufrenne, J., Lund, B. M. (1990). Botulism risk of refrigerated, processed foods of extended durability. *J. Food Protection* **53**, 1020–1024.
15. Palumbo, S. A. (1986). Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *J. Food Protection* **49**, 1003–1009.
16. Salmon, M. (1993). Food for thought. The environment of consumers in 2010. *In* De voedingsfabriek in 2010. PAVO, Amersvoort.
17. Schellekens, W., Martens, T. (1992). "Sous Vide" Cooking. ALMA - K. U. Leuven, EUR 15018 EN. Leuven.
18. Sheard, M., Church, I. (1992). "Sous Vide" Cook-chill. Leisure and Consumer Studies. Leeds Polytechnic, Leeds.
19. SVAC (1991). Code of Practice for "Sous Vide" Catering Systems. "Sous Vide" Advisory Committee, Tetbury, Glos.

20. Smith, D. M., Alvarez, V. B. (1988). Stability of vacuum cook-in-bag turkey breast rolls during refrigerated storage. *J. Food Science* **53**, 46–48, 61.
21. Smith, D. M., Fullum-Bouchard, L. (1990). Comparative nutritional, sensory and microbiological quality of a cooked chicken menu item produced and stored by cook/chill, cook freeze and “sous vide” cook/chill methods. Poster Canadian Dietetic Association Annual Conference.
22. Sheard, M. A., Rodger, C. (1993). Optimum Heat Treatments for “Sous Vide” Cook-chill Products. Proc. First European “Sous Vide” Cooking Symposium, ALMA - K. U. Leuven.
23. Taclindo, C. et al. (1967). Examination of prepared foods in plastic packages for *Clostridium botulinum*. *Appl. Microb.* **15**, 426–430.
24. Thompson, W. et al. (1979). Inactivation of *Salmonella* in autoclaved ground beef exposed to constantly rising temperatures. *J. Food Protection* **42**, 410–415.
25. WHO Codex Alimentarius Commission (1994). Proposed Draft Code of Hygienic Practice for Refrigerated Packaged Foods with Extended Shelf Life. CL-1994/15-FH.
26. Yamamori, T., Yura, T. (1982). Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 860–864.

Aspectos microbiológicos de la elaboración del cava

Enric Bartra

*Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI), Estació de Viticultura i Enologia,
Generalitat de Catalunya, Vilafranca del Penedès (Barcelona)*

Recibido 12 diciembre 1994/Aceptado 16 marzo 1995

Summary

The production of cava (sparkling wine produced according to the rules of the cava appellation, in i.e. Catalonia and La Rioja, Spain) involves several microbial factors such as growth, fermentation and death of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). Ethanol tolerance, flocculation and aroma characteristics of yeast cells as major selection factors for the production of cava are discussed in this review.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, sparkling wine, ethanol

Resumen

En la elaboración del cava (vino espumoso producido según el Consejo Regulador del Cava en Cataluña y La Rioja) intervienen diferentes aspectos microbiológicos: factores de crecimiento, fermentación y muerte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Entre estos factores resultan decisivos la resistencia al etanol, la floculación y la producción de aromas para la selección de levaduras para la elaboración de cava de calidad.

Introducción

La elaboración del cava es un proceso fundamentalmente microbiológico e industrial que se desarrolla a través de dos fases principales, las cuales comprenden dos fermentaciones. La primera

Correspondencia: Enric Bartra. Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI). Estació de Viticultura i Enologia. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona). Tel.: 93-8900211. Fax: 93-8900354.

fermentación, de mosto a vino base, se realiza en tanques con temperatura controlada (15–18°C) y adición de levaduras.

La segunda fermentación empieza con el “tiraje”, o llenado de la botella con el vino base y el licor: levadura, clarificante (p. ej. bentonita), sacarosa (20 a 25 g/l). Continúa con la crianza de nueve meses o más en las cavas, a una temperatura aproximada de 17°C. Pasada la crianza se realiza el “removido”, operación que consiste en aplicar una inclinación progresiva a la botella con movimientos giratorios hasta dejarla invertida o “en punta”, para acercar el depósito formado por las levaduras y el clarificante hasta el cuello de la botella. Se finaliza con el “degorge”, u operación de apertura del tapón corona previa congelación del cuello, relleno, adición de licor de expedición, y taponado con tapones de corcho de cava y morrión. Esta segunda fermentación, llamada también “toma de espuma”, tiene lugar en la misma botella que llega al consumidor (Tabla 1).

En España la producción de cava, que se eleva a unos 130 millones de botellas anuales, se destina en un 60% al consumo interno y el resto a la exportación. Alemania y Estados Unidos son los principales países importadores.

Las variedades de uva más utilizadas son las autóctonas Macabeo o Viura, Xarel·lo, Parellada y Chardonnay. La zona de producción del cava está limitada a la Denominación de Origen Cava, mayoritariamente situada en Cataluña y La Rioja. La población de Sant Sadurní d'Anoia, en la comarca del Alt Penedès (Cataluña), concentra la mayoría de las 240 empresas elaboradoras.

TABLA 1. Fases principales en la elaboración del cava. Primera y segunda fermentación

Elaboración del vino base: primera fermentación	Cosecha de la uva con el grado de madurez apropiado Prensado suave para extraer el mosto (aproximadamente 0,6 l de mosto/kg de uva) Adición de antioxidante (dióxido de azufre, 60 mg/l) Eliminación de sólidos por decantado o filtración, o flotación Adición de levadura seleccionada Fermentación a temperatura controlada (15–18°C) Mezcla o “coupage” de los vinos para conseguir el vino base Estabilización proteica mediante bentonita (opcional) Estabilización frente a los cristales de bitartrato a –4°C Filtrado
Segunda fermentación o toma de espuma	Adaptación y adición de la levadura al vino base (10 ⁶ cél/ml) Adición de sacarosa al vino base (20–25 g/l máx.) Adición de clarificante (p. ej. bentonita) Crianza durante 9 meses o más Removido para aproximar la levadura al tapón Degüelle para eliminar la levadura Tapón de expedición

El proceso de elaboración del cava es el mismo para todos los tipos; sin embargo, el producto final varía en función de la duración de la crianza y del contenido en azúcar del producto acabado (Tabla 2).

El organismo responsable, tanto de la primera como de la segunda fermentación, es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. No hay acuerdo todavía para adjudicar a la cepa "bayanus", la más adaptada a la elaboración del cava y otros vinos espumosos, el taxón de subespecie o el de especie. Las cepas utilizadas son selecciones comerciales o cultivos propios de las empresas. Las primeras se venden en forma de levadura seca activa, con una concentración de $1-3 \times 10^{10}$ cél/g. Los cultivos de las empresas suelen conservarse en medio sólido de agar inclinado. Dado que el mosto no se esteriliza, se confía en el número y vitalidad de células del inóculo y su implantación en el mosto inoculado (Fig. 1). La selección de los cultivos o pies de cuba es una de las tareas más delicadas desde el punto de vista de la producción (2, 3, 5, 6).

Ejemplo de preparación de un pie de cuba, o cultivo iniciador, a escala industrial:

A) Obtención de biomasa activa

- A partir de levadura seca, se rehidratan 500 g en 5 litros de agua (de 35 a 40°C), con 250 g de sacarosa, durante 20 min.

- A partir de un cultivo en agar se multiplica en mosto estéril, o medio completo con sacarosa, hasta un volumen de 5 litros y una población de 10^8-10^9 unidades formadoras de colonia/ml.

B) Adaptación al medio alcohólico

En un recipiente de 2000 litros, preferentemente con agitador y regulación de temperatura, se añaden:

600 litros de vino

645 litros de agua

120 kg de azúcar

500 g de extracto de levadura, o bien, 100 g de sales de amonio

3 kg de ácido tartárico

Una vez que se ha obtenido una buena disolución se añaden los 5 litros de cultivo (A) o biomasa activa, y se mantiene a aproximadamente 20°C tres o cuatro días, hasta que la fermentación se generalice y la densidad alcance 1,000–1,002 g/cm³.

TABLA 2. Tipos de cava según el contenido en azúcares residuales

Tipo de cava	Azúcar
Extra brut	Hasta 6 g/l
Brut	Hasta 15 g/l
Extra seco	Entre 12–20 g/l
Seco	Entre 17–35 g/l
Semi-seco	Entre 33–50 g/l
Dulce	Más de 50 g/l

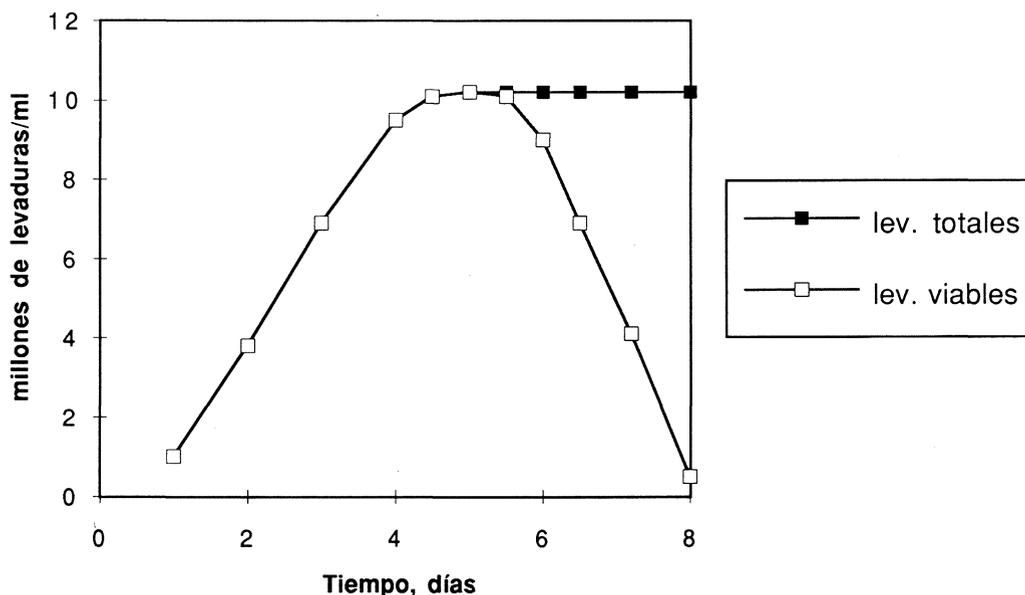


FIG. 1. Población de levaduras viables y totales durante la formación del pie de cava.

C) Etapa de multiplicación. Fase final antes del “tiraje”, o embotellado del cava.

Se disuelven 12,5 kg de azúcar en 500 litros del vino base a utilizar. Se añade a la solución (B). Se mantiene a 20°C hasta llegar a una densidad de 0,994–0,998 g/cm³, la cual se puede alcanzar en 24 horas.

Terminada esta fase, se puede añadir este cultivo al vino base con 20–25 g de azúcar por litro y clarificante, en proporción de 8–10%. Es preciso vigilar que la densidad no descienda de 0,996 g/cm³. Se obtiene de esta manera una concentración de células viables entre 0,8 y 1,2 millones por mililitro.

Este ejemplo corresponde a la preparación de 20.000 ó 26.000 botellas. Para otros volúmenes se requieren cantidades proporcionales.

Factores de selección de las levaduras para la segunda fermentación del cava

Tres aspectos microbiológicos destacan entre las características deseadas en las cepas de levadura destinadas a la elaboración del cava: resistencia al etanol durante la segunda fermentación, adecuada floculación y producción de aromas agradables.

Resistencia al etanol. Si bien las cepas enológicas de *Saccharomyces cerevisiae* se caracterizan de modo general por su gran adaptación a la producción y tolerancia al etanol, dicha tolerancia se ve sometida en gran medida a variables que dependen del medio y del estado fisiológico del cultivo. Todos éstos son aspectos sobre los cuales es preciso seguir investigando para conocer más detalles del proceso.

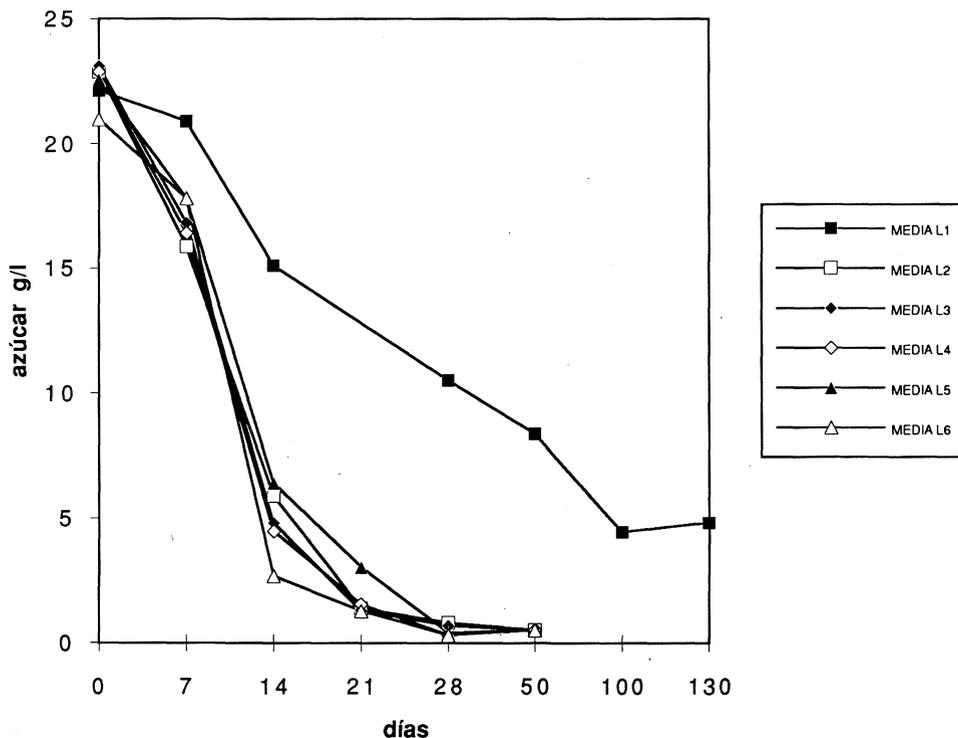


FIG. 2. Evolución de la segunda fermentación, comparando las medias de seis levaduras seleccionadas para vino espumoso. Cinco levaduras (nº 2 a 6) fermentaron con regularidad, mientras que la levadura número 1 muestra un retraso y no fermenta por completo.

Incluso entre las cepas comerciales para la producción de vinos, se observa un comportamiento diferente durante la fermentación (Fig. 2).

Probablemente, el momento más crítico sea el "tiraje", o embotellado del vino base con la levadura y el azúcar para la segunda fermentación y posterior crianza. En este proceso, que durará como mínimo nueve meses, la levadura debe adaptarse a un medio con etanol (10,5% en volumen), poco nitrógeno, pH bajo (de 2,95–3,30) y temperatura subóptima (14–18°C). Deberá crecer una o dos generaciones y fermentar el azúcar disponible (20–25 g/l), mientras resiste el aumento de etanol y el aumento de presión del dióxido de carbono, producido durante la fermentación en el interior de la botella (hasta más de 6 atm).

Las condiciones óptimas de cultivo varían mucho en relación a las del interior de la botella: temperatura más elevada (20°C), complementación de nutrientes y oxígeno forzado. Estas variables dan buenos resultados para la formación de biomasa, pero no necesariamente para la adaptación al etanol.

El etanol afecta, sobre todo, la permeabilidad de la membrana celular, que, en un medio de alta concentración de protones, (recordemos que el pH es 3), pierde funciones y no puede retener cofactores y coenzimas. El primer efecto inhibitor (a partir de 12% etanol v/v) es la imposibilidad de crecimiento o gemación, así como la reducción de la viabilidad (7, 8, 10). La capacidad para seguir fermentando resiste niveles mayores de etanol (hasta 15% etanol v/v, según la cepa).

La pérdida de estructura y permeabilidad de la membrana puede mitigarse mediante la incorporación, por parte de la levadura, de ácidos grasos insaturados que pueden proceder de las mitocondrias, u otros orgánulos ricos en membranas. Los ácidos grasos insaturados compensan la variación de rigidez de la membrana de la levadura, debida al efecto del etanol.

-Efectos inhibidores del etanol en *Saccharomyces cerevisiae*:

- inhibición de la multiplicación celular
- disminución de la viabilidad
- disminución de la actividad fermentativa
- ej., 12% etanol:
 - multiplicación inhibida 99%
 - fermentación inhibida 75%

-Zonas más sensibles en la célula de la levadura:

- membrana plasmática
- membrana de orgánulos
 - daños en organización y en permeabilidad
 - pérdida de cofactores y de coenzimas
- desnaturalización de proteínas y enzimas glucolíticas
- inhibición de transportadores
- inhibición del flujo de protones
- entrada pasiva de protones

Floculación adecuada. Al final de la crianza del cava, o fase de “rima”, en contacto con las levaduras, que caracteriza la producción de vinos espumosos de calidad, debe realizarse la operación del “removido”, que consiste en aproximar todo el depósito formado por las levaduras hacia el tapón de la botella. A continuación, con el “degüelle”, se separan estas levaduras y quedará el producto limpio.

La floculación se define como la agregación reversible de células en grumos, y juega un papel importante en la eliminación de las levaduras del interior de la botella por el proceso del “removido”. Esta operación se lleva a cabo en los pupitres, cuando se hace de forma individual, o en las jaulas y palés, cuando se hace con grupos de botellas.

Entre los mecanismos responsables de la floculación, se creía inicialmente que la levadura podía flocular por un simple efecto de carga. Más adelante se observó la necesidad de iones calcio y se desarrolló la teoría de los puentes de calcio. Un máximo de floculación coincide con la eliminación de nutrientes disponibles y un aumento de hidrofobicidad de la superficie de las levaduras. El calcio también actúa reforzando la unión (11). En la actualidad, se ha propuesto una teoría basada en la interacción entre proteínas de membrana y polisacáridos (como los mananos). Una levadura con buena floculación facilita, por tanto, la operación de removido formando un depósito consistente.

En general, además de ser una característica de cada cepa, hasta ahora se han descrito tres genes que codificarían este carácter.

La construcción por ingeniería genética de una cepa de levadura floculante se ha realizado, por Vezinhet et al. (12), mediante la hibridación parcial de citoplasmas o citoducción. Se ha introducido el

gen FLO5, de floculación. La cepa resultante fermenta más lentamente, y en ocasiones no es capaz de terminar la fermentación. La solución que propone esta autora es clonar el gen y transferir sólo el gen responsable después de verificar su expresión en una cepa de laboratorio. Esta fase de comprobación es importante y debe realizarse a escala piloto para evaluar los ensayos preliminares de laboratorio (1, 4, 9, 12).

Producción de aromas agradables. En el aroma del cava intervienen precursores que proceden de la uva y son producidos por el metabolismo de la levadura durante la primera fermentación, la segunda fermentación, y durante la crianza con las levaduras en los nueve meses o más dentro de la botella. Hay diferencias entre cepas de levadura en la formación de estos compuestos aromáticos afrutados del tipo ésteres que recuerdan los aromas de piña, plátano, fresa, manzana, etc.

Se han observado fenómenos de lisis que provocan la difusión de aminoácidos y péptidos lo que determina la formación de aromas de tipo tostado y de fruto seco.

Durante las fases de fermentación, en cambio, cuando las fuentes de nitrógeno no son suficientes, pueden producirse compuestos de azufre volátiles desagradables (12). Este último origen también varía entre cepas que tengan diferentes requisitos nutricionales.

Conclusiones

Los aspectos más importantes en la selección de levaduras son: buena adaptación al etanol de los vinos base a utilizar, producción de aromas agradables, y tendencia a formar grumos una vez terminada la segunda fermentación en botella. La mejora de cepas por manipulación genética necesita de la base molecular de los mecanismos deseados y el ensayo de las modificaciones que se realicen.

Bibliografía

1. Barre, P., Vezinhet, F., Dequin, S., Blondin, B. (1993). Genetic Improvement of Wine Yeasts. *In* Fleet, G. H. (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 265–288. Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland.
2. Cantos, A., Bartra, E., Campamà, C., Vilavella, M. (1992). Experiencia con levaduras secas comerciales en el tiraje del cava. *Viticultura/Enología Profesional* **22**, 38–45.
3. Cantos, A., Carbó, R., Jou, E. (1985). Selección de levaduras para cava. VII Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros.
4. Ernandes, J. R. et al. (1993). Respiratory deficiency in brewing yeast strains. Effects on fermentation, flocculation, and beer flavor components. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51**, 16–20.
5. Kreger-Van Rij, R. (1984). *The Yeasts. A Taxonomic Study* (3rd ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
6. Marchetti, R., Guerzoni, M. E. (1987). Efects de l'interaction souche de levure composition du moût sur la production, au cours de la fermentation, de quelques metabolites volatils. *Connaissance Vigne et Vin* **21**, 113–125.

7. Mishra, P., Kaur, S. (1991). Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 697–702.
8. Park, S. K., Noble, A. C., Bartra, E., Boulton, R. B. (1994). Incidence of volatile sulfur compounds in California wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 341–344.
9. Pretorius, I. S., Van der Westhuizen, T. J. (1991). The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry. *S. African J. Enol. Vitic.* **12**, 3–31.
10. Rose, A. H., Fleet, C. H. (1991). *The Yeasts*, vol. 4 (2nd ed.). Academic Press, London.
11. Straver, M. H., Kijne, J. W., Smit, G. (1993). Cause and control of flocculation in yeast. *Trends in Biotechnol.* **11**, 228–232.
12. Vezinhet, F. (1994). Aujourd'hui et demain: le génie génétique et les vins. *Revue des Oenologues* **73S**, 37–40.

Los microorganismos del jerez

Enrique García Maiquez

Bodegas González Byass S.A., Jerez de la Frontera (Cádiz)

Recibido 3 octubre 1994/Aceptado 15 febrero 1995

Summary

Sherry wine presents, during all its wine-making and aging process, a great diversity of yeast and bacteria, as well as in the wine itself; its particular wine-making system, with traditional and legal additions to correct the acidity and to get a final alcoholic content of 15%, originates a selection of accompanying microorganisms. Species of the genera *Kloeckera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* and *Saccharomycodes*, have been isolated during the fermentation process in different proportions. This fact confirms that, besides *S. cerevisiae*, strains of *S. chevalieri* and *S. fermentati* have an important role in the fermentative process, and that the film-forming *Saccharomyces* have great activity in the fermentation. The biological aging of the Sherry wine, carried out by *S. cheresiensis*, *S. beticus*, *S. feduchii* and *S. rouxii*, has been studied in “finos” and “manzanillas”. Different species and percentages in both wines have been described.

Key words: enology, yeast, film-forming *Saccharomyces*, sherry

Resumen

El jerez presenta durante todo su proceso de elaboración y crianza una gran diversidad de levaduras y bacterias, tanto en el mosto como en el vino; su particular sistema de vinificación, con adiciones tradicionales y legales para corregir su acidez y llevarlo a una graduación alcohólica del 15%, origina una selección de los microorganismos acompañantes. Especies de los géneros *Kloeckera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* y *Saccharomycodes*, han sido aisladas en distintas proporciones durante la fermentación. Se confirma que, junto a *S. cerevisiae*, cepas de *S. chevalieri* y *S. fermentati*

Correspondencia: Enrique García Maiquez. Bodegas González Byass S.A. Manuel María González, 12. 11403 Jerez de la Frontera (Cádiz). Tel.: 956-340000. Fax: 956-331935.

tienen un importante papel en el proceso fermentativo y que los *Saccharomyces* formadores de velo son acompañantes destacados en la fermentación. La crianza biológica del jerez, realizada por *S. cheresiensis*, *S. beticus*, *S. feduchii* y *S. rouxii*, ha sido estudiada en finos y manzanillas, habiéndose descrito especies y porcentajes diferentes en ambos vinos.

Introducción

El jerez constituye una de las grandes familias enológicas en la vitivinicultura. Son vinos generosos secos y dulces producidos desde la antigüedad en el sur de España, en el triángulo formado por las poblaciones de Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María y Sanlúcar de Barrameda. Estos vinos vienen condicionados por una serie de factores: tierras albarizas, cepas, clima, poda jerezana de vara y pulgar, tratamiento de las viñas, vendimia, etc., que son característicos de la zona y que se encuentran ampliamente recogidos en la bibliografía (3, 4, 9, 10, 13). No obstante, su específica vinificación y el sistema de crianza utilizado en la elaboración de estos vinos los hace diferentes a los demás.

Vinificación

El proceso de extracción del zumo de la uva para obtener el mosto se realiza con prensas de distintos tipos, neumáticas, horizontales, continuas, etc., siendo peculiar de las bodegas de Jerez el efectuar varias separaciones, por calidades de los mostos que se van obteniendo, a fin de dedicarlos a las diversas clases de vinos que constituyen los jereces. Durante la vinificación se utiliza de forma tradicional la incorporación de unos componentes que denominamos factores de corrección —ácido tartárico o cítrico, sulfato de calcio, dióxido de azufre y etanol— en distintas fases del proceso y con diferentes proporciones, y que desempeñan un papel básico tanto desde un punto de vista enológico como sobre los microorganismos acompañantes (5, 15, 16).

La incorporación de ácidos y sulfato de calcio produce sobre el mosto una disminución del pH, con incremento de la acidez total, lo que facilita una fermentación completa y rápida. Las cantidades a incorporar suelen ser, en ambos casos, de 1 a 2 g/l, dependiendo de la cosecha. La reducción del pH, junto con la adición de dióxido de azufre y etanol, tiene un efecto beneficioso sobre los microorganismos acompañantes, puesto que reduce de forma importante la presencia de bacterias y efectúa una selección de las levaduras.

Familias de jereces

El jerez presenta una diversidad de clases que nos induce a hablar de “familias” de vinos. En la Tabla 1 se recogen los tres grandes grupos: finos, olorosos y Pedro Ximénez, con algunas de sus características y variables analíticas. Existen otros tipos de jereces, como manzanilla —similar al fino

TABLA 1. Características y variables básicas de los vinos de Jerez

Características que dan la tipicidad	Vinos		
	Finos	Olorosos	Pedro Ximénez
Suelo	Albariza	Albariza	Albariza
Cepa	Palomino	Palomino	Pedro Ximénez
Vinificación: presión mostos	<0,5	0,5–1,5	>5
Vino: encabezado a (%)	15,5	18	10,0–15,5
Envejecimiento:			
crianza	Biológica	Biológica/no biológica	No biológica
edad media en años	3–5	8–10	8–25
Valores analíticos medios:			
pH	2,9–3,3	3,1–3,5	3,6–4,1
alcohol	15,5–17,0	18–21	15,5
acidez total* (g ATH/l)	3,7–5,2	4,5–6,0	5,2–7,1
acidez volátil** (g AcH/l)	<0,3	<0,8–1,2	<0,8–1,3
acetaldehído (mg/l)	200–400	60–80	150–200
glicerina (g/l)	<1,0	5–8	3–5
ácido málico (mg/l)	134–268	335–603	2500
ácido láctico (mg/l)	<900	<720	<400
polifenoles totales (mg/l)	250	275–350	500

* Expresado en g/l de ácido tartárico.

** Expresado en g/l de ácido acético.

pero envejecido en la ciudad de Sanlúcar—, amontillados, palo cortado, «cream», etc., que forman parte de la gran diversidad vinícola del jerez.

Sistema de crianza

El sistema de crianza jerezano, llamado de “soleras y criaderas”, se utiliza para obtener vinos de calidad uniforme a lo largo del tiempo, al contrario de lo que es habitual en el mundo vinícola, que se rige por las añadas —vino de un determinado año—, y donde las cualidades vienen condicionadas por las características propias de cada cosecha. Este último sistema se practicó en Jerez desde siempre y aún hoy se conserva en algunas bodegas tradicionales. El envejecimiento por soleras y criaderas implica la existencia de un mecanismo complejo de homogeneización, para que el producto final mantenga la tipología deseada y la singularidad de la marca.

Este mecanismo de crianza lleva a dos sistemas bien definidos. De una parte, el propio de la familia de los finos —finos, manzanillas, amontillados—, que está sustentado en la crianza biológica, realizada por las levaduras de flor durante todo el tiempo que perdura este proceso: desde un mínimo de tres años,

hasta seis u ocho para algunos viejos amontillados finos. Las transformaciones bioquímicas son realizadas principalmente por determinadas especies de *Saccharomyces*, que se desarrollan sobre la superficie del vino formando un velo, y que presentan un metabolismo oxidativo utilizando básicamente el etanol como fuente de carbono, para producir una gran complejidad de componentes secundarios suficientemente conocidos (6, 11, 12, 14).

De otra parte está la crianza no biológica, llamada también físico-química, propia de los olorosos y dulces, que se caracteriza por las extracciones que realiza el vino a partir de los componentes de la madera de roble de la bota —taninos, lignina—, la cual por hidrólisis e hidroalcohólisis va cediendo una serie de nuevos componentes —vainillina, siringaldehído, ácido ferúlico—. Las transformaciones de los polifenoles procedentes de la uva, que por oxidaciones originan cantidades apreciables de ácidos orgánicos (cumárico, cafeico, gentísico), y las posteriores reacciones químicas, darán la singularidad a estos vinos que hicieron famoso a Jerez fuera de nuestras fronteras.

Los microorganismos del jerez

Microorganismos acompañantes del mosto. La flora microbiana acompañante del mosto, procedente de la uva y presente en su pruina, es la responsable de la fermentación, y por tanto de las buenas cualidades del vino y, a veces, también de sus defectos. Estos microorganismos han sido estudiados, desde hace años, en las principales regiones vinícolas del mundo (2, 7). En el jerez, junto a las levaduras, se han aislado mohos y bacterias. Dentro de los mohos destacamos especies de los géneros *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus*. Estos mohos tienen una incidencia baja y carecen de papel específico en el proceso fermentativo. Tan sólo el aislamiento de *Botrytis cinerea* en años excepcionales, puede originar focos de contaminación que afectan posteriormente la calidad del vino, por lo que es necesario su control.

Las bacterias, presentes de manera habitual en todo el proceso productivo jerezano, pertenecen básicamente a los géneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. En determinadas condiciones pueden desarrollarse en exceso, y producir graves alteraciones. En vinos finos de Jerez se han aislado *L. plantarum*, *L. casei* y *L. brevis* en proporciones del 67%, 12% y 17%, respectivamente. Estas proporciones son muy similares a las encontradas por Maret en los vinos de la región suiza de Valais. *Acetobacter*, aislado con frecuencia en los mostos en proporciones muy variables, no aumenta de número posteriormente debido a la corrección de la acidez, que les afecta de manera importante (5). A pesar de ello, este microorganismo puede desarrollarse en los vinos con graduación alcohólica de 15,5%, produciendo alteraciones graves: acetificado, ahilado, la “vuelta” (o tourné de los franceses), etc.

En relación con las levaduras, hay que destacar, por una parte, la presencia de distintos géneros que, en proporciones muy variables, se aíslan al comienzo de la fermentación (*Kloeckera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Hansenula*), y, por otra, la variación del número que ocurre a través del proceso. En la Tabla 2 se indican los porcentajes iniciales, la desaparición, al final del proceso, de los géneros *Kloeckera*, *Candida* y *Hansenula*, la casi exclusividad final de *Saccharomyces* (99,8%) y la escasa presencia de *Pichia* (0,2%). Asimismo se comprueba en dicha tabla que la corrección de la acidez no afecta de manera importante a las levaduras, destacando la selección realizada por el dióxido de azufre sobre especies del género *Saccharomycodes*, con presencia del 56% y 37%, y la

TABLA 2. Influencia de los factores de corrección sobre las levaduras presentes al inicio y final de la fermentación del mosto de Jerez^a

Levadura	Control		ATY		ATY+SO ₂		ATY+E		ATY+E+SO ₂ ^b	
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V ^c
<i>Kloeckera</i>	35	–	32	–	–	–	11	–	–	–
<i>Candida</i>	2	–	1	–	–	–	0,5	–	–	–
<i>Pichia</i>	3	0,2	0,1	1	7	–	0,4	–	7	1
<i>Hansenula</i>	1	–	0,1	–	–	–	0,1	–	–	–
<i>Saccharomyces</i>	–	–	–	–	56	21	–	–	37	21
<i>Saccharomyces</i> :										
<i>S. cerevisiae</i>	45	40	40	43	10	31	37	34	30	22
<i>S. rosei</i>	18	–	8	–	10	–	6	–	–	–
<i>S. chevalieri</i>	9	30	10	31	20	23	9	26	54	32
<i>S. fermentati</i>	8	8	12	8	–	21	12	11	3	4
<i>S. exiguus</i>	7	9	12	5	20	17	9	12	10	22
<i>S. italicus</i>	–	–	–	1	–	–	–	1	–	–
<i>Saccharomyces</i> spp.	13	4	18	5	40	4	21	8	–	13
<i>Saccharomyces</i> del velo	–	9	–	7	–	4	6	8	3	7

^a Resultados expresados como porcentajes.

^b ATY = ácido tartárico (1–2 g/l) + sulfato de calcio: 1–1,5 g/l; SO₂ = dióxido de azufre (100–150 mg/l); E = etanol (3–4%).

^c M = mosto; V = vino.

desaparición de las especies no ascospórogenas (*K. apiculata* y *C. pulcherrima*). El efecto del etanol añadido reduce la presencia de *Kloeckera* (11%) y aumenta la de *Saccharomyces* (88%).

La selección correcta de las levaduras que deben realizar el proceso fermentativo nos permite obtener una serie de componentes secundarios, consecuencia de su peculiar metabolismo. En la Tabla 3 se comprueba que *K. apiculata*, *P. fermentans* y *Candida* sp. producen muy poca cantidad de alcoholes superiores o ésteres etílicos, si los comparamos con las especies de *Saccharomyces*, y que el contenido de acetato de etilo de *Pichia* hace que se considere una levadura indeseable en un proceso fermentativo (1, 8).

Las especies de *Saccharomyces* constituyen la flora dominante, habiéndose detectado la variación que durante la fermentación presentan algunas de ellas, así como el efecto de las medidas correctoras sobre las mismas. En la Tabla 2 se comprueba que *S. rosei* sólo se aísla al comienzo de la fermentación, cuando la corrección no tiene un marcado efecto sobre él. Sin embargo, otras especies incrementan su porcentaje de participación a medida que transcurre el proceso, como es el caso de *S. chevalieri*, con un 32%, muy similar al de *S. cerevisiae*, o incluso al del *S. italicus* que no se había aislado en la primera fase y sí se detecta, aunque en porcentajes muy reducidos, al final de la fermentación. Otras especies, como

TABLA 3. Contenido en diversos compuestos químicos presentes en mostos fermentados por diferentes levaduras (mg/l)

Compuesto químico	Levaduras				
	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces del velo</i>
Acetato de etilo	5	500	21	10	–
Alcoholes superiores:					
n-propanol	4	4	21	24	24
Isobutanol	10	6	19	56	95
2 metilbutanol-1	1	2	6	22	27
3 metilbutanol-1	10	7	47	178	207
Total	25	19	93	280	353
Ésteres etílicos:					
Caproato de etilo	0,4	0,2	0,1	0,7	0,4
Caprilato de etilo	–	0,1	0,4	1,1	0,9
Caprato de etilo	–	–	0,4	2,8	3,3
Laurato de etilo	–	–	–	1,6	1,5
Total	0,4	0,3	0,9	6,2	6,1

S. fermentati y *S. exiguus*, se aíslan prácticamente durante todo el proceso y con todas las correcciones. *Saccharomyces* spp. (penúltima línea de la Tabla 2) agrupa a un conjunto diverso de especies: *S. elefans*, *S. uvarum* y *S. heterogénicos*, aislados de mostos y vinos de forma dispersa. Finalmente, los *Saccharomyces* formadores de velo presentan una selección manifiesta con el etanol y se aíslan al final de la fermentación en todos los aislamientos realizados.

Microorganismos acompañantes del vino. Una vez finalizada la fermentación se procede, tras el deslío, a la adición de etanol (alcoholización) para establecer una graduación del 15%. Entonces son los *Saccharomyces* de flor los que poseen la capacidad de utilizar el etanol como fuente de carbono a través de la alcohol deshidrogenasa II, y se desarrollan formando una película sobre la superficie del vino, para constituir la crianza biológica del jerez. A partir del velo, se han aislado en distintas proporciones las siguientes especies: *S. cheresiensis*, *S. beticus*, *S. feduchii* y *S. rouxii* (6). En la Tabla 4 se indican las especies y los porcentajes encontrados, tanto en vinos finos como manzanillas. Se comprueba que existe una presencia variable de *Saccharomyces*, lo cual puede condicionar las características propias del fino y de la manzanilla, en función de las especies predominantes. Esto pone de manifiesto la importancia enológica que tienen estas levaduras, por lo que no se aconseja encuadrarlas en una especie única, como se ha pretendido realizar en torno a *S. bayanus*.

TABLA 4. *Saccharomyces* de flor aislados en finos y manzanillas

<i>Saccharomyces</i>	Finos ^a		Manzanillas ^b	
	Nº cepas aisladas	Porcentaje	Nº cepas aisladas	Porcentaje
<i>S. cheresiensis</i>	12	20	—	—
<i>S. beticus</i>	39	65	25	31
<i>S. aceti</i>	8	13	—	—
<i>S. rouxii</i>	1	2	—	—
<i>S. feduchii</i>	—	—	56	69

^a J. Vila (comunicación personal).

^b J. Casas (comunicación personal).

Conclusiones

En relación con los microorganismos acompañantes del jerez, se pueden realizar las siguientes consideraciones:

1. Las especies de los géneros *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus*, aisladas al comienzo de la fermentación, no tienen ningún papel definido en el proceso, formando parte de la flora natural y habitual de la uva.

2. Las bacterias aisladas, tanto en mostos como en vinos, corresponden a especies de los géneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Pueden producir graves alteraciones en los vinos. Su control se hace mediante la corrección de la acidez al comienzo de la fermentación y mediante la alcoholización previa al proceso de crianza (15%).

3. Las levaduras presentan comportamientos muy dispares. Así existen especies que únicamente se aíslan en primera fase fermentativa, como son las pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Candida* y *Hansenula*. Estas especies, que no aportan ningún valor enológico al producto final, son incapaces de resistir el etanol producido durante la fermentación. Al final de la fermentación se aíslan también especies de *Pichia*, consideradas tradicionalmente especies no deseadas, que se pueden desarrollar en vinos de alta graduación.

Existe una gran variedad de especies del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. fermentati*) que se presentan en porcentajes elevados y son los responsables fundamentales de la transformación del mosto en vino. Los *Saccharomyces* de flor, aislados en la última fase fermentativa y responsables de la crianza biológica, están representados por varias especies, *S. cheresiensis*, *S. rouxii* y *S. beticus*, en distintos porcentajes según los velos estudiados.

Bibliografía

1. Álvarez Batista, M. A., García Maiquez, E. (1984). Componentes aromáticos de la fermentación alcohólica del jerez. *Microbiol. Españ.* **37**, 39–48.
2. Amerine, M. A., Kunkee, R. E. (1968). Microbiology of winemaking. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**, 328–358.
3. Casas Lucas, J. (1967). Procédes d'élaboration des vins de Xérès. *Symposium Int. d'Oenologie.* **2**, 495–508.
4. Casas Lucas, J. (1984). Descripción resumida de la técnica enológica de los vinos de Jerez. III Jornadas Universitarias sobre el jerez. Libro de Resúmenes. Universidad de Cádiz, pp. 333–361.
5. García Maiquez, E. (1978). Estudio sobre las levaduras y otros microorganismos presentes en los mostos de Jerez. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
6. García Maiquez, E. (1988). Les levures de voile dans l'elaboration des vins de Xérès. Application à l'oenologie des progrès récents en microbiologie et en fermentation. *Bull. O. I. V.* **61**, 341–372.
7. García Maiquez, E. (1988). Evolución de levaduras durante la fermentación alcohólica del jerez. II Jornadas Universitarias sobre el jerez. Libro de Resúmenes. Universidad de Cádiz, pp. 283–291.
8. García Maiquez, E., Álvarez Batista, M. A. (1982). Cinética de formación de componentes aromáticos durante la fermentación de mosto de jerez. I Reunión conjunta de Micología. Universidad de Alcalá de Henares.
9. González Gordon, M. M. (1948). Jerez-Xérès-Sherry. Editorial Jerez Industrial, Jerez (Cádiz).
10. Iñigo Leal, B. (1984). Aspectos generales de la microbiología en el vino de Jerez. III Jornadas Universitarias sobre el jerez. Libro de Resúmenes. Universidad de Cádiz, pp. 11–23.
11. Martínez, P., Valcárcel, M. J., González, P., Benítez, T., Pérez, L. (1984). Aspectos metabólicos de las levaduras de velo de flor en la crianza biológica de los vinos finos de Jerez. *La Semana Vitivinícola* **2478**, 391–397.
12. Millan, C., Ortega, J. M. (1988). Production of ethanol, acetaldehyde and acetic acid in wine by various yeast races. Role of alcohol and aldehyde deshydrogenase. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 107–112.
13. Péman, C., Casas, F., Ogier, P., Pérez, J. L. (1982). Estudio sobre los ataques en yemas del *Enophytes vitis*. II Jornadas Universitarias sobre el jerez. Libro de Resúmenes. Universidad de Cádiz, pp. 142–155.
14. Schimphessel, L. (1966–67). Aspects de la regulation des alcohols deshydrogenases chez les levures. *Rev. Ferment. et des Indust. Alim.* **21**, 117–129, 161–175 y 201–207.
15. Valcárcel, M. J., Pérez, L., González, P., Domecq, B. (1987). Efecto de la sulfitación sobre las levaduras responsables de la fermentación en la zona de Jerez. IV Jornadas Universitarias de Viticultura y Enología en Jerez. Libro de Resúmenes. Universidad de Cádiz, pp. 187–195.
16. Valcárcel, M. J., Pérez, L., González, P., Domecq, B. (1989). Efecto de la modificación del pH mediante la corrección de la acidez sobre la flora fermentativa en la zona del Jerez. V Jornadas Universitarias de Viticultura y Enología en Jerez. Libro de Resúmenes. Universidad de Cádiz, pp. 143–150.

Técnicas instrumentales para la detección de microorganismos en cervecería

Marta Orive

Área de Biología, San Miguel, Fábricas de Cerveza y Malta, S. A., Lleida

Recibido 12 diciembre 1994/Aceptado 15 febrero 1995

Summary

Although modern production techniques keep microorganism levels very low in both finished beer and in beer process, there is still concern about early detection and prevention of accidental proliferation of brewery spoilage microorganisms. Traditional microbiological techniques can detect such low levels, but no results are obtained before 3 to 6 days of incubation. That is why rapid or even “instant” techniques are a main objective of research in the brewing industry. In this work, some instrumental techniques (DEFT, MMCF, impedance, pH, immunology and PCR based techniques, bioluminometry) are described and considered from the point of view of their regular use in brewery Microbiological Quality Assurance Laboratories. Real case experiences are brought forward.

Key words: DEFT, MMCF, bioluminescence, brewery

Resumen

Aunque las modernas técnicas de fabricación mantienen el contenido de microorganismos a niveles suficientemente bajos en la cerveza terminada y en proceso, persiste la preocupación por detectar y evitar a tiempo la proliferación accidental de microorganismos peligrosos. Las técnicas microbiológicas tradicionales detectan estos bajos niveles, pero los resultados se obtienen al cabo de 3 a 6 días, por lo que la investigación de métodos rápidos, o incluso, “instantáneos”, es un objetivo prioritario en nuestras industrias. En este artículo se describen y valoran varias técnicas instrumentales (DEFT, MMCF, medida de la impedancia y el pH, inmunológicas, PCR y bioluminetría) desde el punto de vista de su uso

regular en el Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad Microbiológica en cervecería y se aportan experiencias prácticas.

Introducción

Los principales factores que influyen en la estabilidad microbiológica de la cerveza son sus características naturales (bajo pH, presencia de etanol y de CO₂, resinas de lúpulo, pocos nutrientes disponibles, etc.) que determinan que no puedan desarrollarse en ella microorganismos patógenos. Pero un grupo reducido de microorganismos sí puede hacerlo, produciendo alteraciones organolépticas. Pertenecen mayoritariamente al grupo de las bacterias lácticas y al de las levaduras.

La industria cervecera, al igual que el resto de las industrias alimentarias, ha ido estudiando y aplicando nuevas técnicas de fabricación, mejoras en las instalaciones y en el mantenimiento de la higiene, que tienen por objetivo impedir el acceso y la colonización del producto por parte de los microorganismos en general, y de los peligrosos, en particular. Gracias a estas tecnologías, desde la ebullición del mosto hasta la pasteurización o filtración estéril, se ha conseguido que el producto contenga unos niveles de microorganismos muy bajos, de ausencia en 1 ml durante el proceso y de ausencia en 100 ml ya antes del envasado y en el producto terminado, lo que le confiere una gran estabilidad biológica. A pesar de todo, persiste la preocupación por detectar y evitar a tiempo el desarrollo accidental de alguno de estos microorganismos.

Las técnicas microbiológicas clásicas permiten determinar ese bajo contenido de microorganismos en el producto, pero los resultados tardan siempre varios días. Son básicamente de dos tipos, según se apliquen a muestras con levadura de cultivo (con 1 a 100 millones de células de levadura/ml), o a muestras de cerveza filtrada o brillante. Las primeras se basan en la incubación en medios de cultivo selectivos, con observación y recuento de las colonias al cabo de 2 a 6 días. Las segundas conllevan siempre un paso de concentración por filtración sobre membrana previo al cultivo, y los resultados se obtienen igualmente al cabo de 3 a 6 días. En cuanto a la supervisión de la higiene de las instalaciones, el tiempo requerido para obtener los resultados es de 2 a 3 días. Por todo ello, la investigación de métodos rápidos y, a ser posible “instantáneos”, es un objetivo prioritario en nuestras industrias.

Técnicas instrumentales

La lentitud de los métodos tradicionales es debida sobre todo al período de incubación. Con las técnicas instrumentales se intenta ganar tiempo evitando o acortando esta fase. La detección temprana de una población microbiana en un alimento se hace observando alguna actividad metabólica o un componente celular “marcado”, los cuales producen una determinada señal físico-química que es amplificada instrumentalmente.

Las técnicas instrumentales aplicables en cervecería deberían tener todas las características positivas de los métodos tradicionales y no presentar graves desventajas. Idealmente, una técnica de detección debería poseer las siguientes cualidades: rapidez en la obtención del resultado, umbral de detección bajo, elevada selectividad, posibilidad de distinguir las células viables de las inviables, bajo

coste, elevada capacidad de procesamiento de muestras por persona y día, y ser aplicable tanto a cerveza filtrada como sin filtrar (con levadura). Desgraciadamente, ninguna técnica cumple todos estos requisitos a la vez.

En este trabajo se describen y comentan aquellas técnicas instrumentales que están mereciendo más atención como posibles candidatas a incorporarse al trabajo cotidiano del Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad Microbiológica en cervecería. Clasificaremos las técnicas en tres grupos, según se basen en (i) la detección directa de los microorganismos, (ii) en la detección de los subproductos o la modificación del medio debidos a su actividad o (iii) en la detección de alguno de sus componentes celulares.

1. Técnicas basadas en la detección directa de los microorganismos. Aprovechando la capacidad de algunos colorantes fluorescentes de unirse selectivamente a los microorganismos vivos, se desarrollaron diversas técnicas. Las más estudiadas para su aplicación en cervecería son la DEFT (Direct Epifluorescence Technique) y la MMCF (Membrane Filter Microcolony Fluorescence Technique).

a. DEFT. Esta técnica se desarrolló inicialmente para leche (16). No es aplicable a cerveza sin filtrar, debido al elevado contenido en levadura. La muestra de cerveza brillante se filtra sobre una membrana, que se tiñe con naranja de acridina. Esta membrana se observa al microscopio con luz azul que incide sobre ella, y los microorganismos se pueden ver teñidos de naranja-rojo si están vivos.

Esta técnica fue estudiada en nuestros laboratorios de I+D, llegándose a la conclusión de que no era aplicable para nuestros análisis de rutina. Por una parte, dados los bajos niveles de detección exigidos (1 célula/membrana), era precisa la inspección total de la membrana, lo que consumía mucho tiempo y provocaba un agotamiento visual muy grande, con dificultades en la diferenciación de partículas, con fluorescencia propia, similares a las bacterias. Por otra parte, el inconveniente principal es la dificultad de distinguir entre células viables y no viables, sobre todo si han pasado por un proceso de pasteurización (7, 13).

b. MMCF modificado. Basándose en el mismo principio, en esta técnica hay que filtrar la muestra a través de una membrana y colocarla sobre un medio de cultivo que puede contener ya el fluorocromo. Pasado el período de incubación, se observa al microscopio con epifluorescencia. Aunque se distingue perfectamente entre microorganismos viables y no viables, y su coincidencia con el recuento en placa es de un 93,4% (17), la metodología es muy laboriosa y la incubación requiere de 24 a 48 h. La existencia de analizadores de imagen específicos para la detección de microcolonias hace de ésta una técnica con posibilidad de ser automatizada parcialmente. Incluso se han descrito ensayos de automatización total (14). Por tanto, ya es aplicable en el análisis rutinario del laboratorio microbiológico de cervecería.

2. Técnicas basadas en la detección de subproductos o de modificaciones en el medio debidas a la actividad de los microorganismos. Entre éstas se encuentran la medida de la conductancia/impedancia (7, 21) y la medida del pH (2). Son técnicas poco sensibles, cuyo umbral de detección es del orden de 10^6 – 10^7 células bacterianas/ml. Para cargas microbianas de 10 células/100 ml, que se quieren detectar en la cerveza, se requiere no sólo la concentración de la muestra por filtración sino además su incubación. El tiempo total es mayor que en otras técnicas citadas aquí, porque los microorganismos deben alcanzar primero la fase exponencial y después producir cantidades detectables de subproducto, o variaciones mensurables en el medio. Una desventaja añadida es que las bacterias

lácticas necesitan medios muy complejos y muy tamponados, mientras que los medios de cultivo empleados en estas técnicas no lo son. Por ahora, son de poca utilidad práctica.

El análisis de subproductos metabólicos por cromatografía de gases ha sido aplicada a la detección de algún grupo concreto. Por ejemplo, los pediococos, que producen diacetilo, o las bacterias del mosto, que producen dimetilsulfuro (9). Pero igualmente se necesita mucho tiempo para llegar a la fase exponencial y a la acumulación de suficiente cantidad de subproducto. Por ahora, es más interesante su uso en la identificación.

3. Métodos basados en la detección de determinados componentes celulares. Los principales son los siguientes:

a. Métodos inmunológicos. El uso de anticuerpos policlonales marcados con colorantes fluorescentes era una técnica recomendada por el Institute of Brewing, institución ampliamente reconocida en el mundo cervecero, para la detección de células de levadura salvaje entre la levadura de cultivo. Se estuvo usando en muchas cervecerías, pero era necesario preparar los anticuerpos in situ a base de inocular los antígenos para levadura en un conejo (5). Esta técnica ya no aparece en los Recommended Methods of Analysis del Institute of Brewing de 1991 (6).

La aparición de los anticuerpos monoclonales, que se pueden comercializar y que son más específicos contra los microorganismos de interés, ofrece un gran potencial, ya que permite la detección e identificación de los microorganismos en un único análisis. En la actualidad, el equipo de investigación de INVESCEMA (Asociación para la Investigación de la Cerveza y de la Malta, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Asociación de Fabricantes de Cerveza y Malta) está llevando a cabo un proyecto conjunto con la Universidad Politécnica de Valencia para la obtención de anticuerpos monoclonales contra bacterias del ácido láctico.

Se podrían combinar con el uso de la fluorescencia y la observación microscópica previa concentración de la muestra (3), o en el futuro con otras técnicas como la citometría de flujo (1, 4) o como biosensores en FIA (Flow Injection Analysis).

Una vez que se dispone de los anticuerpos específicos, el umbral de detección es muy bajo y la reacción puede llevarse a cabo en muestras complejas, como las que contienen levadura, y prácticamente sin tratamiento previo. Una desventaja es que los anticuerpos se unen igualmente a microorganismos viables y no viables.

b. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos. Las técnicas que se han descrito recientemente se basan en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del DNA (12), que permite amplificar específicamente pequeñas cantidades de DNA in vitro, aprovechando una polimerasa del DNA que es estable a altas temperaturas (Fig. 1). En un primer paso, se desnaturaliza el DNA de doble cadena (de 90 a 95°C). A continuación, entre 40 y 60°C, los dos cebadores complementarios de los extremos 3' de los fragmentos de DNA molde se unen a ellos (se anillan). Finalmente, entre 70 y 75°C, temperatura óptima de la polimerasa, se produce el alargamiento de los cebadores por adición de nucleótidos ya presentes en el medio. Con la repetición de ciclos que constan de estos tres pasos consecutivos, se puede llegar a obtener en pocas horas miles de copias del fragmento de DNA molde.

En un reciente trabajo (20) se afirma que el uso de la amplificación del DNA permite detectar una sola célula presente en la muestra y que se pueden detectar e identificar simultáneamente bacterias

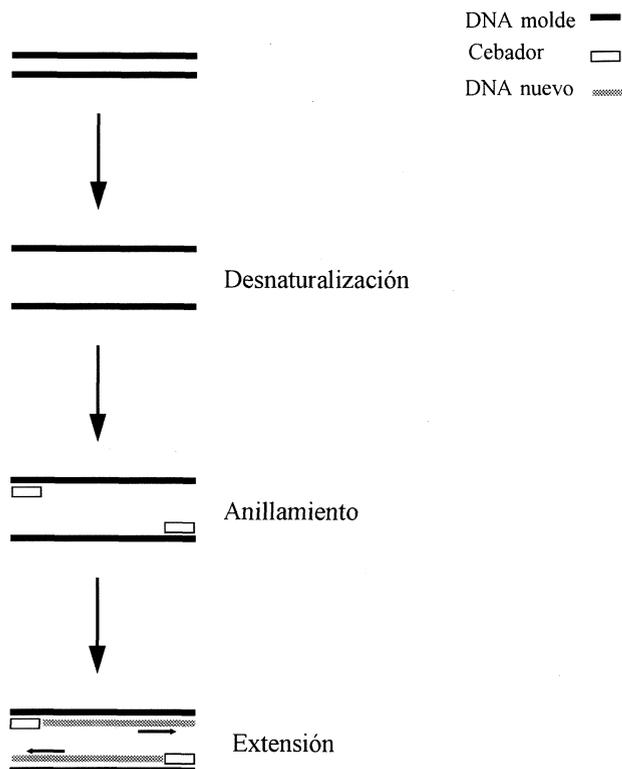


FIG. 1. Amplificación del DNA. Reacción en cadena de la polimerasa.

lácticas y levaduras. Pero es preciso disponer de los cebadores adecuados y contrastados, cosa difícil de conseguir por el momento y que impide que esta técnica se difunda en cervecería.

Existe la posibilidad de utilizar la PCR para detectar fragmentos específicos de RNA que están presentes en mayor cantidad que las secuencias génicas correspondientes. El grupo de INVESCEMA acaba de iniciar un proyecto cuyo objetivo es la diferenciación de levaduras, de cultivo y salvajes, basándose en la detección de RNA citoplasmáticos. La detección del RNA mensajero podría ser usado como indicador de la presencia de organismos viables (19).

Estas técnicas tienen ventajas similares a las inmunológicas, es decir, gran especificidad y sensibilidad, pero los inconvenientes son también parecidos, ya que hay que conocer las secuencias del DNA específicas de cada grupo de microorganismos de interés en cervecería, preparar los cebadores adecuados y comprobar que no reaccionen frente a otros microorganismos presentes en las muestras reales. Por ahora, su uso en la práctica se reduce a la diferenciación de levaduras de cultivo.

c. Bioluminometría. Se basa en el hecho de que todos los microorganismos vivos contienen ATP (adenosín trifosfato). Éste es extraído con un reactivo específico. Por medio de un complejo enzimático de luciferín-luciferasa de luciérnaga, se cataliza una reacción de bioluminiscencia (Fig. 2), en la que a partir de ATP y en presencia de oxígeno se forma luz, detectable por un fotómetro muy sensible. La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP y los resultados son instantáneos.

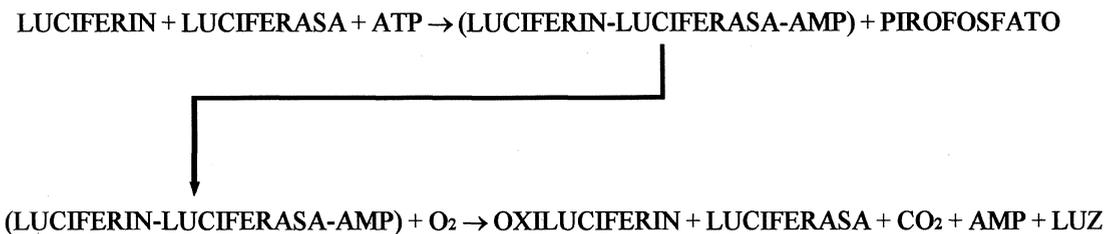


FIG. 2. Secuencia de reacciones de bioluminiscencia.

Se considera que el contenido de ATP dentro de cada grupo de microorganismos es similar en todas las células, si éstas se llevan a condiciones estandarizadas. Esto nos permite hacer recuentos de microorganismos comparando con una cantidad estándar de ATP. Su umbral de detección, unas 1000 células bacterianas (19), es más bajo que el de otras técnicas, aunque no se puede distinguir el tipo de microorganismo.

Esta técnica tiene unas posibilidades muy interesantes, ya que muchos residuos de alimentos también contienen ATP que pueden ser detectados en poco más de un minuto desde la obtención de la muestra por frotis (10). Se toma la muestra de la superficie a examinar con un hisopo previamente humedecido en un caldo libre de ATP. El hisopo se pone en contacto con un reactivo que extrae el ATP celular al medio. A la suspensión se le añade el complejo enzimático luciferín-luciferasa para que se produzca la reacción de bioluminiscencia. Finalmente, se lleva la muestra al fotómetro para la medición de la luz que se forma inmediatamente, si hay ATP presente.

Esta técnica se está utilizando en el control de la higiene de las instalaciones, antes de su uso, aplicándolo como método de "screening". Los resultados de los análisis nos indican el estado de limpieza de las instalaciones, superando con creces la inspección visual y convirtiéndose en una referencia objetiva e inmediata para los técnicos y operarios, quienes, como es lógico, constituyen el principal apoyo para el mantenimiento de la higiene en la industria cervecera.

En nuestros laboratorios de I+D hemos podido comprobar que, a pesar de la distinta naturaleza de los principios en que se basan, el grado de acuerdo entre los resultados de la técnica tradicional de evaluación de la higiene mediante frotis e incubación y la de bioluminometría, es de más del 84% (15). Aunque la nueva técnica tiene el inconveniente de no distinguir entre bacterias, mohos y levaduras, ofrece importantísimas ventajas. Por una parte, se precisa personal menos cualificado y, por otra, detecta materia orgánica aun cuando no esté colonizada por microorganismos. Esto último permite un grado mayor de prevención. Pero es sobre todo la rapidez de los resultados, que se tienen en 1 ó 2 minutos, lo que permite que se tomen medidas correctivas en tiempo real de producción (Tabla 1).

En este campo, nuestra experiencia de más de tres años nos ha permitido diseñar unos planes de acción que cubren tanto la evaluación del estado de las instalaciones, antes de su uso, como de la eficacia de los sistemas de limpieza y de los productos usados para ello, a lo largo del tiempo.

Otro aspecto de la supervisión de la higiene es el análisis de las últimas aguas de enjuague de las instalaciones después de limpieza, para lo que existen reactivos comercializados y que nos informan del estado de la instalación en el plazo de una hora.

TABLA 1. Comparación entre técnicas para el control de la higiene mediante frotis

	Técnica	
	Tradicional	Bioluminometría
Resultados	2-3 días	1 minuto
Personal cualificado	Sí	Menos
Detección de materia orgánica	No	Sí
Detección de microorganismos	Sí	Sí
Selectividad	Sí	No
Diferencia principal	Retrospectiva	Operativa

La bioluminometría no es aplicable al análisis de cerveza sin filtrar, ya que el elevado contenido de levadura de cultivo hace imposible la detección de bajos niveles de otros microorganismos. En cuanto a su aplicación para la evaluación de la cerveza filtrada o terminada, esta técnica debe ir combinada necesariamente con un paso previo de filtración de membrana e incubación. A priori, presenta algunos inconvenientes como la falta de selectividad. Los reactivos comercializados para cerveza dan, en general, buenos resultados en la detección de levaduras en unas 20 horas (11), aunque no se puede distinguir entre levaduras y bacterias. Para la detección de bacterias lácticas los medios de cultivo convencionales contienen mucho ATP y producen enmascaramiento de la luz ("quenching"), y aún no se dispone de medios adecuados (8). Pero si se pudieran obtener resultados de 10 células de levadura/250 ml en el plazo de una hora, como se afirma en algunos trabajos publicados (18), se podría plantear como método de clasificación primario entre lotes aceptables y lotes pendientes de estudio adicional.

Conclusiones

La evaluación de la higiene por frotis, basada en la bioluminometría, es la única técnica instrumental que ha entrado de lleno en la rutina de los laboratorios de nuestras industrias, convirtiéndose en una práctica obligada antes del inicio de aquellos procesos de fabricación donde las exigencias de higiene son prioritarias.

Para el análisis del producto, las técnicas de fluorescencia, las técnicas inmunológicas, las basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos y la bioluminometría, aún siendo más laboriosas y más delicadas en sus procedimientos experimentales, son mucho más sensibles y rápidas que las demás. Éste es el motivo por el cuál se consideran más indicadas para alimentos con poca carga microbiana, como la cerveza. Pero sólo la bioluminometría y la técnica de MMCF están en estos momentos adaptadas para un uso regular en los Laboratorios de Aseguramiento de la Calidad.

La técnica de la MMCF será interesante cuando se disponga de sistemas totalmente automatizados. La bioluminometría como técnica de "screening" es una alternativa que debe ser estudiada con mucho cuidado, y que no excluye el control microbiológico por incubación en aquellas muestras que se clasifiquen como dudosas.

Por ahora, aunque no se puede decir que las técnicas tradicionales con incubación vayan a ser sustituidas extensivamente por técnicas instrumentales, ya podemos pensar en el uso regular de técnicas rápidas para gran parte de los análisis de rutina. Dentro de pocos años, el Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad Microbiológica de cervecería podrá dar muchos resultados a tiempo para la producción y se podrá hablar, con más propiedad, de control microbiológico.

Bibliografía

1. Eger, C., Donhauser, S., Winnewisser, W. (1993). Schnellnachweis von bierschädlingen. *Brauwelt* **41**, 2087–2095.
2. Harrison, J., Web, T. J. B., Martin, P. A. (1974). The rapid detection of brewing spoilage microorganisms. *J. Inst. Brew.* **80**, 390.
3. Hutter, K. J. (1991). Fluoreszenzserologischer schnelldienst zur identifizierung von mikroorganismen auf membranfilter. *Brauwelt* **18**, 726–730.
4. Hutter, K. J. (1992). Simultane mehrparametrische durchflusszytometrische analyse verschiedener mikroorganismenspezies. *Monatss. f. Brauwissenschaft* **9**, 280–284.
5. Institute of Brewing (1973). Immunofluorescent staining method. *In* Institute of Brewing (ed.), *Recommended Methods of Analysis* 9.1.4.1., 49–50.
6. Institute of Brewing (1991). *Recommended Methods of Analysis*. Institute of Brewing, London.
7. Kilgour, W. J., Day, A. (1983). The application of new techniques for the rapid determination of microbial contamination in brewing. *Proc. 19th. EBC Congress*, pp. 177–184. IRL Press, London.
8. Kyriakides, A. (1988). Protocol development and bright beer analysis. *Proc. Brewing Workshop: applications of the LUMAC rapid microbial testing techniques within the brewing industry*, pp. 53–68.
9. Lategan, P. M., van Vuuren, H. J. J., Erasmus, S. C. (1980). The detection of *Enterobacter aerogenes* in brewery worts by gas chromatography. *J. Inst. Brew.* **86**, 288–290.
10. LUMAC Hygiene Monitoring QM Kit, Cat. No. 9330–5.
11. LUMAC Beer Microbial Kit, Cat. No. 9331–3.
12. Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalized chain reaction. *In* Wu, R. (ed.), *Methods in Enzymology*, pp. 335–350. Academic Press, San Diego.
13. Navarro, A., Moreno, P., Carbonell, J. V., Pinaga, F. (1987). Practical approaches to the use of epifluorescence microscopy as a rapid method for microbiological quality control in brewing. *Proc. 21st. EBC Congress*, pp. 465–472. IRL Press, Madrid.
14. Niwa, M. (1993). Rapid determination of trace amounts of microorganisms. *Brauwelt Intl.* **II**, 149–153.
15. Orive, M. (1994). Aplicaciones de la bioluminometría en la supervisión y el control de la higiene de la industria cervecera. Ed. Asoc. Esp. Técnicos de Cerveza y Malta, Madrid, in press.
16. Pettipher, G. L., Mansell, R., McKinnon, C. H., Cousins, C. M. (1980). *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 423–429.
17. Rusch, A., Krämer, J. (1990). Schnellnachweis bierschädlicher Mikroorganismen mit der modifizierte MMCF-Methode. *Monatss. f. Brauwissenschaft* **2**, 77–81.
18. Simpson, W. J., Hammond, J. R. M., Thurston, P. A., Kyriakides, A. L. (1989). Brewery process control and the role of 'instant' microbiological techniques. *Proc. 22nd. EBC Congress*, pp. 663–674. IRL Press, Zurich.
19. Simpson, W. J. (1990). Rapid microbiological methods. *In* Campbell, I. (ed.), *Proc. 3rd. Aviemore Conf. on malting, brewing and distilling*, pp. 161–178. Ed. Campbell, Edinburgh.
20. Tsuchiya, Y., Kaneda, H., Kano, Y., Koshino, S. (1992). Detection of beer spoilage organisms by polymerase chain reaction technology. *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, 64–67.
21. Vogel, H., Bohak, I. (1990). Schnellnachweismethoden für schädliche Mikroorganismen in der Brauerei. *Brauwelt* **10**, 414–422.

Aplicaciones de la biología molecular en enología

Daniel Ramón,* Luis González-Candelas, José Antonio Pérez-González, Ramón González, Luisa Ventura, Paloma Sánchez-Torres, Salvador Vallés, Francisco Piñaga, María Vicenta Gallego, María Teresa Fernández-Espinar, Amparo Querol

Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia

Recibido 30 octubre 1994/Aceptado 5 febrero 1995

Summary

Population dynamics of natural and inoculated industrial wine fermentations have been studied by using a simple molecular biology technique based on mitochondrial DNA restriction analysis profile. The predominance of the inoculated strain in the inoculated fermentations is obvious. A genetic transformation system has been developed for an industrial wine yeast strain named T73. By using this technique, different fungal hydrolases in this industrial strain have been expressed. Problems and benefits of the application of recombinant DNA techniques in wine yeast strains are also discussed here.

Key words: wine, wine yeast, population dynamics, genetic manipulation, glycosidases

Resumen

Mediante el empleo de un método molecular basado en el análisis de restricción del DNA mitocondrial, se han estudiado las dinámicas poblacionales de fermentaciones vínicas industriales, tanto naturales como inoculadas con levaduras seleccionadas. En las fermentaciones inoculadas se ha podido observar una clara imposición de la cepa seleccionada. Se ha desarrollado un sistema de transformación

* *Correspondencia:* Daniel Ramón. Dept. de Biotecnología. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos. CSIC. Jaime Roig, 11. 46010 Valencia. Tel.: 96-3690800. Fax: 96-3930001. E-mail: dramon@iata.csic.es.

para una cepa de levadura vínica industrial denominada T73. Con esta técnica se han expresado en esta cepa distintos genes fúngicos que codifican hidrolasas. Finalmente se discuten los problemas y beneficios que puede generar el empleo de técnicas de DNA recombinante en enología.

Dinámica poblacional de las fermentaciones vínicas naturales

El mosto de uva es un nicho ecológico complejo donde conviven diversas poblaciones de levaduras y bacterias. Entre ellas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la principal responsable de la fermentación alcohólica. El desarrollo secuencial de algunas de estas poblaciones frente a la desaparición de otras, da como resultado la producción del vino. La magnitud de este fenómeno de variabilidad poblacional solo se ha podido comprobar con el advenimiento de una técnica de biología molecular basada en el análisis del DNA mitocondrial (mtDNA), que permite diferenciar una cepa vínica de *S. cerevisiae* procedente de un mosto determinado, de otras cepas de la misma especie presentes en el mismo mosto (9). En resumen, mediante el empleo de esta técnica molecular el investigador dispone de una huella genética, un patrón de bandas, que claramente diferencia cepas de la especie *S. cerevisiae*.

Esta técnica se ha aplicado en dos bodegas de la D. O. Alicante (10). La flora de *S. cerevisiae* de ambas fermentaciones se monitorizó tomando muestras periódicas durante los 20 días de fermentación. Los resultados fueron sorprendentes. En el mosto inicial se detectaban en cada caso alrededor de 20 poblaciones distintas de la levadura *S. cerevisiae*, pero al final de la fermentación solo algunas de ellas permanecían en un porcentaje significativo. En otras palabras, el mosto de uva es un reservorio natural de muchas especies levaduriformes, pero solo algunas de ellas son responsables de la producción del vino.

No fue ése el único dato interesante que se recogió en este trabajo. La comparación de los patrones de restricción entre las poblaciones iniciales permitía identificar la similaridad de las mismas. Un gran número de bandas comunes en los patrones de restricción del mtDNA de varias cepas implicaba un alto grado de similaridad entre ellas, y, por el contrario, una reducida o nula cantidad de bandas comunes se correlacionaban con una gran disparidad. Analizamos fermentaciones industriales con una flora inicial similar, y otras con floras iniciales dispares. En el primer caso detectamos una clara sustitución de las distintas cepas a lo largo de las fases del proceso de fermentación. Por el contrario, en el segundo caso se detectó una imposición de una de ellas junto con sucesiones menores de algunas de las restantes (10). La conclusión final de estos resultados es que la dinámica poblacional de una fermentación vínica depende de la similaridad de las poblaciones originales.

Fermentaciones vínicas inoculadas con levaduras seleccionadas: la normalización microbiológica

Las condiciones climatológicas durante la época de la vendimia definen en gran medida la composición de la flora levaduriforme inicial del mosto.

En un estudio comparativo entre dos campañas en la D. O. Alicante, una lluviosa y otra seca, pudimos determinar diferencias significativas. En la campaña lluviosa, los recuentos fueron mayores y además se observó un desfase en las curvas de crecimiento (13). Asimismo, las especies levaduriformes presentes en el mosto variaron en porcentaje, de forma que en la campaña lluviosa se produjo un mayor crecimiento de las levaduras oxidativas, perjudicando la imposición de *S. cerevisiae*. Como consecuencia de ello, en la campaña lluviosa se produjo un retardo en la fermentación lo que influyó negativamente en la calidad del vino.

Para solventar este problema se decidió seleccionar una cepa de *S. cerevisiae* procedente de mostos de la zona (11). Esta levadura, denominada T73, viene siendo usada por distintas bodegas durante los últimos tres años. Su adición al mosto implica el mantenimiento de un número importante de levaduras fermentativas desde el inicio de la fermentación. El resultado final es una mayor homogeneidad de las condiciones organolépticas de los vinos producidos, independientemente de las condiciones climatológicas.

El uso de levaduras vínicas seleccionadas en las fermentaciones industriales plantea interrogantes acerca de la dinámica poblacional de estos procesos. ¿Realmente la levadura seleccionada se impone sobre el resto de levaduras presentes en el mosto? En caso de hacerlo, ¿cuándo se impone?

Para responder estas preguntas aplicamos la técnica del patrón de restricción del mtDNA sobre dos fermentaciones industriales similares a las anteriormente mencionadas, en las que se había inoculado la levadura seleccionada T73. Los resultados demostraron claramente la imposición de la cepa inoculada que llegó a constituir del 60 al 90% de la flora final, dependiendo de la fermentación (12). Asimismo, el seguimiento molecular de las fermentaciones nos permitió demostrar que la imposición de la levadura inoculada no se produce hasta 4–5 días después de su inoculación. Ello permite el crecimiento de las levaduras oxidativas durante los primeros días de fermentación, hecho que puede influir sobre el aroma final (12).

Desde el punto de vista microbiológico, el uso de levaduras seleccionadas implica un cambio substancial. De una situación entrópica, la fermentación natural, en la que las distintas poblaciones iniciales de la especie *S. cerevisiae* se suceden unas a otras, se pasa a una nueva situación en la que la levadura inoculada se impone en una proporción elevada. En otras palabras, se produce una normalización microbiológica de la flora, que se asemeja a un cultivo puro. Esto nos permite diseñar experimentos en los que se puedan introducir modificaciones genéticas en la levadura seleccionada, de forma que el nuevo fenotipo confiera características deseables en el producto final. La imposición de la levadura asegura la expresión del nuevo genotipo. En otras palabras, es posible hacer ingeniería genética de la levadura vínica (14).

Transformación genética de levaduras vínicas industriales

La modificación genética de levaduras industriales requiere el desarrollo de sistemas de transformación que permitan introducir en estos microorganismos la información genética modificada *in vitro*. La transformación de cepas de laboratorio de la especie *S. cerevisiae* es un procedimiento sencillo.

Por el contrario, muchas de las cepas industriales de esta especie no incorporan DNA fácilmente. Los sistemas de transformación para *S. cerevisiae* están basados, en su mayoría, en la complementación de mutaciones auxótrofas con el alelo silvestre del gen correspondiente. La aplicación de estos sistemas de selección resulta muy difícil, cuando no imposible, en las cepas industriales. Un ejemplo claro es el de las levaduras vínicas de la D. O. Alicante, y en particular el de T73, que presentan poliploidías para los marcadores auxótrofos más corrientes, como son LEU2 o URA3 (Querol, A. y Ramón, D., resultados sin publicar). Por ello, es necesario recurrir a sistemas de selección basados en la resistencia a drogas o antibióticos.

Muchas levaduras industriales son sensibles a concentraciones muy bajas de cicloheximida. Éste es el caso de la levadura T73, cuyo crecimiento en medio rico se inhibe a dosis superiores a 0,5 mg/ml. La frecuencia de resistencia espontánea es muy baja, inferior a 10^{-9} , de forma que es posible diseñar un sistema de transformación basado en el empleo del plásmido YEpCR21 (que es portador de un alelo mutado del gen CYH2 que confiere resistencia a dicho antibiótico [1]). Se trata de un sistema de transformación de baja eficacia, que tan solo da lugar a 0,5 transformantes por cada μ g de DNA. Los transformantes presentan una estabilidad mitótica entre el 50 y el 90%, pero en experimentos de microvinificación son capaces de producir vino con las mismas características organolépticas de los producidos con la cepa T73 sin transformar (8).

Construcción de levaduras vínicas recombinantes

La posesión de un sistema de transformación permite introducir información manipulada *in vitro* en la levadura vínica. Pero ¿qué se pretende modificar genéticamente? Una de las características más apreciadas en la calidad final de un vino es su aroma. El aroma de un vino es el resultado de la interacción de varios cientos de compuestos volátiles. Entre todos ellos, los monoterpenos son uno de los grupos más importantes. Estos compuestos se encuentran en el mosto en dos subpoblaciones: una formada por formas libres que contribuyen directamente al aroma, y otra constituida por formas no volátiles ligadas por enlaces glicosídicos a restos de paredes celulares. Esta última fracción no contribuye al aroma, pero constituye una fuente potencial del mismo (6).

Recientemente, algunos investigadores han sugerido la posibilidad de utilizar enzimas hidrolíticas que corten estas uniones diglicosídicas para, de esta forma, liberar monoterpenos que incrementen la fracción libre aromática (7). De hecho, varias empresas comercializan preparados enzimáticos que incrementan el aroma.

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo un análisis sobre los componentes de tres de estas preparaciones utilizadas en bodegas españolas (Gallego, M. V., Piñaga, F., Vallés, S., Ramón, D., resultados sin publicar). Los resultados indican que estas preparaciones enzimáticas han sido obtenidas de cultivos de hongos filamentosos, muy probablemente especies de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, y que están fundamentalmente constituidos por celulasas (β -glucosidasas, β -1,4-endoglucanasas) y hemicelulasas (α -L-arabinofuranosidasas, α -L-ramnosidasas, β -1,4-xilanasas). Estos resultados nos indujeron a pensar en la posibilidad de expresar algunos de los genes que codifican estas proteínas en

distintas especies fúngicas. Durante los últimos años se han purificado en nuestro laboratorio distintas celulasas y hemicelulasas fúngicas (3, 4, 16) y se han clonado algunos de los genes que las codifican (5, resultados sin publicar). De entre todos ellos decidimos comenzar por la expresión del gen *egl1* de *Trichoderma longibrachiatum*, que codifica una β -1,4-endoglucanasa.

La expresión de un gen fúngico en una levadura vínica industrial seguida de la secreción de la proteína codificada plantea tres inconvenientes: la existencia de intrones, el control de un promotor funcional durante la fermentación, y la presencia de un péptido señal que permita que la proteína se secrete al mosto.

El primer problema se solventa construyendo el cDNA del gen. El segundo es un poco más complejo, dado que los promotores fúngicos no suelen ser funcionales en levaduras. Por ello es necesario construir fusiones entre el cDNA del gen en cuestión y un promotor levaduriforme constitutivo que se exprese durante todas las fases de la fermentación vínica. El tercer problema puede ser sencillo de resolver si el péptido señal de la proteína fúngica es funcional, o parcialmente funcional, en la levadura vínica. En caso contrario es preciso diseñar proteínas de fusión que contengan péptidos señal reconocidos por la levadura.

Nuestro grupo de trabajo resolvió estos problemas sintetizando el cDNA del gen *egl1* y construyendo una fusión transcripcional entre este cDNA y el promotor de la actina. Esta casete de expresión se introdujo en el plásmido YEpCR21, y con el plásmido resultante se transformó la levadura vínica T73 (8). En cultivos de laboratorio las levaduras recombinantes expresaban el gen de resistencia y secretaban la proteína EGL1 al medio, indicando que la secuencia señal fúngica era funcional en levaduras. En experimentos de microvinificación, la levadura T73 recombinante secretaba EGL1 funcional al mosto durante todos los días de la fermentación. El vino producido presentaba todas las características enológicas del vino producido con la cepa T73 sin transformar pero, a juicio de un panel de catadores expertos, su aroma era más afrutado (8). Un análisis cromatográfico posterior reveló diferencias en las concentraciones de varios compuestos volátiles (8).

Desde el punto de vista industrial, el incremento de aroma afrutado es un carácter muy apreciado por muchos consumidores. Nuestros resultados constituyen no solo la primera prueba de modificación genética de una levadura vínica industrial, sino también el primer ejemplo de la potencialidad de estas técnicas para la mejora de la calidad del vino. Siguiendo procedimientos similares hemos construido transformantes de la cepa T73 que expresan una α -L-arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* y una pectato liasa de *Fusarium solani* f. s. *pisi* (Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., Ramón, D., resultados sin publicar).

Levaduras vínicas recombinantes seguras

El empleo industrial y la comercialización de estas levaduras recombinantes son problemáticos. El plásmido transformante contiene un gen de resistencia a un antibiótico, y secuencias de DNA bacteriano, incluyendo un gen de resistencia a ampicilina. Aparentemente, no hay peligro para el consumidor al ingerir vino producido con estas levaduras. Ni el gen por sí mismo ni la proteína secretada al mosto son

tóxicos, y en cualquier caso, al entrar en el tracto digestivo ambas macromoléculas se destruirían por las enzimas digestivas. Ahora bien, el riesgo consiste en la posibilidad de que la información genética que contienen estos dos genes pueda ser transferida a otros microorganismos, y más concretamente a alguna enterobacteria patógena, creando una cepa resistente a estos antibióticos. La probabilidad de que esto suceda es insignificante, pero no nula (15).

Para solventar este problema hemos diseñado una estrategia basada en la cotransformación de la cepa T73 con un fragmento lineal que contiene la casete de expresión flanqueada por secuencias de la unidad de repetición ribosomal, y el plásmido YEpCR21. Para ello ha sido preciso desarrollar un sistema de transformación biolística (con partículas de tungsteno) para la cepa T73 (Pérez-Ortín, J. E., Ramón, D., resultados sin publicar), ya que ésta es la única alternativa razonable para conseguir cotransformantes en sistemas de baja eficacia de transformación. Por este procedimiento se generan transformantes en los que múltiples copias del fragmento lineal se integran en la unidad de repetición ribosomal, mientras que el plásmido permanece replicándose autónomamente en el núcleo. Posteriormente las células cotransformadas se hacen crecer sin presión selectiva, y dada la estabilidad mitótica del plásmido transformante, algunas de las cepas pierden el plásmido, pero no el DNA integrado. De esta forma se pueden obtener levaduras vínicas recombinantes sin genes de resistencia, ni DNA bacteriano.

Consideraciones finales

Todos los resultados de vinificación con cepas recombinantes se basan en el empleo de microvinificaciones. Los permisos oficiales para poder realizar fermentaciones a escala industrial dependen del desarrollo de la nueva Ley española de Biotecnología.

La construcción de levaduras vínicas recombinantes que no expresen genes de resistencia implica la posibilidad de aplicación a las mismas del criterio de equivalencia sustancial, y, por tanto, la existencia de pocos problemas legales de cara a su posible comercialización a medio plazo en la Unión Europea. Mientras tanto, y a fin de poder incrementar la calidad de los vinos españoles, nuestro grupo trabaja activamente en la sobreproducción de algunos de las enzimas de interés para su adición directa a los caldos.

Se han desarrollado sistemas de transformación para algunos de los hongos productores de estas actividades, como *Aspergillus terreus* (19, 20) y *Trichoderma longibrachiatum* (17). Mediante su uso se han construido transformantes multicopia que sobreproducen alguno de las enzimas de interés facilitando su purificación (17). Además, se han clonado algunos genes fúngicos para emplear sus señales reguladoras en la construcción de vectores de expresión que permitan sobreproducir en condiciones especiales de cultivo dichas proteínas (18). Se dispone, pues, de alternativas de trabajo a corto plazo.

Para concluir, podemos afirmar que la construcción de levaduras vínicas recombinantes es un hecho. A los resultados mencionados hay que sumar la reciente construcción por el grupo del Dr. Barre, en el INRA de Montpellier, de una levadura de "champagne" que expresa el gen que codifica la L(+)-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei* (2). Un nuevo horizonte se abre en la microbiológica

enológica. En él, por primera vez, el límite lo impone la imaginación del investigador.

Agradecimientos

La investigación de nuestro grupo está financiada por un proyecto de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT ALI93-0809). Los autores agradecen a Vinival S. A. el apoyo prestado.

Bibliografía

1. Del Pozo, L., Abarca, D., Claros, M. G., Jiménez, A. (1991). Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Curr. Genet.* **19**, 353–358.
2. Dequin, S., Barre, P. (1994). Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* 1(+)-LDH. *Bio/Technology* **12**, 173–177.
3. Fernández-Espinar, M. T., Piñaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramón, D., Vallés, S. (1994). Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 555–562.
4. Fernández-Espinar, M. T., Piñaga, F., Sanz, P., Ramón, D., Vallés, S. (1993). Purification and characterization of a neutral endoxylanase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **113**, 223–228.
5. González, R., Ramón, D., Pérez-González, J. A. (1992). Cloning, sequence analysis and yeast expression of the *eglI* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 370–375.
6. Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glicosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* **331**, 83–90.
7. Günata, Y. Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Baumes, R. L., Bayonove, C. L. (1990). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: liberation de l'arome a partir des précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vignes Vin* **24**, 133–144.
8. Pérez-González, J. A., González, R., Querol, A., Sendra, J., Ramón, D. (1993). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2801–2806.
9. Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.* **15**, 439–446.
10. Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. (1994). Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **21**, 315–323.
11. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992a). Strains for use as a dry yeast in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *J. Food Sci.* **57**, 183–185.
12. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992b). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2948–2953.
13. Querol, A., Jiménez, M., Huerta, T. (1990). A study on microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grapes harvested in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* **55**, 1603–1606.
14. Ramón, D., Pérez-González, J. A., Barrio, E., González, R., Huerta, T., Sendra, J., Querol, A. (1993). Molecular microbiology of wine production. *Prog. Food Ferment.* **1**, 324–329.

15. Ramón, D., Pérez-González, J. A., González-Candelas, L., González, R., Vallés, S., Piñaga, F., Querol, A., Sánchez, P., Gallego, M. V., Calvo, M. D., Pérez-Ortín, J. E. Construction of safe recombinant wine yeast strains. In Kearns, P. (ed.), Safety Evaluation of Foods. OCDE, Paris, in press.
16. Ramón, D., v. d. Veen, P., Visser, J. (1993). Arabinan degrading enzymes from *Aspergillus nidulans*: induction and purification. FEMS Microbiol. Lett. **113**, 15–22.
17. Sánchez-Torres, P., González, R., Pérez-González, J. A., González-Candelas, L., Ramón, D. (1994). Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use to construct transformants for the *egl1* gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**, 440–446.
18. Ventura, L., González-Candelas, L., Pérez-González, J. A., Ramón, D. (1995). Molecular cloning and transcriptional analysis of the *Aspergillus terreus gal* gene encoding a glucoamylase. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 399–402.
19. Ventura, L., Ramón, D. (1991). Transformation of *Aspergillus terreus* with the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **82**, 189–194.
20. Ventura, L., Ramón, D., Pérez-González, J. A. (1992). Isolation of an *Aspergillus terreus* mutant impaired in arginine biosynthesis and its complementation with the *argB* gene from *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. **99**, 187–192.

Escherichia coli, otras Enterobacteriaceae e indicadores adicionales como marcadores de la calidad microbiológica de los alimentos: ventajas y limitaciones

David A. A. Mossel,* Corry B. Struijk

*Fundación Eijkman, Microbiología Médica de los Alimentos y del Agua de Bebida,
Universidad de Utrecht, Países Bajos*

Recibido 16 marzo 1995/Aceptado 30 marzo 1995

Summary

The 93/43 European Union directive assigns to the food and catering industries the main responsibility for an integrated safety and quality assurance strategy in the food chain. Relying on hazard analysis, followed by design and adoption of control of all critical points and practices (“HACCP”). Hiatus-free compliance with such HACCP-based Codes of Good Practices is to be assessed by monitoring, recording results on process performance charts and gauging such data against experimentally established, attainable and maintainable references ranges (“standards”). Marker microorganisms are a major analytical tool for validating compliance in the sense of the EU directive. They should be expertly chosen amongst microbes usually present in food so that their, whose presence in quantities exceeding predetermined levels point to a lack of microbiological integrity of a food product. This may encompass (i) the potential presence of taxonomically, physiologically and ecologically related pathogens, markers are called index organisms; or else (ii) a lack of process integrity; in this case, markers are termed indicator organisms. The classical index organism was *E. coli*, introduced in the 1980’s to monitor drinking water supplies. It is still used as an appropriate marker to assess the bacteriological safety of raw foods. In the 1920’s the coli-aerogenes (“coliform”) group was adopted as an indicator to validate the adequate processing, i.e. pasteurization of dairy products. Since the 1950’s the entire Enterobacteriaceae taxon is preferred for the latter purpose because it is better defined in determinative sense and includes more organisms of significance. In some food and water supplies, processed for safety, more vigorous

* *Correspondencia:* David A. A. Mossel. Fundación Eijkman. Universidad de Utrecht. Microbiología Médica de los Alimentos y del Agua de Bebida. Apartado de correos 6024. 3503 Utrecht. Países Bajos. Tel.: +31-30-933019. Fax: +31-30-948687.

or more resistant organisms than the Gram-negative rods are reliable supplementary markers. These include *Enterococcus* spp., spores of the *Clostridium* genus, and bacteriophages of *E. coli* and *Bacteroides fragilis* mimicking the fate of enteric viruses under particular ecological conditions. Population surveys conducted by the authors provided ranges for epsilon-factors. Those factors were defined as the proportion between colony forming units (cfu) numbers of index organisms and the pathogenic agent to whose potential occurrence they are expected to point. Epsilon factor values obtained for thermotrophic Enterobacteriaceae in relation to *Salmonella* spp. allow the calculation of the probability that the pathogen has been reliably eliminated by the processing of initially contaminated raw materials, when cfu's of the marker organisms remain below a reference range previously fixed.

Key words: *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae, marker, HACCP

Resumen

La directiva 93/43/UE atribuye a las industrias de alimentos la responsabilidad de un sistema preventivo integrado de garantía de calidad y seguridad en la cadena alimentaria. Indica también que la metodología que debe adoptarse es la del sistema de Análisis de Riesgos e Identificación y Control de Puntos Críticos (ARICPC). El cumplimiento de los Códigos de Buenas Prácticas basados en el sistema ARICPC debe evaluarse mediante la correspondiente monitorización, vigilancia o comprobación de los puntos de control críticos, registrando los resultados y comparándolos con estándares, límites críticos o valores de referencia experimentalmente establecidos, que sean alcanzables y mantenibles. Los microorganismos marcadores constituyen una herramienta analítica importante para validar el cumplimiento de la directiva comunitaria. Han de ser elegidos adecuadamente entre los diversos microorganismos presentes en los alimentos, de forma que su presencia por encima de un determinado nivel indique que el producto ha perdido la condición de alimento de buena calidad. Esta pérdida de calidad puede: (i) llevar consigo la presencia de microorganismos patógenos relacionados fisiológica, taxonómica y ecológicamente con el marcador, en cuyo caso a éste se le llama organismo índice; o (ii) indicar deficiencias en el proceso, situación en la que el marcador recibe el nombre de indicador. El microorganismo índice clásico fue *E. coli* que, introducido en la década de 1980 para el análisis de los suministros de agua potable, se sigue utilizando para evaluar la calidad bacteriológica de los alimentos crudos o frescos. En los años de 1920, se adoptó como indicador el grupo coli-aerogenes ("coliformes") para validar el procesado adecuado, por ejemplo la pasteurización de los productos lácteos. Desde los años de 1950, se prefiere todo el grupo del taxón Enterobacteriaceae para esta última finalidad, porque se trata de un grupo mejor definido en sentido determinativo e incluye más microorganismos significativos. En algunos alimentos y depósitos de agua preservados, otros microorganismos más vigorosos o resistentes que los bacilos Gram-negativos constituyen marcadores fiables suplementarios. Entre ellos, *Enterococcus* spp., esporas del género *Clostridium* y bacteriófagos de *E. coli* y *Bacteroides fragilis*, que imitan el destino de los virus entéricos en condiciones ecológicas determinadas. Estudios prospectivos de poblaciones llevados a cabo por los autores proporcionan rangos de factores épsilon, concepto que se define como la proporción entre los números de microorganismos índice y el agente patógeno cuya

presencia potencial se supone que apuntan. Los valores de factores épsilon obtenidos para las Enterobacteriaceae termotrofas en relación con *Salmonella* spp. permiten calcular la probabilidad de que este patógeno haya sido eliminado por el procesado de una materia prima o ingrediente crudo contaminado, cuando las unidades formadoras de colonias (ufc) del marcador permanecen por debajo de un valor de referencia predeterminado.

Introducción

Papel de la vigilancia analítica en la estrategia del autocontrol. Directiva de higiene 93/43/UE, para garantizar la salubridad microbiológica de los alimentos

Aun en los países más avanzados, las infecciones e intoxicaciones transmitidas por los alimentos continúan presentando graves problemas para la salud (32, 33), así como causando importantes pérdidas económicas (39, 43, 49, 50). Partes importantes de las cosechas de vegetales y carnes frescas se pierden por alteración microbiana (16), provocando desastres financieros y desprestigiando a las empresas.

El control microbiológico de los alimentos surgió en los años 20, de la política seguida en bromatología, que confiaba y confía en el examen químico retrospectivo de muestras de productos finales tomadas en mercados, tiendas y restaurantes. Esta estrategia es eficaz cuando los compuestos indeseables, como plomo, mercurio, desinfectantes, plaguicidas, etc., cumplen dos condiciones (32): (i) los contaminantes se distribuyen de manera homogénea, (ii) las concentraciones no cambian substancialmente con el tiempo de distribución y venta.

Esto no es aplicable a la condición microbiológica de los alimentos. Su pérdida de integridad microbiológica se produce por el llamado doble fallo: contaminación del producto, seguido de un abuso en la temperatura de conservación o transporte (32). Su consecuencia es la multiplicación de los microorganismos contaminantes hasta niveles peligrosos, o la formación de metabolitos tóxicos, o compuestos de olor y sabor desagradables. La situación se agrava por un flujo permanente de la colonización: nunca se mantiene una determinada asociación microbiana en un alimento, las poblaciones mueren o crecen, lo que sí se determina es un dinamismo continuado (29). Por ello, la colonización de los alimentos se muestra (i) esporádica e irregular (lo que determina una fuerte estratificación de la distribución microbiana), y (ii) acusadamente transitoria. Por tanto, resultados negativos de un análisis microbiológico de muestras no garantizan que el lote o partida sea de calidad aceptable.

Aparte de estos atributos específicos de la condición microbiológica de los alimentos, la garantía de su seguridad y calidad se deberá confiar más bien a una prevención prospectiva que a un enfoque retrospectivo. La medicina humana, como la veterinaria, se fundamenta en cuatro principios: anamnesis, diagnóstico, terapia y seguimiento. El mismo sistema ha sido recomendado con insistencia desde los años 30 por Wilson (54), y puesto en práctica en la década de los 70 por Bauman (1) y Goldman (8).

El tan popular término HACCP (1, 24, 36), y su traducción española ARICPC (23), sigue meticulosamente el principio básico de la medicina. Se trata en primer lugar de analizar de manera experta y concienzuda cada uno de los pasos, situaciones y prácticas (desde la llegada de las materias

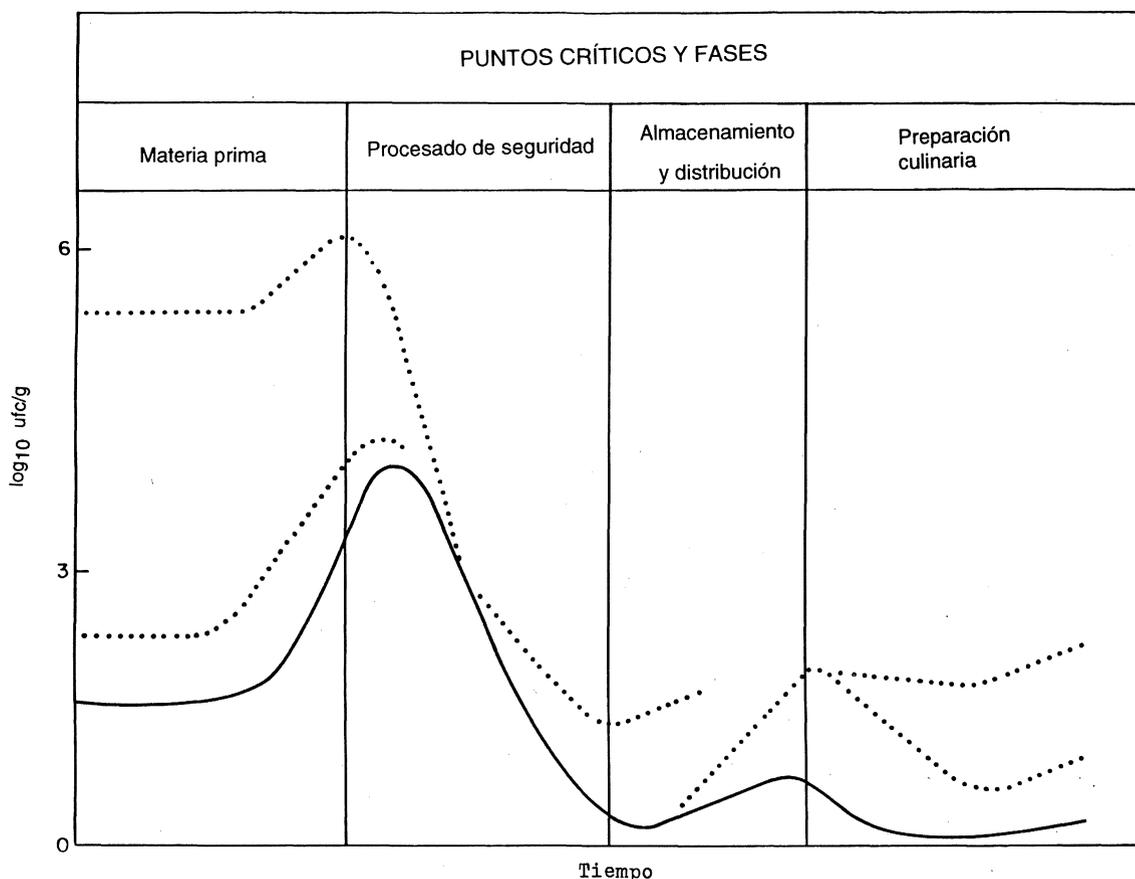


FIG. 1. Perfiles de contaminación y colonización de las líneas de producción.
 Cuando se cumplen las BPF (____).
 Cuando no se cumplen las BPF (.....).

primas hasta la ingesta de los productos preparados) que constituyen un riesgo que amenaza la integridad de los productos. Estos puntos, situaciones o fases concretas se llaman puntos críticos (Fig. 1).

Seguidamente se diseñan, ensayan y codifican escrupulosamente los procedimientos que eliminan los riesgos identificados: las llamadas Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), almacenamiento y distribución. La introducción y aplicación de estas BPF va a dar como resultado un control consistente de todos los puntos críticos previamente identificados. Por eso en la expresión ARICPC (23): la I corresponde a Identificación.

Las autoridades competentes de la Unión Europea han tomado la excelente iniciativa de confiar la implantación del sistema ARICPC a las propias industrias de alimentos (ATCA), sean multinacionales o artesanales (15). Esta decisión es completamente racional en el sentido de la estrategia y la logística:

la responsabilidad sobre el terreno reside en las empresas, durante todas las fases de producción, mientras que los inspectores de la administración visitan cada empresa una vez al mes como máximo y durante unas horas a lo sumo. En el marco de la normativa comunitaria, el papel de los inspectores de la administración será comprobar: (i) las instalaciones y equipo, (ii) la disponibilidad de Códigos de Buenas Prácticas, (iii) la formación del personal, (iv) los registros escritos de las empresas, y (v) que las irregularidades o defectos observados hayan sido corregidos con prontitud. La Tabla 1, resume la estrategia ATCA completa. Este esquema de actuación se sigue también en los Estados Unidos (18, 22, 47) y en Canadá (55).

El papel racional de la vigilancia analítica una vez adoptado el ATCA

Como demuestra la Fig. 2, en contraste con la situación antes del ARICPC → ATCA, después de su aceptación la monitorización o análisis de los productos finales comienza a tener utilidad. Con todo, aún eliminando los fallos sistemáticos, queda siempre el riesgo de faltas accidentales por descuido o ignorancia. En lugar de proseguir como antes, en la estrategia moderna se aprecia que se somete a prueba la conformidad con las BPF, basándose en el ATCA (Tabla 1).

La comprobación racional en el cuadro del ATCA necesita recurrir a procedimientos rápidos, fidedignos, poco complejos y preferentemente aplicables también en las líneas de fabricación y transporte. Muy particularmente, por empleados que han recibido una enseñanza breve encaminada a su

TABLA 1. La trilogía "ATCA": Autocontrol total de la calidad en los alimentos y comidas preparadas (directiva 93/43/UE)

Paso I	Elaboración de una estrategia general de prevención, mediante identificación y control de prácticas y puntos críticos en la fabricación: ARICPC .
Paso II	Implantación en cada caso de un sistema de prevención longitudinal: ILSAM . Dada la presión infectiva del ambiente, es necesario introducir un tratamiento de descontaminación en el sentido de la Tríada de Wilson. Simultáneamente, es preciso informar y, si es necesario, tranquilizar al consumidor, explicándole que ninguno de los procesos aplicados al producto puede dañar la salud.
Paso III	Redacción de un código de buenas prácticas de fabricación, almacenamiento, distribución y preparación culinaria: BPF . Es preferible incluir en las BPF recomendaciones analíticas para: <ul style="list-style-type: none"> - Comprobación de las líneas de producción mediante métodos casi "a tiempo real" (inmediatos). - Monitorización del producto final con métodos rápidos. Estas determinaciones son para rectificar tan rápidamente como se pueda deficiencias en las BPF producidas a pesar de las instrucciones y formación disponibles.

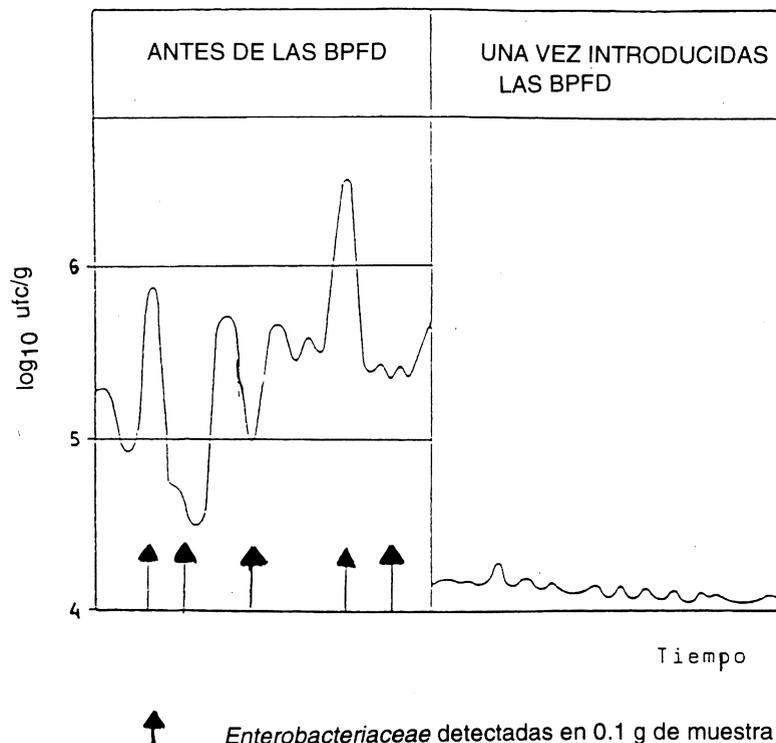


FIG. 2. Efecto de la introducción de los Códigos de Buenas Prácticas (BPF) sobre el nivel y tipo de colonización de los alimentos.

empleo práctico. Lo ideal sería un método instrumental "a tiempo real": instantáneo. El factor limitante en este sentido es que para la detección de microorganismos hace falta un número de células de al menos 10^3 , pero en general muy superior. Consiguientemente, se llevan a cabo de modo sistemático amplias tomas de muestras para el control de superficies y un muestreo en alimentos de por lo menos 25 g. Además, se realizan procedimientos de concentración por centrifugación de sobremesa (30), o más sofisticados, por inmuoadsorción (6, 7), seguida de la extracción de los microorganismos buscados.

En esta estrategia no es posible detectar varios microorganismos patógenos. Además, no es necesario, dado que siguiendo la política ATCA los agentes patógenos serán eliminados de forma metódica en el paso II (Tabla 1). Una estimación de una población microbiana llamada marcadora (26) se presta admirablemente al objetivo. No hay necesidad de distinguir las especies dentro de grupos de microorganismos bien seleccionados en atención a su carácter ecológico (26).

Comprobación de la calidad higiénica de los alimentos por detección de varios grupos de Enterobacteriaceae

Historia

De forma independiente, el médico militar austríaco Schardinger (40) y el profesor Smith, de los Estados Unidos (43), sugirieron examinar las aguas potables en busca de *Escherichia coli*, bacteria predominante en el intestino humano. Detectar *Salmonella typhi* o *Vibrio cholerae* era una empresa muy difícil en aquel tiempo. Así se introdujo en higiene de los alimentos el principio de la detección de un marcador: organismo similar al patógeno buscado, pero más abundante en el alimento o agua sospechosos. La idea se basa en la procedencia fecal y otros caracteres comunes de *E. coli* y de los microorganismos patógenos entéricos. Más tarde, se introdujo la vigilancia de la calidad sanitaria de los moluscos de consumo en crudo por la determinación de la presencia o ausencia (ensayo "P-A") de *E. coli* (3).

En los años 20, se inició el empleo del grupo de bacterias coli-aerogenes en Inglaterra y coliformes en los Estados Unidos, que incluye, además de *E. coli*, muchas otras bacterias fermentadoras de la lactosa, como marcadores de la calidad sanitaria de la leche pasteurizada y de los helados (41, 46). En la taxonomía moderna, el grupo coli-aerogenes comprende *Butiauxella agrestis*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Ent. cloacae*, *Ent. sakazaki*, *Erwinia* spp., *Klebsiella oxitoca*, *K. pneumoniae*, *K. terrigena*, así como *Serratia fonticola* (19). Casi todas las bacterias del grupo coli-aerogenes, con la excepción de *E. coli*, son de origen vegetal y ambiental y no de procedencia fecal. Sin embargo, la práctica de su detección es legítima, basándose en la llamada tríada de Wilson, que se aplica a los alimentos procesados. Se trata de una intervención preventiva que manifiesta tres efectos: (i) una pasteurización adecuada, que eliminaría las pocas Enterobacteriaceae presentes en un alimento de buena calidad crudo; (ii) un envasado correcto, que debería evitar la recontaminación del producto por Enterobacteriaceae y otras bacterias de procedencia ambiental de la fábrica; y (iii) el almacenamiento, distribución y venta de un producto apto para la colonización, a temperaturas menores de 7°C lo que debería impedir el desarrollo de marcadores, dado que estos microorganismos son mesófilos (31).

Finalmente, en los años 50, el grupo completo de las Enterobacteriaceae fue sugerido de modo independiente por Seeliger (41) para los productos lácteos, también procesados, y por Henriksen (10) para el control de las aguas cloradas, partiendo de nuevo de la tríada de Wilson. Según estos autores, no es aconsejable limitar las pruebas de salubridad a las especies lactosas positivas del grupo Enterobacteriaceae, en otras palabras, la selección coli-aerogenes, por cuatro razones: (i) el grupo Enterobacteriaceae está bien definido, mientras que los coliformes no lo están, lo que ocasiona discrepancias en los resultados cuando se aplica la detección de los coliformes en diferentes laboratorios; (ii) un ensayo para las Enterobacteriaceae lactosa positivas únicamente da datos falsamente tranquilizadores cuando predomina en las lactosas negativas, hecho no insólito en algunos productos comercializados, como demuestran los datos de la Tabla 2; (iii) en términos más generales, la sensibilidad de la prueba se reduce, por su limitación a las lactosas positivas, y (iv) es poco lógico excluir las Enterobacteriaceae lactosas negativas, dado que éstas incluyen las enteropatógenas de vital importancia. Extraña que pocos vieran claro, este principio rector, presumiblemente por no tener en cuenta la ecología microbiana de los alimentos.

Avances en la aplicación de las Enterobacteriaceae a partir de los años 1970

La óptica moderna de la microbiología de los alimentos puede permitir progresos importantes en la utilización de estos marcadores. Entre ellos, señalamos los siguientes:

Principios ecológicos. Es imprescindible una distinción clara de los objetivos de las pruebas para evitar que alguien se niegue a utilizar marcadores por falta de definiciones exactas. Los llamados índices avisan de la posible presencia simultánea de microorganismos patógenos ecológicamente relacionados: el test clásico de Schardinger-Smith, ya señalado. Distinta es la aplicación de los indicadores, introducidos para poner de manifiesto deficiencias, en términos de la tríada de Wilson, de la calidad microbiológica de productos procesados, y que fueron implantados como método operatorio simple de comprobación de productos lácteos, y más tarde, ovoproductos pasteurizados, con el fin de la eliminación segura de *Salmonella enteritidis*, etc. (13).

Del origen fecal de *E. coli* se concluye que es el marcador ideal en el análisis de los alimentos crudos. En cambio, si en estos productos se encuentra el grupo coli-aerogenes o las Enterobacteriaceae, no puede inferirse una contaminación de origen fecal ni que han podido llegar microorganismos patógenos de procedencia entérica.

Aspectos analíticos fundamentales. En los años 2000 será posible la detección directa de casi todos los agentes patógenos entéricos (32). No obstante, además de aislar los patógenos concretos, seguirán siendo necesarias pruebas de marcadores por tres razones: (i) la fuerte estratificación de los microorganismos patógenos en la mayoría de alimentos y la falta de fiabilidad de las técnicas de aislamiento en salmonelas, virus y protozoos son la causa del fallo en la detección de patógenos; (ii) la detección de patógenos por

TABLA 2. Niveles de coliformes y Enterobacteriaceae en alimentos perecederos a menudo implicados en brotes de enterobacteriosis transmitidas por los alimentos

Alimento	Nº de muestras examinadas	Unidades formadoras de colonias (ufc) por ml o g	
		Coliformes	Enterobacteriaceae
Helado de frutas	7	1,8	1,8
Helado de vainilla	28	1,1	1,8
Ensalada de carne	49	2,9	3,1
Ensalada de huevo	10	2,1	2,9
Ensalada de pescado y verduras	10	2,5	3,3
Total	104		
Recuentos medios		2,1	2,6

laboratorios no especializados produce resultados de valor problemático, lo cual incita a abandonar esas determinaciones; (iii) aún cuando no se detecte ningún agente patógeno en una muestra, este resultado únicamente tiene significado para la alícuota examinada y no para el lote o partida de alimentos. Por el contrario, si se pone de manifiesto de forma repetida la “ausencia” de marcadores —determinada por métodos operatorios cuidadosamente elaborados y codificados (14, 27, 40, 45)— en una serie de muestras sucesivas, la probabilidad de que tales productos puedan contener una contaminación peligrosa es casi nula ¡Qué tranquilidad, tanto para los consumidores como para las industrias de alimentos!

Evaluación del valor informativo de marcadores en el cuadro de análisis de riesgos. El valor de los índices como testimonio de la presencia de patógenos debe basarse en la utilización de los llamados factores épsilon, determinantes ecológicos que relacionan el número de ufc del marcador y la cuantía de un patógeno concreto (51). Si exceptuamos las salmonelas, existen pocos datos sobre los factores épsilon y llevará mucho tiempo obtener tales valores. Los datos disponibles, como era de esperar, varían ampliamente para los distintos agentes y los diferentes alimentos desde 10^2 a 10^8 . El análisis del riesgo debe intentar la estimación de los valores más altos que pueden encontrarse en el alimento en el momento de su ingestión y, por lo tanto, se recurre al valor mínimo del factor épsilon (“worst case analysis”), es decir del orden de 10^2 .

Los datos obtenidos en la práctica diaria para factores épsilon, ufc de Enterobacteriaceae/ufc de *Salmonella*, se han reunido en la Tabla 3 (51). Estos datos constituyen un refinamiento de los ensayos de Enterobacteriaceae, es decir la diferenciación de las bacterias mesófilas y psicrotrofas frente a las termotrofas (28). Ni que decir tiene que una relación entre ufc de *Salmonella* y ufc de Enterobacteriaceae se observa ante todo para los géneros termotrofos, dado que las salmonelas crecen bien a temperaturas de 42°C y superiores (56). Los datos reunidos en la Tabla 4 ilustran el aumento de las ufc en Enterobacteriaceae psicrotrofas cuando se conserva la carne fresca, mientras que los patógenos termotrofos se estabilizan (56). Los resultados obtenidos por Cox, que se recogen en la Tabla 5, respaldan la posibilidad de aplicar grupos en Enterobacteriaceae bien seleccionados como índices de la condición paucibacteriana del ambiente de la industria alimentaria —fuente primaria de contaminación de los productos finales (31)—. Los valores de épsilon para varios productos de origen animal reflejan además el estado de las contaminaciones, dependiendo del tipo de producto crudo: los factores épsilon a 42°C son los más altos, es decir la contaminación por salmonelas los más bajos, para carne de vacuno y mínimos para pollo, con valores medios para cerdo y huevos.

Ensayo simple, evitando contaminación de las industrias. La detección de Enterobacteriaceae como indicadores ha sido introducida en muchas industrias para señalar, en la fase temprana, un índice del nivel aceptable de contaminación (Fig. 3) (17, 35, 37). Este progreso tropezó, sin embargo, con el problema de que el enriquecimiento de las Enterobacteriaceae puede llevar concentraciones de enteropatógenos, lo que preocupa a las industrias de alimentos —a pesar de las medidas de asepsia observadas por los analistas—. Para resolver este problema, introdujimos en los años 60 un ensayo basado en el cultivo de una suspensión revitalizada del producto en frascos cerrados con tapón de rosca equipado con una membrana flexible similar a la utilizada para transfusiones. Después de un tratamiento de revitalización de unas dos horas en caldo cerebro corazón (52) se trasvasa en estos frascos con el medio

TABLA 3. Factores ϵ_s en diversos tipos de alimentos

log ₁₀ ufc Enterobacteriaceae			NMP, g ⁻¹ <i>Salmonella</i>	log ₁₀ factor ϵ_s		
30°C	37°C	42°C		30°C	37°C	42°C
Carne cruda picada de vacuno ^a						
5,7	3,9	3,1	0,04	7,1	5,3	4,5
5,4	4,6	4,2	0,23	7,8	6,6	4,9
5,8	5,6	4,3	0,09	7,2	7,1	5,3
6,5	6,5	4,7	0,23	7,1	7,1	5,3
6,7	6,1	4,8	0,23	7,8	6,7	5,4
Media				7,4	6,6	5,1
Carne cruda picada de cerdo ^a						
3,6	3,2	2,7	0,04	5,0	4,6	4,1
4,2	4,2	3,2	0,09	5,3	5,3	4,1
5,3	4,4	3,4	0,23	5,9	5,0	4,1
6,2	5,9	4,3	0,23	6,8	6,5	5,3
Media				5,8	5,4	4,4
Yema de huevo en polvo antes del procesado en cámara caliente						
3,9	3,9	3,3	0,09	4,6	4,1	3,6
3,6	3,6	3,5	0,09	4,5	4,0	4,5
4,5	4,4	3,9	0,23	5,5	5,4	5,0
Media				4,9	4,5	4,4
Carne de pollo cruda						
3,0	2,0	2,0	0,23	3,6	2,6	2,6
3,0	3,0	2,3	0,09	4,4	4,4	3,4
4,7	4,0	2,8	0,04	5,8	5,1	4,2
4,7	4,0	2,8	0,09	5,7	5,0	3,8
4,3	3,3	2,9	0,23	4,9	3,9	3,5
6,1	5,0	3,0	0,21	6,7	5,7	3,7
4,7	4,4	4,4	0,23	5,3	5,0	5,0
Media				5,2	4,5	3,7

^aSe examinaron alícuotas de 10, 1 y 0,1 g por triplicado por el procedimiento de enriquecimiento a 43°C de Vassiliadis.

Mac Conkey púrpura a base de glucosa, templado a 30°C. Si se encuentran Enterobacteriaceae en la muestra, normalmente se produce gas, que se manifiesta por hinchamiento de la membrana, o por lo menos acidificación del medio, lo que se deduce por el cambio de color hasta el amarillo (4). Después de unas 18 horas de incubación, se descartan tanto los frascos positivos como los negativos por pasteurización durante 30 minutos en un baño María con agua hirviendo.

Necesidad de otros marcadores en ciertas circunstancias

Frente a ciertos factores adversos, extrínsecos, intrínsecos e implícitos (20), la resistencia de las Enterobacteriaceae es, a menudo inferior a la de los patógenos más resistentes. Esto se aplica a ciertas bacterias Gram-positivas (12), pero ante todo a los virus (9). El papel de los *Enterococcus* spp., representado en la Fig. 4, ha sido bien establecido (25). Pero, aún estos marcadores resistentes son, a menudo, en

TABLA 4. Efecto de la conservación en refrigeración y del picado de la carne fresca en las diferencias en los recuentos de colonias de Enterobacteriaceae a 37°C y a 42°C

	log ₁₀ ufc Ent 37°C
	log ₁₀ ufc Ent 42°C
En el matadero	
Carne de canal (n = 10)	0,1 ± 0,0
En la venta al por menor	
Cortes tamaño consumidor (n = 10)	0,6 ± 0,2
Carne picada (n = 10)	1,8 ± 0,2

TABLA 5. Distribución de las Enterobacteriaceae y de *Salmonella* spp. en muestras ambientales tomadas en una fábrica de leche en polvo^a

Enterobacteriaceae (ufc g ⁻¹)	<i>Salmonella</i> + vasesen 50g, %
≤2	0,5
2-100	0,9
100-500	8,7
>500	9,0

^aDatos de Cox (1978), citado por Stadhouders et al. (44).

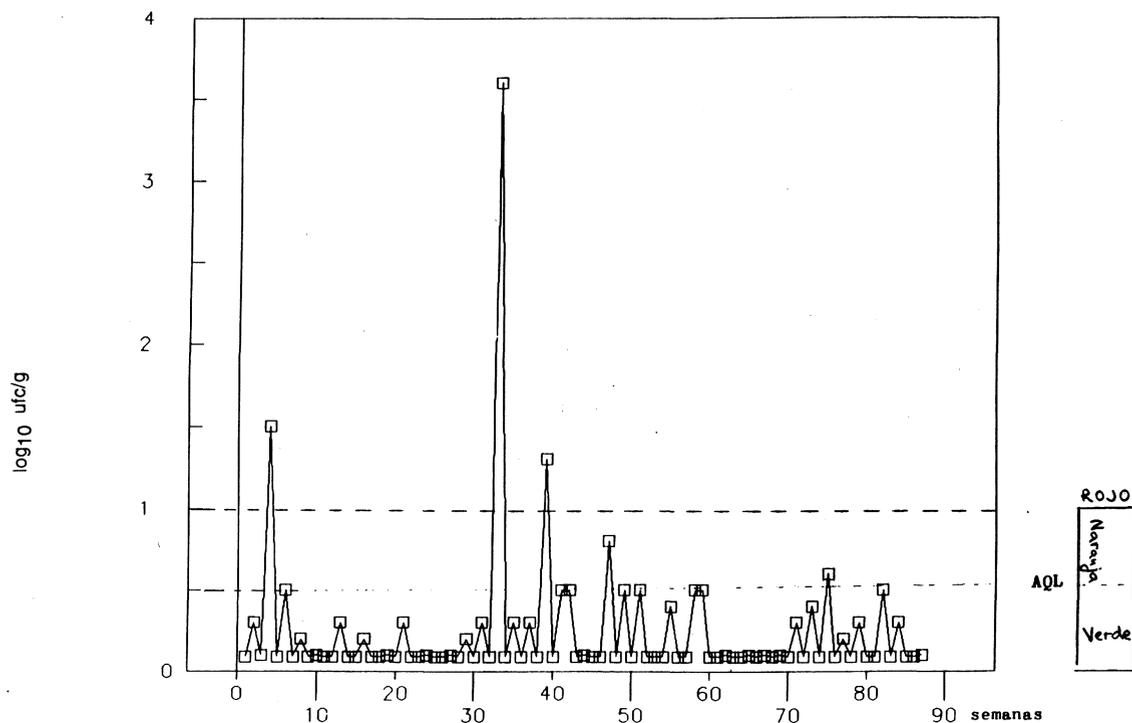


FIG. 3. Transcurso de la contaminación de un alimento procesado por Enterbacteriaceae durante 2 años. La columna de la derecha representa el concepto semáforo con sus tres zonas: verde = inferior al nivel aceptable (AQL); naranja = zona entre AQL y "alert level"; rojo = zona de alarma.

ciertos biotopos, más frágiles que determinados virus entéricos (9). Para resolver este problema, se introdujo la aplicación de bacteriófagos particulares: de *E. coli* (2, 34) y de *Bacteroides fragilis* (20), seleccionados con apoyo cuidadoso de la ecología microbiana.

Un último marcador clásico es el grupo de esporas de *Clostridium* spp. Nuevamente, si se elige prestando atención a parámetros ecológicos, el grupo total puede dar buenos resultados en la evaluación de la calidad higiénica de aguas, mariscos y otros productos (5, 21). Con ayuda de los factores épsilon, puede estimarse, por ejemplo, la probabilidad de presencia, y por lo tanto, la ingestión, de especies patógenas del género (53).

Agradecimientos

Los autores desean expresar sus sentimientos de profunda gratitud al Prof. B. Moreno, Catedrático de la Facultad de Veterinaria de León, por su apoyo valioso en la revisión del texto de esta ponencia.

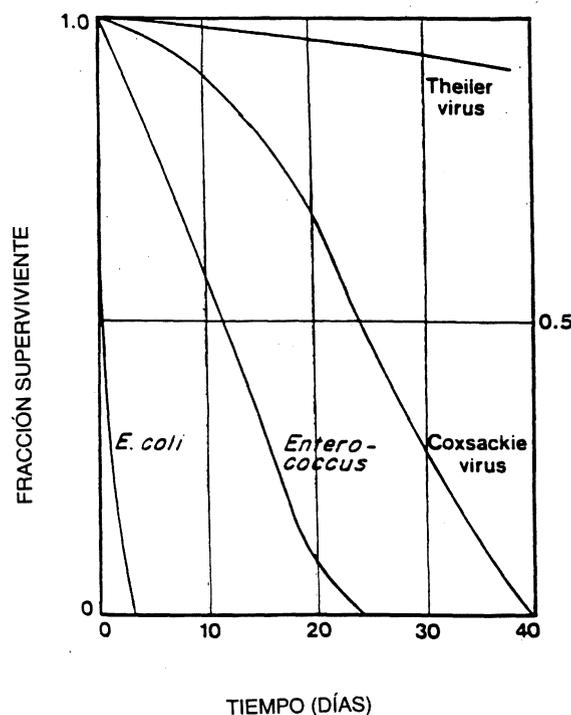


FIG. 4. Persistencia de algunos patógenos comparada con la de los marcadores convencionales

Bibliografía

1. Bauman, H. E. (1974). The HACCP concept and microbiological hazard categories. *Food Technol.* **28**, 30–34.
2. Borrego, J. J., Cornax, R., Moriñigo, M. A. et al. (1989). Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Water Res.* **24**, 111–116.
3. Clegg, L. F. L., Sherwood, H. P. (1947). The bacteriological examination of molluscan shellfish. *J. Hygiene* **45**, 504–521.
4. Corstiaensen, G. P., Eggenkamp, A. E., Mossel, D. A. A. (1984). Comparison of two methods for assessing the bacteriological conditions of the water supply in slaughter houses. *Internat. J. Food Microbiol.* **1**, 89–98.
5. De Mesquita, M. M. F., Evison, L. M., West, P. A. (1991). Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depuration conditions. *J. Applied Bacteriol.* **70**, 495–501.
6. Fluit, A. C., Torensma, R., Visser, M. J. C. (1993). Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1289–1293.
7. Fluit, A. C., Widjoatmodjo, M. N., Box, A. T. A. et al. (1993). Rapid detection of salmonellae in poultry with magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1342–1346.
8. Goldman, C. L. (1973). Microbiological tests used in a quality control program. *Cosmetics and Perfumery* **88**, 39–40.

9. Grabow, W. O. K. (1986). Indicator systems for assessment of the virological safety of treated drinking water. *Water Sci. Technol.* **18**, 159–165.
10. Henriksen, S. D. (1955). A study of the causes of discordant results of the presumptive and completed coliform test on Norwegian waters. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **36**, 87–95.
11. Hui, Y. H., Gocham, J. R., Murrell, K. D., Cliver, D. O. (ed.) (1994). *Foodborne Disease Handbook*. vol. 1–3. Marcel Dekker, New York.
12. Ingham, S. C., Tautorius, C. L. (1991). Survival of *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and indicator bacteria on cooked uncured turkey loaf stored under vacuum at 3 °C. *J. Food Safety* **11**, 285–292.
13. Ingram, M. (1977). The significance of the index and indicator organisms in foods. Presented at the tenth international Symposium of the IUMS Committee on Food Microbiology and Hygiene, held at Szczecin, Poland. September 5–10, 1977. Unpublished, because the author died suddenly 15th November 1977. For an account of this paper, see Mossel, D. A. A. (). Coliform test for cheese and other foods. *Lancet* **II**, 1425.
14. In't Veld, P. H., Van Dommelen, J. A. (1994). Enumeration of *Escherichia coli* in reference materials for food microbiology. BCR/Food Trial 6. Report Nat. Int. Publ. Health Environm.
15. Jacob, M. (1994). EC food hygiene directive (93/43/EEC): recent developments. *Internat. Food Safety News* **3**, 80; **3**, 116.
16. Käferstein, F. K., Moy, G. G. (1993). Public health aspects of food irradiation. *J. Publ. Health Policy* **14**, 149–163.
17. Kodikara, C. P., Crew, H. H., Stewart, G. S. A. B. (1991). Near on-line detection of enteric bacteria using lux recombinant bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**, 261–266.
18. Kvenberg, J. E. (1994). The new FDA Food Code. *Dairy Food Environm. Sanitation* **14**, 615.
19. Leclerc, H., Gavin, F., Izard D., Trinel, P. A. (1983). Les coliformes: mythe et réalité. *Colloques INSERM, Paris*, **114**, 597–617.
20. Lucena, F., Lasobras, J., McIntosh, D. et al. (1994). Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Applied Environ. Microbiol.* **60**, 2272–2277.
21. Martínez-Manzanares, E., Egea, F., Castro D. et al. (1991). Accumulation and depuration of pathogenic and indicator microorganisms by the bivalve mollusc, *Chamelea gallina* L., under controlled laboratory conditions. *J. Food Protection* **54**, 612–618.
22. McNamara, A. M. (1994). The microbiology division's perspective on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni/coli*. *Dairy Food Environ. Sanitation* **14**, 259–261.
23. Moreno García, B. (1993). Aplicación del sistema de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC) en la restauración colectiva. *Alimentaria, Madrid*, **3**, 17–23.
24. Mortimore, S. E., Wallace, C. (1994). HACCP. Chapman & Hall, London.
25. Mossel, D. A. A., Bijker, P. G. H., Eelderink, I. (1978). Streptococci of Lancefield groups A, B and D and those of buccal origin in foods: their Public Health significance, monitoring and control. *In* Skinner, F. A., Quesnel, L. B. (ed.), *Streptococci*, pp. 315–334. Academic Press, London.
26. Mossel, D. A. A. (1982). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antoine van Leeuwenhoek* **48**, 609–611.
27. Mossel, D. A. A., van Netten, P. (1984). Harmful effects of selective media on stressed microorganisms: Nature and remedies. *In* Andrew, M. H. E., Russell, A. D. (ed.), *The Revival of Injured Microbes*, pp. 329–369. Academic Press, London.
28. Mossel, D. A. A., van der Zee, H., Hardon, A. P., van Netten, P. (1986). The enumeration of thermotrophic types amongst the Enterobacteriaceae colonizing perishable foods. *J. Applied Bacteriol.* **60**, 289–295.
29. Mossel, D. A. A., Struijk, C. B. (1992). The contribution of microbial ecology management and monitoring of the safety, quality and acceptability (SQA) of foods. *In* Board, R. G., Jones, D., Kroll, R. G., Pettipher, G. L. (ed.), *Ecosystems Microbes: Food*, pp. 18–118. Blackwell, Oxford.

30. Mossel, D. A. A., Struijk, C. B., Jaisli, F. K. et al. (1992). Use of 24 hours centrifugation/plating technique in a survey on the medical-microbiological condition of raw ham and hard raw-milk cheese originating from authenticated GMDP manufacture. *Arch. Lebensm. Hyg.* **43**, 51–54.
31. Mossel, D. A. A., Struijk, C. B. (1993). Food-borne illness 1993: updating Wilson's triad. *Lancet* **342**, 1254.
32. Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., Baird, R. M. (1995). *Essentials of the microbiology of foods*. Wiley, Chichester, in press.
33. Mossel, D. A. A., Jansen, J. T., Struijk, C. B. (1995). Taking the professional liability for the assurance of the microbiological safety of foods and catered meals seriously: preparing for the next millenium by adoption and elaboration of the autonomous total quality strategy. *Proc. 4th International Symposium on Microbiology of Food and Cosmetics in Europe*, Ispra, Italy, pp. 9–29. European Common. Market Research Centre.
34. Payment, P., Franco, E. (1993). *Clostridium* prefringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2418–2424.
35. Pettitt, S. B. (1989). A conductance screen for Enterobacteriaceae in foods. *In* Stannard, C. J., Pettitt, S. B., Skinner, F. A. (ed.), *Rapid Microbiological Methods for Foods, Beverages and Pharmaceuticals*, pp. 131–141. Blackwell, Oxford.
36. Pierson, M. D., Corlett, D. A. (ed.) (1992). *HACCP. Principles and Applications*. Van Nostrand, Florence, Kentucky.
37. Pike, E. B., Ridgway, J. W. (1985). The microbiological implications in European Community Directives related to the water cycle. *In* White, W. R., Passmore, S. M. (ed), *Microbial Aspects of Water Management*, pp. 1059–1268. Blackwell, Oxford.
38. Roberts, T., Ravenswaaij, E. (1989). The economics of safeguarding the U. S. food supply. *Agric. Inform. Bull.* **566**, 1–8.
39. Roberts, T., Foegeding, P. M. (1991). Risk assessment for estimating the economic costs of foodborne disease caused by microorganisms. *In* Caswell, J. A. (ed.), *Economics of Food Safety*, pp. 103–129. Elsevier, Barking, United Kingdom.
40. Schardinger, F. (1982). Ueber das Vorkommen Gährung erregender Spaltipilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurtheilung desselbem. *Wien. Klin. Wschr.* **5**, 403–405; 421–423.
41. Seeliger, H. P. R. (1952). Die Keimzahlbestimmung und Differenzierung coliformer Bakterien in Milch und Speiseeis. *Milchwissenschaft* **7**, 389–394.
42. Smith, T. (1985). Notes on *Bacillus communis* and related forms, together with some suggestions concerning the bacteriological examination of drinking water. *Amer. J. Med. Sci.* **110**, 283–302.
43. Sockett, P. (1993). Social and economic aspects of food-borne disease. *Food Policy* **18**, 110–119.
44. Standhouders, J., Hup, G., Hassing, F. (1982). The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the bacteriology of spray-dried milk powder. *Netherl. Milk Dairy J.* **36**, 231–260.
45. Struijk, C. B., Mossel, D. A. A. (1995). Analytical essentials of reliable —where possible real time— monitoring of production and market samples for compliance with Plumb's autonomous total quality assurance strategy. *Proc. 4th International Symposium on Microbiology of Food and Cosmetics in Europe*, Ispra, Italy. European Common Market Research Centre.
46. Swenarton, J. C. (1927). Can *B. coli* be used as an index of the proper pasteurization of milk? *J. Bacteriol.* **13**, 419–429.
47. Taylor, M. R. (1994). FDA's plans for food safety and HACCP-institutionalizing a phylosophy of prevention. *Dairy Food Environm. Sanitation* **14**, 256–258.
48. Tillett, H. E., Lighfoot, N. F., Eaton, S. (1993). External quality assessment in water microbiology: statistical analysis of performance. *J. Applied Bacteriol.* **74**, 497–502.
49. Todd, E. C. D. (1987). Impact of spoilage of foodborne diseases on national and international economies. *Internat. J. Food Microbiol.* **4**, 83–100.
50. Todd, E. C. D. (1987). Legal liability and its economic impact on the food industry. *J. Food Protection* **50**, 1048–1057.

51. van de Moosdijk, A., Mossel, D. A. A., van Netten, P. (1989). Use of the ecology determinant (epsilon) factor in establishing relationships between thermotrophic Enterobacteriaceae and *Salmonella* species. *J. Applied Bacteriol.* **67**, p. xviii.
52. van Doorne, H., Claushuis, E. P. M. (1979). The quantitative determination in pharmaceutical preparations. *Internat. J. Pharmaceutics* **4**, 119–125.
53. Weenk, G. H., van den Brink, J. A., Struijk, C. B., Mossel, D. A. A. (1995). Modified methods for the enumeration of spores of mesophilic *Clostridium* species in dried foods. *Internat. J. Food Microbiol.* **23**, in press.
54. Wilson, G. S. (1993). The necessity for a safe milk-supply. *Lancet* **II**, 829–832.
55. Wray, R. (1994). FSEP-Agriculture and Agri-Food Canada approach to HACCP for food processing. *Dairy Food Environ. Sanitation* **14**, 625.
56. Zeitoun, A. A. M., Debevere, J. M., Mossel D. A. A. (1994). Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere. *Food Microbiol.* **11**, 169–176.

Escherichia coli enteroinvasiva.
Patogenia y epidemiología

Guillem Prats,* Teresa Llovet

*Departament de Genètica i de Microbiologia, Unitat docent de Sant Pau,
Universitat Autònoma de Barcelona*

Recibido 15 enero 1995/Aceptado 5 febrero 1995

Summary

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) is an intestinal pathogen causing enteritis, with a similar pathogenic mechanism to that of *Shigella*, which causes an epithelial invasion of the large bowel leading to inflammation and ulceration of the mucosa. The patients often develop the symptoms of bacillary dysentery. The EIEC strains are atypical in their biochemical reactions and may ferment lactose late or not at all, are lysine decarboxilase negative, and non motile. In addition, most EIEC strains express somatic antigens which are either strongly related or identical to *Shigella* antigens. EIEC invasion is mediated by a large plasmid (140 MDa) coding for the production of several outer membrane proteins involved in invasiveness. These strains have been isolated with some regularity in South America, the Extreme Orient, and Eastern Europe. In Spain the incidence of enteroinvasive *E. coli* is extraordinarily low (0.2%), the serogroup O124 being the most frequently isolated. EIEC enteritis has been associated to sporadic cases occurring in travellers. Occasional outbreaks related to ingestion of contaminated water or food and person to person have been reported.

Key words: *Escherichia coli*, enteroinvasive, food, epidemiology

Resumen

Las cepas enteroinvasivas de *Escherichia coli* (ECEI) constituyen un grupo de microorganismos que produce enteritis por un mecanismo semejante, si no idéntico, al de *Shigella*, ya que invaden las

* *Correspondencia:* Guillem Prats. Servei de Microbiologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Av. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. Tel.: 93-2919071. Fax: 93-2919070.

células del intestino grueso dando lugar a diarrea sanguinolenta, característica de la disentería bacilar. ECEI presentan características bioquímicas muy parecidas a las de *Shigella*, son poco sacarolíticas y carecen de lisina descarboxilasa. Son, además, inmóviles. Por otra parte, algunos antígenos somáticos de los serogrupos invasores muestran reacciones cruzadas con los antígenos de *Shigella* y, en algunos casos, existe absoluta identidad. La patogenicidad de estos microorganismos está relacionada con la presencia de un plásmido de alto peso molecular (140 MDa), que codifica proteínas de la membrana externa, que favorecen la endocitosis de las bacterias. La incidencia de ECEI es significativa en América del sur, Extremo Oriente y Europa oriental donde se aíslan con relativa frecuencia. Su incidencia en España es extraordinariamente baja (0,2%), siendo el serogrupo O124 el que se aísla con más frecuencia. Su distribución epidemiológica no se conoce bien, aunque se ha asociado a casos esporádicos autóctonos, tanto en niños como en adultos, a diarrea del viajero y a brotes epidémicos producidos generalmente al ingerir agua o alimentos contaminados.

Introducción

Aunque *Escherichia coli* forma parte de la flora normal del intestino de los animales homotermos, algunas cepas son patógenas y pueden causar enteritis al hombre y a los animales. En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre *E. coli*, orientados a diferenciar las cepas comensales de las patógenas y a precisar los mecanismos de patogenicidad.

Actualmente las cepas de *E. coli* capaces de producir enteritis se engloban en cuatro grupos, que son: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y un grupo cuya patogenicidad se correlaciona con la producción de alteraciones sobre las microvellosidades del intestino (12, 13).

Estos grupos de *E. coli* poseen características propias que los diferencian entre sí, tanto respecto a los factores de virulencia específicos que contribuyen a su patogenicidad, como a los antígenos de superficie, estableciéndose un cierto grado de correlación de los patogrupos con los serogrupos y más estrechamente con los serotipos.

Se ha observado que en un grupo con el mismo mecanismo patogénico, unas cepas son patógenas para el hombre y otras de otros serotipos diferentes lo son para los animales. No se conoce con exactitud, aparte de las diferencias en la adhesión, las razones de este hecho (22). De todas formas, las cepas con mecanismo enteroinvasivo aisladas sólo producen patología en el hombre.

Escherichia coli enteroinvasiva

Las cepas enteroinvasivas de *E. coli* constituyen un grupo causante de enteritis por un mecanismo invasor semejante, si no idéntico, al de *Shigella*.

En 1947 Ewing y Gravattii (7) publicaron el aislamiento de un bacilo Gram-negativo, al que denominaron “paracolón bacillus”, con estructura antigénica idéntica a *S. dysenteriae* 3, en pacientes con enteritis con perfil clínico de disentería bacilar y de manipuladores de alimentos, que posteriormente fue catalogado como *E. coli* del serogrupo O124.

Piechaud y Szturm-Rubinstein describen posteriormente algunas cepas denominadas "intermedias" o parashigellas, con caracteres bioquímicos intermedios entre *E. coli* y *Shigella*, aisladas de pacientes con diarrea. Las semejanzas fenotípicas entre ambos géneros son conocidas desde hace tiempo. Los trabajos de Brenner han permitido mostrar la homología genética entre ambos, de modo que constituyen, desde este punto de vista, un grupo homogéneo. Se mantienen los dos géneros por razones prácticas de bacteriología médica.

Ogawa et al., en 1968 (21), establecieron que algunas cepas de *E. coli* tenían capacidad de invadir el intestino grueso y causar disentería bacilar similar a la producida por *Shigella dysenteriae*. Dupont et al., en 1971 (4), estudiaron el mecanismo patogénico de cepas de *E. coli* de los serogrupos O124, O143 y O144 al ser administradas a cobayas y conejos, y comprobaron que estos serotipos penetraban en las células epiteliales del intestino grueso y causaban ulceraciones, sin que en dicho proceso participasen toxinas exocelulares. Además, al realizar experiencias con voluntarios humanos, comprobaron que estas cepas se multiplicaban e invadían las células del intestino grueso, dando lugar a diarrea acuosa, con moco y sangre, acompañada, a veces, de tenesmo rectal, dolor cólico abdominal, fiebre y afectación del estado general. Hasta el momento, se han descrito cepas de ECEI en los siguientes serogrupos: O28ac, O29, O42, O112ac, O121, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167, y un nuevo serotipo, denominado provisionalmente MG (5, 12, 17, 25).

Las ECEI presentan características bioquímicas y antigénicas muy parecidas a *Shigella*, ya que generalmente no fermentan o producen una fermentación tardía de la lactosa, no descarboxilan la lisina y son inmóviles. Además, algunos de los antígenos somáticos de estos serogrupos muestran reacciones cruzadas con los antígenos de *Shigella*, y en algunos casos existe absoluta identidad. Así, los antígenos O28ac, O112ac, O124, O143 y O144 de *E. coli* son idénticos o muy similares a los de *S. boydii* 13, *S. dysenteriae* 2, *S. dysenteriae* 3, *S. boydii* 8 y *S. dysenteriae* 10, respectivamente. Por todo ello, los ECEI se pueden confundir fácilmente con cepas de *Shigella*, si no se realizan las pruebas adecuadas para su identificación, fundamentalmente acetato, mucato y citrato de Christensen (5).

Para evaluar la capacidad enteroinvasiva de *E. coli*, se han desarrollado técnicas in vitro utilizando células HeLa (18) y HEp-2 (3), así como técnicas de hibridación del DNA, empleando secuencias de los genes relacionados con la invasión (8). No obstante, la prueba de referencia para la determinación de la enteroinvasividad de *E. coli* y *Shigella* es aún la desarrollada por Serény en 1955 (27), que estudia la capacidad de las cepas de producir una queratoconjuntivitis en el ojo de la cobaya.

La complejidad de estas pruebas (Serény, HeLa) para detectar la capacidad enteroinvasiva de *E. coli* ha conducido al estudio de caracteres fenotípicos propios de las cepas que permitan seleccionarlas con facilidad. Algunos de los trabajos a este respecto son los publicados por Toledo y Trabulsi en 1980 y 1983 (29, 31). Estos autores encontraron 137 cepas ECEI positivas en la prueba de Serény, de un total de 325 cepas de *E. coli* que no descarboxilaban la lisina. Además, examinaron 1100 cepas de *E. coli* que descarboxilaban la lisina, comprobando que ninguna era capaz de dar una prueba de Serény positiva. Un antisuero polivalente, que incluía en su composición anticuerpos contra los grupos más frecuentes de ECEI, aglutinaba las 137 cepas que resultaron positivas en la prueba de Serény, mientras que dicho antisuero no reaccionó con 695 de las 710 cepas no enteroinvasivas. Según estos resultados, las ECEI podrían ser detectadas mediante la aglutinación de las cepas carentes de actividad lisina descarboxilasa.

Patogenicidad

Al entrar la ECEI en contacto con el epitelio intestinal, destruye el borde ciliado y penetra en las células. El tipo de diarrea que produce es sanguinolenta, febril, y afecta por igual a niños y a adultos. En la mayoría de los casos la diarrea cede a los 5–7 días, aunque puede durar 2 o más semanas.

Sansonetti et al., demostraron que la capacidad invasiva de *E. coli* está relacionada con la presencia de un plásmido no conjugativo de peso molecular elevado. Este plásmido de virulencia, que en las ECEI es de 140 MDa, muestra puntos de corte para varias endonucleasas de restricción, diferentes a los observados en los plásmidos de virulencia de las distintas cepas de *Shigella*. Por el contrario, cuando se utilizan técnicas de hibridación, se observa que el DNA de ambos plásmidos posee amplias zonas de homología (1). Esta homología sugiere que probablemente hayan derivado de una molécula común y que su evolución ha conducido a modificaciones limitadas que afectan las pautas de restricción, aunque se ha conservado la homología global. Hale et al. (9), tras lograr la expresión de los plásmidos de virulencia de las ECEI en sistemas de minicélulas, llegaron a la conclusión de que codifican proteínas de la membrana externa que les permite interactuar con los receptores de las células intestinales.

Posteriormente, se ha demostrado que los genes *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* e *ipaA*, localizados en el plásmido de virulencia, juegan un papel muy importante en el proceso de invasividad de estas cepas, aunque su función exacta no está clara. Probablemente la ejercen a través de la codificación de las proteínas de membrana externa (2). La pérdida del plásmido, o la delección en estos genes, suprime la invasividad y, por tanto, las transforma en no virulentas. Recientemente se ha identificado un nuevo gen, *ipaH*, con copias localizadas tanto en el plásmido de virulencia como en el cromosoma, que no forma parte del grupo *ipaBCAD*. Este gen no está implicado en la invasividad de las cepas, pero es específico de ECEI y *Shigella*, por lo que permite la identificación de estos microorganismos. El estudio del gen *ipaH* y los genes *ipaBCAD* puede utilizarse para la identificación y determinación de la virulencia de ECEI y *Shigella* (28).

La patogenicidad también depende de la presencia del antígeno somático (O), por lo que la virulencia de las cepas ECEI es de dependencia poligénica.

Aprovechando que el plásmido de virulencia codifica proteínas que se localizan en la membrana externa, que no se hallan en cepas no invasivas, Pal et al., pusieron a punto una prueba de enzimoimmunoanálisis para la detección de este antígeno proteico. Es una prueba sencilla que evita la necesidad de los experimentos de infección sobre líneas celulares y cobayas (23).

Actualmente, se han descrito técnicas de PCR para la detección de estas cepas (28).

Epidemiología

La incidencia de ECEI como agente productor de enteritis es relativamente baja y, como se ha dicho, afecta por igual a niños y a adultos. En los estudios sobre la presencia de ECEI en casos esporádicos de diarrea se ha observado su baja incidencia. Constituyen excepción América del sur, Extremo Oriente y Europa oriental, donde se aislan con relativa frecuencia, alcanzando tasas de incidencia que oscilan entre el 3% y el 20% (30, 32). En España, Pumarola et al. (24), en un estudio retrospectivo donde se analizaron

843 cepas de *E. coli* de pacientes con diarrea, detectaron una incidencia de ECEI del 0,2%, correspondiente al serogrupo O124. Mirelis et al. (19) describieron un caso esporádico causado por el serogrupo O28ac.

ECEI tiene como único reservorio al hombre, por tanto la transmisión es directa o a través de alimentos o agua contaminada (22). Su distribución epidemiológica no se conoce muy bien y, aunque se ha asociado a casos esporádicos como consecuencia de diarrea del viajero, también se han detectado brotes epidémicos producidos al ingerir agua o alimentos contaminados. Tal es el caso de los brotes ocurridos en EE. UU., por un queso de tipo Camembert contaminado por *E. coli* O124 (14), en Hungría, por agua contaminada de la que se aisló *E. coli* O124 (11), en Checoslovaquia, en una pensión, por *E. coli* O164 (20), y en Australia en una guardería (26). Así mismo, Harris et al. (10), en 1981, han descrito brotes causados por ECEI por transmisión directa, producidos por *E. coli* O124 en una escuela para deficientes mentales, lo cual confirma la capacidad de transmisión directa, de la que se había dudado al sospecharse una elevada dosis infectiva.

En nuestro país, se han descrito dos brotes causados por ECEI, uno de tipo familiar, ocurrido en Sabadell y causado por *E. coli* O124 (6), y otro hídrico, producido en Calella, también por *E. coli* O124 (15).

Los marcadores más utilizados para el seguimiento de las epidemias y la determinación del carácter clonal de estas cepas han sido el serotipo, el biotipo y el antibiograma.

En la actualidad, el empleo de marcadores genéticos tales como el perfil plasmídico, el ribotipado y el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción mediante electroforesis en campo pulsado, tanto en *E. coli* como en otros microorganismos, han mostrado una mayor sensibilidad y reproducibilidad al compararlos con los marcadores fenotípicos tradicionales (16).

Bibliografía

1. Boileau, C. R., d'Hauteville, H., Sansonetti, P. J. (1984). DNA hybridization technique to detect *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 959-961.
2. Buisse, J. M., Stover, C. K., Oaks, E. V., Venkatesan, M., Kopecko, D. J. (1987). Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. *J. Bacteriol.* **169**, 2561-2569.
3. Day, N. P., Scotland, S. M., Rowe, B. (1981). Comparison of an HEp-2 tissue culture test with the Serény test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella* spp. and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 596-597.
4. Dupont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libotani, J. P., Sheahan, D. G. (1971). Pathogenesis of *E. coli* diarrhoea. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1-9.
5. Edwards, P. R., Ewing, W. H. (1986). The genus *Escherichia*. In Edwards, P. R., Ewing, W. M. (ed.), *Identification of Enterobacteriaceae* (4^a ed.), pp. 93-136. Elsevier, New York.
6. Espinosa, P., Usera, M. A., Echeita, A., Marne, C., Segura, F. (1986). Toxiinfección alimentaria por *Escherichia coli* enteroinvasivo, serogrupo O124. *Med. Clin.* **86**, 236-238.
7. Ewing, W. H., Gravatti, J. L. (1947). *Shigella* types encountered in the Mediterranean area. *J. Bacteriol.* **53**, 191-195.
8. Gomes, T. A. T., Toledo, M. R. F., Trabulsi, L. R., Wood, P. K., Morris, J. G. J. (1987). DNA probes for identification of enteroinvasives *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 2025-2027.

9. Hale, T. L., Sansonetti, P. J., Schad, P. A., Austin, S., Formal, S. B. (1983). Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **40**, 340–350.
10. Harris, J. R., Mariano, J., Wells, J. G., Payne, B. J., Donnell, H. D., Cohen, M. L. (1985). Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Am. J. Epidemiol.* **122**, 245–252.
11. Lányi, B., Szita, J., Ringelhann, B., Kovách, K. (1959). A water-borne outbreak of enteritis associated with *Escherichia coli* serotype 124:72:32. *Acta Microbiol. Hung.* **6**, 77–83.
12. Law, D. (1994). Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 152–173.
13. Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhoea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**, 377–389.
14. Marier, R., Wells, J. G., Swanson, R. C., Callahan, W., Mehlman, I. J. (1973). An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. *Lancet* **2**, 1376–1378.
15. Marne, C., Clarà, I., Scotland, S. M., Rowe, B. (1988). Estudio de 22 casos de gastroenteritis aguda causada por *E. coli* enteroinvasivo serotipo O124, abstr. 15–05, p. 225. Abstr. III Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
16. Maslow, J. N., Mulligan, M. E., Arbeit, R. D. (1993). Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 153–164.
17. Matsushita, S., Yamada, S., Kai, A., Kudoh, Y. (1993). Invasive strain of *Escherichia coli* belonging to serotype O121:NM. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 3034–3035.
18. Mehlman, I. J., Eide, E. L., Sanders, A. C., Fishbein, M., Aulisio, C. C. G. (1977). Methodology for recognition of invasive potencial of *Escherichia coli*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**, 546–562.
20. Neubauer, M., Aldova, E., Duben, J. (1982). Outbreak of enterocolitis caused by an enteroinvasive *E. coli* (serotype O164, synonym serotype 147). *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.* **252**, 507–513.
21. Ogawa, H., Nakamura, A., Sakazaki, R. (1968). Pathogenic properties of enteropathogenic *E. coli* from diarrhoeal children and adults. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **21**, 333–349.
22. Olsvik, O., Wasteson, Y., Lund, A., Hornes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *Int. J. Food. Microbiol.* **12**, 103–114.
23. Pál, T., Formal, S. B., Hale, T. L. (1989). Characterization of virulence marker antigen of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 561–563.
24. Pumarola, A., Prats, G., Mirelis, B., Calaf, A., Torruella, T., Jiménez de Anta, M. T. (1986). Incidence of enteroinvasive *Escherichia coli* in Spain. A 14-month prospective study. *Microbiologica* **9**, 215–220.
25. Queiroz, D. M. M., Mendes, E. N., Toledo, M. R. F., Trabulsi, L. R. (1990). Identification of a new enteroinvasive *Escherichia coli* strain. *Res. Microbiol.* **141**, 703–706.
26. Riley, W. B. (1968). An outbreak of diarrhoea in an infant's home due to *Shigella*-like organism. *Med. J. Aust.* **2**, 1175–1176.
27. Serény, B. (1955). Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **2**, 293–296.
28. Sethaburt, O., Venkatesan, M., Murphy, G. S., Eampokalap, B., Hoge, C. W., Echeverria, P. (1993). Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J. Infect. Dis.* **167**, 458–461.
29. Silva, R. M., Toledo, M. R. F., Trabulsi, L. R. (1980). Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 441–444.
30. Taylor, D. N., Bodhidatta, L., Echeverria, P. (1991). Epidemiologic aspects of shigellosis and other causes of dysentery in Thailand. *Rev. Infect. Dis.* **13** (Suppl. 4), 226–230.
31. Toledo, M. R. F., Trabulsi, L. R. (1983). Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Serény test. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 419–421.
32. Wanger, A. R., Murray, B. E., Echeverria, P., Mathewson, J. J., Dupont, H. L. (1988). Enteroinvasive *Escherichia coli* in travellers with diarrhoea. *J. Infect. Dis.* **158**, 640–642.

Escherichia coli enterotoxigénicas, verotoxigénicas y
necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas.
Papel de los animales como reservorio de cepas
patógenas para el hombre

Jesús E. Blanco, Miguel Blanco, Jorge Blanco*

*Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Santiago de Compostela*

Recibido 15 febrero 1995/Aceptado 16 marzo 1995

Summary

Toxigenic *Escherichia coli* of human and animal origin have been classified into three categories: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), verotoxigenic *E. coli* (VTEC), and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC). ETEC are a major cause of infant diarrhoea in less-developed countries and frequently cause colibacillosis in domestic animals. Human ETEC strains may synthesize LT-I and/or STa enterotoxins and they may possess the colonization factors CFA/I to CFA/IV; porcine strains synthesize LT-I, STa and/or STb, and possess the colonization antigens K88, P987, K99 or F41; and bovine strains are usually STa producers harbouring on the bacterial surface K99 or F41 colonization factors. There is a high host-specificity, because of that ETEC from animals are not pathogen for humans. VTEC strains may produce three mainly types of verotoxins (VT1, VT2, VT2vp1) that are functionally and structurally related to the shiga toxin. The VTEC of human and bovine origins produce VT1, VT2 or both, whereas VT2vp1 is elaborated by *E. coli* that cause edema disease in swine. The VTEC strains belonging mainly to serotypes O157:H7 or H-, O26:H11 and O111:H-, are now considered to be the major cause of two human syndromes of hitherto unknown cause: hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Most outbreaks of VTEC infection occurred in USA, Canada and United Kingdom during the last ten years and have been linked to consumption of undercooked ground beef, and, to a lesser extent, to the drinking of unpasteurised milk. Thus, the principal reservoir of VTEC is the intestinal tract of cattle. By contrast, it is presumed that

* *Correspondencia:* Jorge Blanco. Departamento de Microbiología e Parasitología. Facultad de Veterinaria. Universidade de Santiago de Compostela. 27002 Lugo. Tel.: 982-252231. Fax: 982-252195.

human beings are the major reservoir of ETEC, and that contaminated water is a principal vehicle for transmission of ETEC infections. NTEC strains are able to elaborate two types of cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2). Strains of human origin usually produce CNF1, whereas bovine NTEC generally synthesize CNF2. NTEC strains are not responsible for food-associated outbreaks of gastroenteritis, but CNF1 and CNF2 are very good markers of the source of food contamination.

Key words: *Escherichia coli*, enteropathogenic, enterotoxins, verotoxins, necrotoxins

Resumen

Las *Escherichia coli* toxigénicas de origen humano y animal se clasifican en tres categorías: enterotoxigénicas (ECET), verotoxigénicas (ECVT) y necrotoxigénicas (ECNT). Las ECET son la causa principal de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo y frecuentemente son responsables de colibacilosis en las explotaciones ganaderas. Las cepas humanas sintetizan las enterotoxinas LT-I y/o STa y poseen los factores de colonización CFA/I a CFA/IV; las porcinas sintetizan LT-I, STa o STb y expresan los antígenos de colonización K88, P987, K99 o F41; mientras que las bovinas producen la enterotoxina STa y llevan K99 o F41. Existe una alta especificidad de huésped, no siendo las ECET de origen animal patógenas para los seres humanos. Por su parte, las ECVT producen tres tipos principales de verotoxinas (VT1, VT2, VT2vp1), que están estructural y funcionalmente relacionadas con la toxina shiga. Las ECVT de origen humano y bovino sintetizan VT1, VT2 o ambas, mientras que VT2vp1 es elaborada por las cepas porcinas responsables de la enfermedad edematosa. Las ECVT, principalmente de los serotipos O157:H7 o H-, O26:H11 y O111:H-, son consideradas en la actualidad la principal causa de dos importantes síndromes que afectan a los seres humanos: la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. En los últimos diez años se han producido numerosos brotes de colitis hemorrágica en EE. UU., Canadá y el Reino Unido. La mayoría de los brotes fueron causados por el consumo de hamburguesas elaboradas con carne de vacuno poco cocinada o de leche fresca sin pasteurizar, por lo que se cree que el tracto intestinal del ganado bovino funciona como reservorio de las ECVT. En contraste, los seres humanos actúan como reservorio de las ECET y el agua contaminada es el principal vehículo de transmisión de las infecciones causadas por las *E. coli* productoras de enterotoxinas. Las ECNT pueden elaborar dos tipos de factores necrosantes citotóxicos (CNF1 y CNF2). No obstante, las cepas de origen humano sintetizan CNF1, mientras que las bovinas producen CNF2. Este tercer tipo de *E. coli* no causan gastroenteritis de origen alimentario, pero, como se deduce de los resultados obtenidos en este estudio, funcionan como excelentes marcadores del origen de la contaminación microbiana de los alimentos.

Introducción

Las *Escherichia coli* productoras de toxinas se clasifican en tres categorías: *E. coli* enterotoxigénicas (ECET), *E. coli* verotoxigénicas (ECVT) y *E. coli* necrotoxigénicas (ECNT). Las cepas de estas tres

categorías presentan características específicas que las distinguen, ya que pertenecen a distintos serotipos, poseen diferentes factores de virulencia y se asocian con patologías concretas (18, 40). En la primera parte de este artículo hemos realizado una revisión sobre la patogénesis y epidemiología de estos tres grupos de *E. coli* toxigénicas. En la segunda parte presentamos los resultados de un estudio donde hemos investigado la presencia de *E. coli* toxigénicas en alimentos.

***Escherichia coli* enterotoxigénicas (ECET)**

Las *E. coli* enterotoxigénicas son consideradas en la actualidad, junto con las *E. coli* enteropatógenicas (ECEP) y los rotavirus, los patógenos que con mayor frecuencia causan gastroenteritis infantil, diarrea colérica y diarrea del viajero en países con condiciones higiénico-sanitarias deficientes. En los estudios realizados en Asia, África e Iberoamérica, las ECET se aíslan de entre el 10% y el 50% de los pacientes con diarrea (36, 42, 48). En los países desarrollados, las ECET son aisladas muy raramente de casos esporádicos de diarrea. La tasa de incidencia oscila entre el 0% y el 4%. No obstante, deben controlarse, ya que han provocado varios brotes que han afectado tanto a niños como a adultos (7, 34). Agua y alimentos contaminados han sido considerados los vehículos transmisores en la mayoría de los brotes que han afectado a adultos; brotes en los que se cree que han desempeñado un papel importante los manipuladores de alimentos. La mayoría de los brotes que afectaron a bebés tuvieron lugar en salas de pediatría de los hospitales y en guarderías infantiles. Aunque en algunos de estos brotes la vía de transmisión fueran los biberones contaminados, el modo de contagio más común fue por contacto persona-persona (33). Se cree que la razón de que las ECET causen diarrea principalmente en países poco desarrollados es que estas bacterias, al igual que *Vibrio cholerae*, para llegar a desencadenar la deshidratación deben ser ingeridas en dosis elevadas, de 10^8 a 10^{10} . Naturalmente, para que estas dosis se alcancen, las condiciones higiénico-sanitarias tienen que ser muy deficientes. En animales domésticos, las colibacilosis causadas por las ECET son muy frecuentes, afectan fundamentalmente a animales de pocos días de edad y recién destetados, y ocasionan importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado porcino y bovino (18, 41, 51, 67).

Las ETEC pueden sintetizar enterotoxinas termolábiles (LT-I y LT-II) y/o termoestables (STa y STb). Las enterotoxinas termolábiles son proteínas de elevado peso molecular (85.000 a 87.000 Da), constituidas por una subunidad A y cinco subunidades B, mientras que las termoestables son pequeños polipéptidos de 1900 a 5000 Da. Las enterotoxinas actúan incrementando la concentración de adenosín o guanósín monofosfato cíclico en los enterocitos, lo que provoca una fuerte salida de agua y electrolitos al lumen intestinal (10, 40, 59). Pero para que una ETEC pueda causar diarrea, además de sintetizar enterotoxinas debe poseer un factor de colonización que le permita adherirse y colonizar el epitelio del intestino delgado, evitando con ello la acción de lavado mecánico ejercido por el peristaltismo intestinal. La adherencia de las ECET es debida a la presencia de unos filamentos proteicos (100 a 1000) que se proyectan a lo largo de toda la superficie de las bacterias. Dichos filamentos consisten en estructuras fimbriales rígidas o fibrilares flexibles constituidas por unas 1000 subunidades estructurales repetitivas, y unas pocas subunidades funcionales, entre las que se encuentran las responsables de la adhesión (10, 51). Tanto las enterotoxinas como los factores de colonización de las ECET se encuentran

codificados en genes plasmídicos (53). Las ECET de origen humano y animal producen enterotoxinas similares, pero presentan diferentes factores de colonización que son los responsables de la especificidad de huésped existente, es decir, que las ECET de origen animal no puedan causar infecciones en seres humanos, y viceversa. Así, las de origen humano expresan los factores de colonización CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV; las de origen porcino los antígenos K88, P987, K99 y F41; y las que causan diarrea en terneros el K99 y el F41 (10, 18, 41, 47, 51). Además las ECET de origen humano y animal pertenecen a serotipos O:K:H totalmente diferentes (10, 18).

En nuestros estudios, hemos aislado ECET en una baja (3,2%), pero significativa, proporción de los casos esporádicos de diarrea infantil en Galicia y Valencia. Además, provocaron en la década de los ochenta varios brotes intrahospitalarios que afectaron a niños recién nacidos. Alguno de estos casos resultó particularmente grave al registrarse la muerte de varios afectados (7, 15, 34). La mayoría de las cepas enterotoxigénicas aisladas en España pertenecen al serotipo O153:K–:H45 y presentan un plásmido de elevado peso molecular (82 a 87 MDa), que es portador de la información para la expresión del factor de colonización CFA/I y la síntesis de la enterotoxina STa (38). Las cepas de este serotipo se han aislado también frecuentemente en Hispanoamérica, pero son raras en otras regiones geográficas del mundo (1, 17, 48). También se han aislado en España, con relativa frecuencia, ECET de los serotipos O6:K15:H16:CFA/II+(LT+STa+) y O27:K–:H7 (STa+) (17). Tras realizar extensos muestreos en numerosas explotaciones de ganado porcino situadas en diferentes comunidades autónomas, hemos comprobado que en España las ECET son una causa frecuente de diarrea en lechones lactantes y destetados, aislándose en el 20% de los casos. Entre las cepas aisladas en nuestro país predominan las de los serogrupos O138, O141 y O149; y muy especialmente las que poseen el antígeno de colonización P987 (37, datos no publicados). En lo que respecta al ganado bovino, sorprendentemente hemos encontrado que las ECET son una causa infrecuente (1%) de diarrea en España, lo cual está de acuerdo con el hecho de que las vacunas basadas en el antígeno K99 no están dando buenos resultados en las explotaciones de nuestro país (6, 22).

***Escherichia coli* verotoxigénicas (ECVT)**

Las *E. coli* productoras de verotoxinas han recibido diferentes denominaciones en la bibliografía: *E. coli* verotoxigénicas (ECVT), *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH) y *E. coli* productoras de “shiga-like toxins” (ECSLT).

Las verotoxinas son potentes citotoxinas que destruyen las células de la línea continua Vero (células de riñón de mono verde africano) cultivadas in vitro. Existen dos tipos de verotoxinas, VT1 (o SLT-I) y VT2 (o SLT-II), y diversas variantes de VT2, tales como VT2vha, VT2vhb, VT2vp1 y VT2vp2 (64). La gran mayoría de las cepas humanas y bovinas producen VT1 y/o VT2, mientras que las cepas porcinas responsables de la enfermedad edematosa sintetizan la variedad VT2vp1. Excepcionalmente se ha detectado la producción de VT1 en cepas porcinas y de VT2vp1 en cepas patógenas para humanos (62, 64). Las secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen VT1 son prácticamente idénticas a las de la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. No es de extrañar, por tanto, que la actividad biológica de VT1 sea neutralizada por un antisuero contra la toxina shiga. VT2 y sus variantes, aunque están estructural, genética y funcionalmente relacionadas con VT1, sólo presentan una homología de

secuencias en sus genes del 55–60% con el gen VT1. Si bien la toxina VT2 y sus variantes también son consideradas “shiga-like toxins”, sus actividades biológicas no son neutralizadas con un antisuero policlonal contra la toxina shiga. Las verotoxinas están constituidas por una subunidad enzimática A (de aproximadamente 33.000 Da) y 5 ó 6 subunidades B (de aproximadamente 7500 Da) que fijan la toxina a receptores celulares compuestos por glicolípidos (Gb3 o Gb4). Estas toxinas inhiben la síntesis proteica al inactivar catalíticamente la subunidad ribosomal 60S. Los portadores de los genes que codifican VT1 y VT2 son fagos. Se desconoce actualmente si las variantes de VT2 están también codificadas en el genoma de profagos. La actividad biológica de VT1 y VT2, y de las diferentes variantes de VT2, es muy similar a la actividad de la toxina shiga. Son citotóxicas sobre células Vero y algunas también sobre ciertas líneas de células HeLa, letales para ratones adultos inyectados intraperitonealmente y poseen una ligera actividad enterotóxica en asas ligadas de intestino de conejo (40, 43, 45, 62, 64). En cuanto a la patogénesis, las verotoxinas son liberadas en el intestino, pasan a la sangre y causan daños en el epitelio vascular. Inducen una coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el SNC, en el tubo digestivo y en los riñones. Todo esto puede conducir a un daño intestinal, renal, cerebral o multisistémico. Las ECVT pueden provocar en los seres humanos colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico (SUH), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), diarrea no sanguinolenta e incluso infecciones asintomáticas. La presentación clínica más común es la colitis hemorrágica, caracterizada por un cuadro severo de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta. Se diferencia de la clásica disentería en que generalmente cursa en ausencia de fiebre y pueden producirse graves complicaciones, ya que aproximadamente el 10% de los pacientes terminan desarrollando el SUH. Este síndrome afecta fundamentalmente a niños y se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo, que puede requerir diálisis e incluso transplante. La tasa de mortalidad del SUH oscila entre un 5% y un 10% (19, 29, 39, 44, 45).

La infección por ECVT fue reconocida por primera vez en 1982 por Riley et al. (58), en EE. UU. en dos brotes de colitis hemorrágica que afectaron a 47 personas que comieron en diversos restaurantes de la misma cadena de comidas rápidas. La ECVT causante de los brotes pertenecía a un serotipo (O157:H7) muy raramente aislado hasta la fecha y se diferenciaba de la mayoría de las cepas de *E. coli* en que no fermentaba el sorbitol (58). Desde entonces, las ECVT sorbitol-negativas del serotipo O157:H7 han provocado numerosos brotes de colitis hemorrágica, la mayoría de los cuales tuvieron lugar en EE. UU., Canadá y Reino Unido (3, 27, 39, 45, 46, 54, 60). En estos países, las ECVT O157:H7 son en la actualidad la causa principal de diarrea sanguinolenta (15% a 41%) y el segundo o tercer patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de coprocultivos, después de *Salmonella* y *Campylobacter*. La infección ha seguido una tasa exponencial, pasando, por ejemplo, en Escocia de 10 casos entre 1984 y 1986 a 202 en 1991 (60). En Canadá, donde la mayoría de los laboratorios realizan el diagnóstico rutinario de este patógeno, se registra la mayor incidencia de infecciones por ECVT; 1342 aislados fueron identificados en 1987, correspondiendo a 5,2 por cada 100.000 habitantes (39). Entre 1989 y 1992 se produjeron 17 brotes de colitis hemorrágica en Escocia, donde la incidencia es ligeramente inferior (4,0 por 100.000 habitantes en 1991) (60). Se estima que actualmente en EE. UU. ocurren al año del orden de 10.000 a 20.000 casos de infección por ECVT O157:H7, habiéndose identificado 16 brotes durante 1993 y 11 en los seis primeros meses de 1994 (46). La mayoría de los brotes se han debido al consumo de hamburguesas y por ello la colitis hemorrágica es conocida en los países anglosajones como “la enfermedad de las hamburguesas” (46). No obstante, también se han asociado algunos brotes con el consumo de leche no

pasteurizada, yoghourts artesanales, sandwiches de pavo, sidra y agua no clorada. También se han documentado al menos dos brotes en los que se vieron afectadas personas que se habían bañado en un lago o en una piscina. La transmisión persona a persona vía fecal-oral también es muy importante en una segunda fase, infectándose frecuentemente familiares y niños ingresados en los servicios de pediatría donde están siendo atendidos pacientes en las fases sintomáticas de la infección (39, 60). Aunque la mayoría de los brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica han sido provocados por ECVT del serotipo O157:H7, eso no quiere decir que la producción de verotoxinas se restrinja a las cepas del citado serotipo. Las ECVT causantes de infecciones en seres humanos pertenecen a un amplísimo abanico de serotipos, habiéndose detectado la producción de verotoxinas en cepas pertenecientes a unos 50 serogrupos O diferentes. Sin lugar a dudas, las ECVT de los serotipos O26:H11 y O111:H- son las que adquieren una mayor importancia clínica después de las ECVT del serotipo O157:H7 (5, 18, 62).

Está claramente establecido que el ganado bovino actúa como reservorio de las ECVT. No obstante, también se han encontrado ECVT en ganado ovino y caprino y en perros y gatos (4). Más de la tercera parte de los terneros y vacas sanas llevan en su flora intestinal ECVT, muchas de las cuales pertenecen a los mismos serotipos O:K:H que las cepas que causan infecciones en seres humanos. No obstante, los animales colonizados por ECVT del serotipo O157:H7 en la mayoría de los estudios no superan el 2% de los muestreados (28, 50, 65). Nosotros hemos llevado a cabo tres estudios epidemiológicos en el ganado bovino que confirman que éste es el reservorio natural de las ECVT, ya que las hemos aislado del 20% (97/510) de los animales muestreados (6, 22, datos no publicados). Nuestras investigaciones sugieren que las ECVT forman parte de la flora normal intestinal de los terneros y vacas, ya que las hemos aislado en el 9% (18/197) de los animales con diarrea frente al 19% (21/112) de los sanos. Tras determinar las combinaciones O:K:H de las ECVT aisladas en los dos primeros estudios, comprobamos que el 51% pertenecían a serotipos (O26:K-:H11 o H-, O91:K-:H21, O153:K-:H45 O105:K?:H18, O111:K-:H-, O113:K-:H21, O126:K?:H-, O128:K?:H- y O157:K-:H7 o H-) encontrados previamente entre ECVT causantes de infecciones en seres humanos; y el 29% presentó serotipos (O26:K-:H11 o H-, O111:K-:H- y O157:K-:H7 o H-) considerados enterohemorrágicos. Las ECVT sorbitol-negativas de los serotipos O157:H7 u O157:H- se detectaron solamente en 4 (0,8%) de los 510 animales investigados (6, 22). Además, demostramos que las ECVT bovinas aisladas en Galicia producían el mismo tipo de verotoxinas que las cepas humanas, ya que comprobamos que el 57% eran VT1+, el 28% VT2+ y el 15% VT1+VT2+ (24). En contraste, las ECVT las aislamos muy raramente de cerdos (37), conejos (20), gatos (16), perros y pollos (datos no publicados).

A pesar de que casi la tercera parte de las vacas y terneros de las granjas de nuestro país están colonizadas por ECVT, los casos documentados de colitis hemorrágica y del SUH son muy pocos. Se han procesado más de 18.000 coprocultivos de enteritis en España y las ECVT sorbitol-negativas de los serotipos altamente virulentos O157:H7 o H- solamente se han identificado en 9 casos esporádicos de colitis hemorrágica (7 en niños y 2 en adultos). Dos de los niños presentaron el SUH del que pudieron recuperarse (15, comunicación personal G. Prats). El único brote de colitis hemorrágica afectó a cuatro turistas británicos que habían permanecido en el mismo hotel de Ibiza (61). Los únicos estudios en los que se investigaron las ECVT en su conjunto, tanto las pertenecientes al serogrupo O157 como las de otros serogrupos, fueron realizados por nuestro grupo de investigación en Galicia y Valencia (15, datos no publicados). A pesar de haber investigado para la producción de verotoxinas de 5 a 10 colonias de *E. coli* por coprocultivo, solamente hemos sido capaces de detectar ECVT en el 0,4% de los casos

(4/1010). Tres de las 4 ECVT aisladas de coprocultivos de niños con diarrea pertenecieron a serotipos considerados enterohemorrágicos, concretamente dos al serotipo O26:H11 y uno al O111. No acabamos de entender la razón por la que en un país como el nuestro, en el que una parte significativa de la población vive en ambientes rurales en contacto directo o indirecto con explotaciones de ganado bovino, no se estén produciendo más casos de infecciones por ECVT. Tal vez los animales estén colonizados por ECVT a las que les falta algún factor de virulencia esencial, o bien el tipo de procesado de los alimentos cárnicos o los hábitos culinarios facilitan su inactivación. En cualquier caso, siempre existe el riesgo de que las infecciones por ECVT puedan surgir con fuerza en nuestro país de un momento a otro, como ocurrió en su día en EE. UU., Canadá y Reino Unido.

Escherichia coli necrotoxigénicas (ECNT)

Caprioli et al. (25) en 1983 descubrieron que algunas cepas de *E. coli* aisladas de niños con enteritis en Italia producían una nueva toxina con actividad necrosante a la que denominaron factor necrosante citotóxico (CNF). Posteriormente, Caprioli et al. (26) y nosotros (2, 9) comprobamos que la producción de CNF era muy frecuente entre las *E. coli* causantes de infecciones urinarias y sepsis en seres humanos. Paralelamente, De Rycke et al. (30) y nosotros (6) observamos que las *E. coli* aisladas de terneros con diarrea también elaboraban a menudo CNF. La toxina CNF excretada por las cepas bovinas, al igual que la CNF excretada por las cepas de origen humano, era necrótica en piel de conejo y letal para ratones adultos inyectados intraperitonealmente. Sin embargo, las cepas CNF⁺ bovinas presentaban serogrupos diferentes a los previamente encontrados entre las *E. coli* humanas productoras de esta toxina. Otra diferencia destacable era que las cepas humanas CNF⁺ eran productoras de α -hemolisina, mientras que no lo eran las *E. coli* bovinas productoras de CNF. Posteriormente, en un estudio realizado en colaboración con el equipo de De Rycke (31), establecimos la existencia de dos toxinas diferentes, inmunológicamente relacionadas, que causan necrosis en piel de conejo y multinucleación en células Vero y HeLa, a las que propusimos denominar CNF1 y CNF2.

CNF1 y CNF2 son dos toxinas proteicas que tienen un peso molecular de 115.000 y 110.000 Da, respectivamente (25, 55). Los genes que codifican CNF1 se encuentran en el cromosoma (35), mientras que los responsables de la producción de CNF2 son plasmídicos (55). Ambos genes han sido clonados y secuenciados, comprobándose que presentan una homología elevada entre sí y con el gen de la toxina dermonecrótica de *Pasteurella multocida* (35, 56). Tanto CNF1 como CNF2 inducen la polimerización de la actina F del citoesqueleto, facilitando la endocitosis de bacterias sin mecanismos especiales de invasividad (56). Las toxinas CNF1 y CNF2 se pueden distinguir por su diferente actividad biológica y también por técnicas serológicas o genéticas. En células Vero producen efectos muy similares, pero en células HeLa provocan efectos citopáticos fácilmente diferenciables (8). A diferencia del polietilenglicol y de algunos virus animales, los factores necrosantes citotóxicos CNF1 y CNF2 no inducen la fusión de las células vecinas de la monocapa. Impiden la división celular sin afectar aparentemente a la replicación de los ácidos nucleicos, induciendo la aparición de células gigantes multinucleadas; poligonales en el caso de CNF1 y alargadas en el de CNF2. Ambas toxinas causan necrosis en piel de conejo y son letales al inyectarlas intraperitonealmente a ratones adultos; pero los títulos de actividad necrótica y letal son

mucho mayores para los extractos sónicos de las cepas CNF2⁺. En asas ligadas de intestino de conejo, solamente CNF2 presenta una moderada actividad enterotóxica, en todo caso muy inferior a la de las enterotoxinas producidas por las ECET (31).

La detección de CNF1 y CNF2 en un principio resultaba muy laboriosa debido a que estas toxinas no se liberan al medio de cultivo. Para obtenerlas era necesario romper las bacterias con ultrasonidos, proceso que hacía muy problemática su detección en un elevado número de muestras (6, 30, 31). No obstante, hemos comprobado (8) que al añadir mitomicina C al medio de cultivo se induce la liberación de ambos factores necrosantes. Este hallazgo nos ha permitido estudiar la producción de CNF1 y CNF2 en varios miles de cepas de *E. coli* de origen humano y animal. Así, hemos comprobado que la producción de CNF1 es frecuente entre las *E. coli* que causan infecciones urinarias y sepsis en seres humanos y entre las *E. coli* de la flora intestinal de personas y gatos sanos (12, 13, 14), mientras que la síntesis de CNF2 es característica de las *E. coli* de origen bovino (22). Además, hemos encontrado que las cepas CNF2⁺ son mucho más frecuentes en la flora intestinal de los terneros (67%) que en la de las vacas adultas (21%) ($P < 0,001$) (datos no publicados).

Las ECNT también poseen adhesinas que les permiten colonizar las células epiteliales. Como era de esperar, las expresadas por las cepas humanas CNF1⁺ (fimbrias P y adhesina responsable del tipo MRHA III) son diferentes a las que poseen las cepas bovinas productoras de CNF2 (antígenos Vir y B23). Las cuatro adhesinas identificadas en las ECNT son capaces de hemaglutinar en presencia de D-manosa diferentes tipos de eritrocitos, característica que comparten con la mayoría de los factores de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/IV, K88, K99, F41) de las ECET. Las adhesinas MRHA III y B23 son específicas de las ECNT. Aunque las fimbrias P y el antígeno Vir (también conocido como F17b) se han detectado mucho más frecuentemente en ECNT, también se pueden encontrar en cepas no productoras de CNF1 y CNF2, respectivamente (13, 14, 18, 49). Tras serotipar un gran número de ECNT aisladas en nuestro país, hemos comprobado que las cepas CNF1⁺ y CNF2⁺ difieren totalmente en los serogrupos y serotipos O:K:H que presentan. Entre las cepas CNF1⁺ predominan las de los serogrupos O2, O4, O6, O14, O22, O75 y O83; mientras que entre las CNF2⁺ son frecuentes los serogrupos O1, O3, O15, O55, O88 y O123 (12). Además, los serotipos O:K:H de las ECNT son distintos a los encontrados entre las ECET y ECVT (21, 23).

***Escherichia coli* toxigénicas en alimentos**

Además de las *E. coli* enterotoxigénicas (ECET) y verotoxigénicas (ECVT), otros grupos de *E. coli* pueden causar gastroenteritis de origen alimentario: las *E. coli* enteropatógenas clásicas (ECEP) y las *E. coli* enteroinvasivas (ECEI) (33). Las ECEP y ECEI causan diarrea por mecanismos que no incluyen la producción de toxinas, por lo cual no son objeto de revisión en este trabajo (11, 47). Los brotes de diarrea asociados con la consumición de alimentos o bebidas contaminados por las ECET, ECEP y ECEI en países desarrollados son muy raros, mientras que los provocados por ECVT del serotipo O157:H7 son relativamente frecuentes y siguen una progresión exponencial muy preocupante. En contraste, en los países en vías de desarrollo con malas condiciones higiénico-sanitarias, ECET, ECEP y ECEI son una importante causa de diarrea, calculándose que estos grupos de *E. coli* provocan del orden de 630 millones

de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del Tercer Mundo. El agua contaminada es el principal vehículo de transmisión de las enterocolitis, por consumición directa o por su presencia en alimentos que son cocinados, lavados o regados con agua (33). Personas sintomáticas y asintomáticas son el principal reservorio de ECET, ECEP y ECEI. Las bacterias se encuentran en el tracto intestinal y son eliminadas en las heces. Manipuladores infectados debido a medidas higiénicas pobres o aguas contaminadas por aguas residuales de humanos son el origen de la contaminación de los alimentos.

El principal reservorio de ECVT es el tracto intestinal del ganado bovino. Algunos estudios, empleando técnicas inmunológicas y genéticas altamente sensibles, han demostrado que alimentos asociados con brotes graves causados por ECVT O157:H7 pueden contener tan sólo 10 microorganismos por gramo. Durante las operaciones de carnización, y fundamentalmente durante el desollado y la evisceración, llegan inevitablemente a las superficies de las canales y de las vísceras cepas de *E. coli* procedentes de la flora intestinal del animal. Lo mismo ocurre durante el ordeño, contaminándose casi siempre la leche con bacterias intestinales. Si la cepa que llega es altamente patógena (O157:H7 VT⁺), la única forma de evitar la toxoinfección alimentaria es calentar (68,3°C) la carne o pasteurizar la leche hasta matar las bacterias. Especialmente peligrosas resultan las hamburguesas y la carne picada, ya que al encontrarse los microorganismos en toda su masa no es suficiente con calentar la parte superficial (46, 52). La mayoría de los estudios efectuados últimamente sobre la presencia de *E. coli* patógenas en alimentos se han centrado en ECVT, muy especialmente en las pertenecientes al serotipo O157:H7, y han sido realizados casi todos en EE. UU., Canadá y Reino Unido. Se han aislado ECVT de entre el 0,7% y el 29% de las muestras de carne de vacuno, de entre el 0,9% y el 11% de las de carne de porcino y de entre 0% y el 2% de las de carne de pollo. En estos países se estima que aproximadamente entre el 1% y el 3% de las muestras de carne de vacuno contienen ECVT O157:H7 altamente virulentos. Las cepas de este serotipo también se han aislado de carne de porcino y aves, pero en general se acepta que la presencia en carne de origen no bovino es debida, en la mayor parte de los casos, a una contaminación secundaria producida como consecuencia de entrar en contacto y compartir los mismos utensilios de manejo en las carnicerías (32, 46, 57, 63, 66).

En el verano de 1994 hemos realizado un estudio prospectivo sobre la presencia de *E. coli* toxigénicas en hamburguesas y carne picada fresca de ternera que estaba a la venta en distintos establecimientos comerciales de la ciudad de Lugo (datos no publicados). En dicho estudio hemos examinado 72 muestras y hemos aislado *E. coli* toxigénicas en el 39%: LT-I⁺ (0%), LT-II⁺ (5%), VT1⁺ (1%), VT2⁺ (3%), CNF1⁺ (0%) y CNF2 (37%). Los altos porcentajes de aislamiento de ECNT productoras de CNF2 (41% en hamburguesas y 28% en carne picada) y la falta de detección de ECNT CNF1⁺ indican, sin lugar a dudas, que al menos una parte muy importante de la contaminación microbiana es endógena; no procede de los manipuladores sino del propio animal. Las ECNT no se han asociado con gastroenteritis de origen alimentario y teóricamente no son enteropatógenas para seres humanos, pero resultan excelentes marcadores del origen de la contaminación microbiana en los alimentos. Con este fin, fueron investigadas por primera vez en este estudio y los datos encontrados no pueden ser más satisfactorios ya que se confirma algo que se suponía pero que no era fácilmente demostrable con los marcadores existentes (especialmente el serotipo O:K:H): que la mayoría de las *E. coli* presentes en la carne de los animales proceden del contenido intestinal de los mismos. Al comparar la incidencia de las *E. coli* toxigénicas en carne de vacuno y en la flora intestinal de terneros y vacas de explotaciones ganaderas de la provincia

de Lugo, sorprende el bajo nivel (3%) detectado de cepas VT⁺ en alimentos, sobre todo si se compara con las altas incidencias registradas en la flora intestinal de terneros (42%) y vacas (30%). Da la impresión de que las cepas VT⁺ tuvieran menos posibilidades de contaminar y sobrevivir en la carne que las cepas CNF2⁺. Las *E. coli* toxigénicas se detectaron en 10 (53%) de las 19 muestras con más de 10³ *E. coli* por gramo y en 10 (23%) de las 43 muestras con menos de 10³ *E. coli* por gramo. La presencia de *E. coli* en los alimentos en cifras suficientemente elevadas (>10³/g) se utiliza para indicar la posibilidad de contaminación fecal y la posible presencia de otros microorganismos enteropatógenos como, por ejemplo, salmonelas. Pero como enteropatógeno que puede ser, las reducidas cifras generalmente aceptables adquieren un nuevo significado, ya que solamente la presencia de una bacteria ECVT O157:H7 por gramo representa un grave riesgo de infección. Las cepas CNF2⁺, LT⁺ y VT⁺ aisladas de carne picada y hamburguesas presentaron serogrupos O típicos de ECNT, ECET y ECVT aisladas del contenido intestinal de vacas y terneros, lo que confirma su origen endógeno. La única cepa tipable VT⁺ aislada en este estudio presentó el serogrupo O116. Dicho serogrupo no fue encontrado entre las ECVT aisladas de pacientes con colitis hemorrágica o el SUH ni en España ni en otros países. Desconocemos si dicha cepa es realmente enteropatógena para seres humanos. A pesar de haber empleado un método selectivo especialmente indicado para el aislamiento de ECVT O157:H7 sorbitol-negativas, no hemos sido capaces de identificarlos en ninguna de las 72 muestras examinadas. Este hecho no es sorprendente, sobre todo si se tiene en cuenta la frecuencia con que hemos detectado estas cepas altamente patógenas en el contenido intestinal del ganado bovino en Galicia. Concretamente, sólo 4 (0,8%) de los 520 animales muestreados eran portadores de *E. coli* O157:H7 VT⁺ (6, 22, datos no publicados).

Agradecimientos

Nuestros estudios sobre *E. coli* toxigénicas han sido financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 94/1056) y por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (AGF92-0570). En este estudio también han participado las técnicas de laboratorio María Cristina Prado Croas y Marta Río Silva.

Bibliografía

1. Agüero, M. E., Reyes, L., Prado, V., Ørskov, I., Ørskov, F., Cabello, F. C. (1985). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in a population of infants with diarrhea in Chile. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 576–581.
2. Alonso, M. P., Blanco, J., Blanco, M., González, E. A. (1987). Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections: relation with haemagglutination. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 391–396.
3. Barrett, T. J., Lior, H., Green, J. H., Khakhria, R., Wells, J. G., Bell, B. P., Greene, K. D., Lewis, J., Griffin, P. M. (1994). Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 3013–3017.
4. Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2483–2488.

5. Beutin, L., Aleksic, S., Zimmermann, S., Gleier, K. (1994). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* **183**, 13–21.
6. Blanco, J., González, E. A., García, S., Blanco, M., Regueiro, B., Bernádez, I. (1988). Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-western Spain). *Vet. Microbiol.* **18**, 297–311.
7. Blanco, J., González, E. A., Blanco, M., Garabal, J. I., Alonso, M. P., Jansen, W. H., Guineé, P. A. M. (1989). Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in outbreaks and sporadic cases of diarrhoea in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**, 396–400.
8. Blanco, J., Blanco, M., González, E. A., Alonso, M. P., Garabal, J. I. (1990). Comparative evaluation of three tests for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**, 311–316.
9. Blanco, J., Alonso, M. P., González, E. A., Blanco, M., Garabal, J. I. (1990). Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains. *J. Med. Microbiol.* **31**, 175–183.
10. Blanco, J., Blanco, M., Garabal, J. I., González, E. A. (1991). Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. *Microbiología SEM* **7**, 57–72.
11. Blanco, J., Blanco, M., González, E. A. (1991). Mecanismos de patogénesis de los *Escherichia coli* enteropatogénicos, enterotoxigénicos, enteroinvasores y enterohemorrágicos. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* **6**, 163–176.
12. Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Garabal, J. I., González, E. A. (1992). Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**, 155–160.
13. Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M. P., Blanco, J. E., González, E. A., Garabal, J. I. (1992). Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Res. Microbiol.* **143**, 869–878.
14. Blanco, J., Alonso, M. P., Blanco, M., Blanco, J. E., González, E. A., Garabal, J. I. (1992). Establishment of three categories of P-fimbriated *Escherichia coli* strains that show different toxic phenotypes and belong to particular O serogroups. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**, 131–136.
15. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Escribano, A. (1993). Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por los *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **11**, 324–334.
16. Blanco, J., Blanco, M., Wong, I., Blanco, J. E. (1993). Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Vet. Microbiol.* **38**, 157–165.
17. Blanco, J., Blanco, M., González, E. A., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Garabal, J. I., Jansen, W. H. (1993). Serotypes and colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in various countries. *Eur. J. Epidemiol.* **9**, 489–496.
18. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Garabal, J. I., González, E. A. (1993). *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo.
19. Blanco, J., Blanco, M., Escribano, A., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Marín, J., Hernández, R. (1995). *Escherichia coli* verotoxigénicos y el síndrome urémico hemolítico. Aspectos clínicos y microbiológicos. *An. Esp. Pediatr.* **42**, 9–19.
20. Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Rioja, L., Duchá, J. (1994). Serotypes, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and healthy rabbits in Spain. *Vet. Microbiol.* **38**, 193–201.
21. Blanco, J. E., Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M. P., Jansen, W. H. (1994). Serotypes of CNF-producing *Escherichia coli* strains that cause extraintestinal infections in humans. *Eur. J. Epidemiol.*, in press.

22. Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., Ramos, J. (1993). Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.* **54**, 1446–1451.
23. Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Verbruggen, A., Jansen, W. H. (1994). Serotypes of bovine *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor type 2 (CNF2). *Vet. Microbiol.* **39**, 83–88.
24. Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., González, E. A., Gomes, T. A. T., Zerbini, L. F., Yano, T., Pestana de Castro, A. F. (1994). Genes coding for shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. *Vet. Microbiol.* **42**, 105–110.
25. Caprioli, A., Falvo, V., Roda, L. G., Ruggeri, F. M., Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* **39**, 1300–1306.
26. Caprioli, A., Falvo, V., Ruggeri, F. M., Minelli, F., Ørskov, I., Donelli, G. (1989). Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 758–761.
27. Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A., Lior, H. (1987). A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1496–1500.
28. Chapman, P. A., Wright, D. J., Siddons, C. A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* **40**, 424–427.
29. Cleary, T. G. (1988). Cytotoxin-producing *Escherichia coli* and the hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Clin. North. Am.* **35**, 485–501.
30. De Rycke, J., Guillot, J. F., Boivin, R. (1987). Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* **15**, 137–150.
31. De Rycke, J., González, E. A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M., Boivin, R. (1990). Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 694–699.
32. Doyle, M. P., Schoeni, J. L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2394–2396.
33. Doyle, M. P. (1990). Foodborne illness. Pathogenic *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet* **336**, 1111–1115.
34. Escribano, A., Ørskov, I., Ørskov, F., Borrás, R. (1987). Enterotoxigenic *Escherichia coli* O153:H45 from an outbreak of diarrhoea in Spain. *Med. Microbiol. Immunol.* **176**, 241–244.
35. Falvo, V., Pace, T., Picci, L., Pizzi, E., Caprioli, A. (1993). Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**, 4909–4914.
36. Faruque, S. M., Haider, K., Albert, M. J., Ahmad, Q. S., Alam, A. N., Nahar, S., Tzipori, S. (1992). A comparative study of specific gene probes and standard bioassays to identify diarrhoeagenic *Escherichia coli* in paediatric patients with diarrhoea in Bangladesh. *J. Med. Microbiol.* **36**, 37–40.
37. González, E. A., Blanco, J. (1986). Colonization antigens, antibiotic resistance and plasmid content of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Galicia (North-western Spain). *Vet. Microbiol.* **11**, 271–283.
38. González, E. A., Blanco, J., Garabal, I., Blanco, M. (1991). Biotypes, antibiotic resistance and plasmids coding for CFA/I and STa in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of serotype O153:H45 isolated in Spain. *J. Med. Microbiol.* **34**, 89–95.
39. Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**, 61–68.
40. Gyles, C. L. (1992). *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* **38**, 734–746.
41. Holland, R. E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 345–375.

42. Huilan, S., Lu Guang Zhen, Mathan, M. M., Mathews, M. M., Olarte, J., Espejo, R., Khin Maung, U., Ghafoor, M. A., Khan, M. A., Sami, Z., Sutton, R. G. (1991). Aetiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bulletin of the World Health Organisation* **69**, 549–555.
43. Jackson, M. P. (1990). Structure-function analyses of shiga toxin and the shiga-like toxins. *Microbial Pathogen*, **8**, 235–242.
44. Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S., Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **151**, 775–782.
45. Karmali, M. A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**, 15–38.
46. Knight, P. (1993). Hemorrhagic *E. coli*: the danger increases. *ASM News* **59**, 247–250.
47. Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**, 377–389.
48. Levine, M. M., Ferreccio, C., Prado, V., Cayazzo, M., Abrego, P., Martinez, J., Maggi, L., Baldini, M. M., Martin, W., Maneval, D., Kay, B., Guers, L., Lior, H., Wasserman, S. S., Nataro, J. P. (1993). Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* **138**, 849–869.
49. Mazouari, K. E., Oswald, E., Hernalsteens, J. P., Lintermans, P., de Greve, H. (1994). F17-like fimbriae from a invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.* **62**, 2633–2638.
50. Montenegro, M. A., Bülte, M., Trumpf, T., Aleksic, S., Reuter, G., Bulling, E., Helmuth, R. (1990). Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1417–1421.
51. Moon, H. W. (1990). Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Current Top. Microbiol. Immunol.* **151**, 147–165.
52. Moreno, B. (1993). Nuevos problemas en la moderna inspección de carnes: *Escherichia coli* O157:H7. *Información Veterinaria* **138**, 21–22.
53. Mühldorfer, I., Hacker, J. (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogen*. **16**, 171–181.
54. Neill, M. A. (1994). Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **7**, 295–303.
55. Oswald, E., de Rycke, J. (1990). A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 279–284.
56. Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., Wu, H. C., Fiorentini, C., Boquet, P., O'Brien, A. D. (1994). Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3814–3818.
57. Read, S. C., Gyles, C. L., Clarke, R. C., Lior, H., McEwen, S. (1990). Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidem. Infect.* **105**, 11–20.
58. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**, 681–685.
59. Scotland, S. M. (1988). Toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 109S–129S.
60. Sharp, J. C. M., Coia, J. E., Curnow, J., Reilly, W. J. (1994). *Escherichia coli* O157 infections in Scotland. *J. Med. Microbiol.* **40**, 3–9.
61. Smith, H. R., Rowe, B., Gross, R. J., Fry, N. K., Scotland, S. M. (1987). Haemorrhagic colitis and vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* in England and Wales. *Lancet* **I**, 1062–1064.
62. Smith, H. R., Scotland, S. M. (1988). Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **26**, 77–85.

63. Suthienkul, O., Brown, J. E., Seriwatana, J., Tienthongdee, S., Sastravaha, S., Echeverria, P. (1990). Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1135–1139.
64. Takeda, Y., Kurazono, H., Yamasaki, S. (1993). Vero toxins (shiga-like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (verocytotoxin-producing *E. coli*). *Microbiol. Immunol.* **37**, 591–599.
65. Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. P., Mantin, M. L., Griffin, P. M., Ostroff, S. M., Potter, M. E., Tauxe, R. V., Wachsmuth, I. K. (1991). Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 985–989.
66. Willshaw, G. A., Smith, H. R., Roberts, D., Thiriwell, J., Cheasty, T., Rowe, B. (1993). Examination of raw beef products for the presence of vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 420–426.
67. Wray, C., Morris, J. A. (1985). Aspects of colibacillosis in farm animals. *J. Hyg. Camb.* **95**, 577–593.

Tendencias actuales en la conservación refrigerada de frutos, como marcadores de la calidad higiénica de los alimentos

José M. Martínez Javega

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia

Recibido 12 diciembre 1994/Aceptado 5 febrero 1995

Summary

Spore germination and growth rate of pathogens can be greatly reduced by cooling right after harvest. Most tropical or subtropical crops, and even some temperate, fruits undergo from chilling injury (CI) at temperatures considerably above their freezing point. Several procedures have been designed to increase tolerance to CI. Prestorage temperature conditioning can reduce CI in subsequent cold storage. Intermittent warming interrupting the chilling period by periods at nonchilling temperatures may become a practical treatment to prolong the storage of chilling sensitive crops. Modified atmospheres extend the postharvest life of fruit by reducing their respiration rate. The maintenance of fruit in good physiological condition may result in considerable disease resistance. A direct effect against pathogens is also possible at concentrations of O₂ lower than 1.8% or concentrations of CO₂ higher than 10%.

Key words: fruits decay, cold storage, chilling injury, modified atmosphere

Resumen

El enfriamiento inmediato de los frutos puede reducir notablemente la germinación de esporas y el crecimiento de patógenos. La mayoría de los frutos de origen tropical y subtropical e incluso algunos de climas templados sufren daños por frío (DF) cuando se almacenan a temperaturas considerablemente superiores al punto de congelación. Se han diseñado procedimientos para aumentar la tolerancia a los DF. El acondicionamiento a media o alta temperatura previo al almacenamiento frigorífico puede reducir los DF. El calentamiento intermitente alternando períodos de bajas y medias temperaturas puede ser un tratamiento práctico para prolongar el almacenamiento de frutos sensibles al frío. Las atmósferas modificadas alargan la vida de los frutos reduciendo su intensidad respiratoria. Mantener los frutos en buena condición fisiológica confiere considerable resistencia a las podredumbres. También es posible un efecto directo contra patógenos con concentraciones de O₂ menores de 1,8% o concentraciones de CO₂ superiores al 10%.

Correspondencia: José M. Martínez Javega. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. 46113 Moncada. Valencia. Tel.: 96-1391000. Fax: 96-1390240.

Efectos de la temperatura en el crecimiento de microorganismos

La resistencia al ataque fúngico de los frutos se reduce notablemente al empezar la maduración, por lo que es importante mantener los frutos en condición vigorosa bajando la actividad respiratoria al mínimo que permita el normal funcionamiento celular (10). En el caso de frutos climatéricos es esencial, además, atrasar y minimizar la crisis climatérica asociada al proceso de maduración. El uso de bajas temperaturas es el medio más importante para conseguir esos objetivos. El enfriamiento no sólo exalta la resistencia fisiológica de los tejidos a la agresión, demorando la maduración y senescencia, sino que también influye directamente en el crecimiento de los hongos. A temperaturas iguales o inferiores a 0°C sólo puede observarse crecimiento significativo de hongos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* o *Cladosporium herbarum* (10). En ciertas especies, el tiempo que transcurre entre la recolección y la obtención de la baja temperatura es decisivo para reducir las infecciones. Si es corto, la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos puede retrasarse y reducirse. De ahí que la técnica de prerrefrigeración con sistemas de aire forzado, agua o vacío, se oriente a la reducción de los tiempos de enfriamiento hasta alcanzar la temperatura próxima a 0°C, incluso si el subsiguiente transporte es a 5°C, pues de esta manera se puede suprimir mayor número de microorganismos, sobre todo de esporas germinadas (10). Pero, no siempre se pueden utilizar temperaturas bajas en la frigoconservación, ya que algunos frutos son sensibles al frío; tras permanecer un tiempo por debajo de una temperatura crítica, se producen lesiones (picado, escaldadura, pardeamiento interno, etc.). La temperatura crítica es más alta en los frutos de origen tropical y varía con la especie y variedad (3, 11, 21).

Reducción de la sensibilidad al frío

Se han investigado diversos métodos para reducir la sensibilidad al frío y permitir el almacenamiento a temperaturas inferiores a la crítica. El acondicionamiento a medias temperaturas (15–25°C) durante 2–7 días se ha mostrado eficaz en aguacate (6), manzana (12), lima (22), naranja (13), sandía (20), papaya (2), pomelo (13) y plátano (9). La acción ejercida podría ser el aumento de la síntesis de ácidos grasos insaturados, de poliaminas, o de escualeno (26). En el caso de limón y pomelo, esta técnica permite aplicar posteriormente tratamientos de cuarentena por frío (16 días a 2°C) para la desinsectación obligatoria en la exportación a determinados países (15). El acondicionamiento a alta temperatura (30–40°C) y humedad (90–100%) durante 1–3 días reduce la sensibilidad al frío, probablemente porque se produce la síntesis de proteínas HSP (“heat-shock proteins”), alguna de las cuales modificaría las propiedades de las membranas celulares, proporcionando la base de la tolerancia térmica (24). Este tipo de acondicionamiento ha sido eficaz en la conservación a baja temperatura de cítricos, en los que además se ha registrado un efecto térmico sobre *Penicillium digitatum*, la creación de una barrera mecánica para la penetración de micelios producida por la biosíntesis de lignina, así como la presencia de sustancias antifúngicas (fitoalexinas), como las cumarinas (4, 17). También se han detectado efectos fungicidas respecto a *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Mucor* sp. con el acondicionamiento de manzanas, peras, aguacates, melocotones, cerezas y pepinos (7). Se han obtenido resultados prometedores en la reducción de lesiones por frío y/o podredumbres con la inmersión en agua caliente (51°C–53°C durante 2–3 minutos) en cítricos y drupáceas (29). Los calentamientos intermitentes (5 a 48 horas a 20°C, 1 ó 2 veces por semana) han sido eficaces en la reducción de daños por frío en ciruela

(6), aguacate (18), pomelo (13), naranja (13) y mandarina (13, 16). Es importante optimizar la relación tiempo-temperatura para normalizar los desequilibrios reversibles del estrés de frío durante el periodo de latencia (12, 26).

Algunos tratamientos químicos previos, con calcio (en aguacate, melocotón, manzana) (1, 25), escualeno (pomelos) (19), benzimidazoles (cítricos, fruta de hueso) (26, 29), poliaminas (manzanas), (27) o paclobutrazol (semillas de pepino) (28) han reducido las lesiones de frío en la conservación refrigerada posterior.

Utilización de atmósferas modificadas

La utilización de atmósferas modificadas 2–4% O₂ y 5–7% CO₂ disminuye notablemente la respiración y retrasa la maduración y la pérdida de resistencia al ataque de microorganismos. La acción directa sobre el patógeno sólo es perceptible con concentraciones de O₂ inferiores al 2% y de CO₂ superiores al 10–15% (10). Atmósferas con bajo contenido en O₂ (LO <1,8% y ULO <1,3%) exigen adecuada dotación de descarbonatadores para mantener niveles muy bajos de carbónico, alta estanqueidad y rapidez en el enfriamiento y puesta a régimen de la cámara. Se están aplicando con éxito en frutos de pepita (5). La adición de CO₂ (10–15%) al aire, se usa en el transporte de cerezas y fresas para evitar ataques de *Botrytis cinerea* y *Monilia fructigena*. Pretratamientos con CO₂ (10–40%) durante 2–7 días, son eficaces en la frigoconservación convencional de aguacates, cítricos y drupáceas (8, 23). Los pretratamientos con CO₂ seguidos de conservación en atmósfera controlada pueden ser beneficiosos en manzanas, peras, kiwis y otras drupáceas. La adición de monóxido de carbono (CO) 10% a la atmósfera con control de oxígeno y carbónico potencia el efecto fungicida, si bien las instalaciones plantean problemas de seguridad por la toxicidad del CO (10).

Las envolturas plásticas individuales aplicadas antes de la frigoconservación, disminuyen las lesiones de frío en limones, naranjas, aguacates, pomelos o melones, debido al mejor mantenimiento de la integridad de las membranas celulares bajo la microatmósfera de saturación (14, 18). También eliminan la contaminación adyacente y ambiental. Sin embargo, la microatmósfera de alta humedad favorece el desarrollo de hongos como *Alternaria*, *Botrytis* o *Geotrichum*, y sobre todo de bacterias. En conjunto, en algunos frutos como nectarinas o mangos el podrido total puede aumentar con el uso de envolturas individuales (14).

Bibliografía

1. Chapling, G. R., Scott, K. J. (1980). Association of calcium in chilling injury susceptibility of stored avocados. Hort. Science **15**, 514–515.
2. Chen, N. M., Paull, R. D. (1986). Development and prevention of chilling injury in papaya fruit. J. Am. Soc. Hort. Sci. **111**, 639–643.
3. Come, D. (1992). Altération des produits végétaux entreposés. Rev. Gen. Froid **5**, 56–62.
4. Del Rio, M. A., Ragone, M. L., Cucurella, J. (1982). Effects of postharvest curing at high temperature on decay and quality of “Marsh” grapefruits and “Navel” oranges. Proc. Int. Soc. Citriculture **3**, 1081–1083.
5. Forney, C. F., Lipton, W. J. (1990). Influence of controlled atmospheres and packing on chilling sensitivity. In Wang, C. Y. (ed.), Chilling Injury in Horticultural Crops, pp. 257–267. CRC Press, Boca Raton.

6. Hatton, T. T. (1990). Reduction of chilling injury with temperature manipulation. *In* Wang, C. Y. (ed.), *Chilling Injury in Horticultural Crops*, pp. 269–280. CRC Press, Boca Raton.
7. Hirose, T. (1985). Effects of pre and interposed warming on chilling injury, respiratory rate and membrane permeability of cucumber fruits during cold storage. *J. Japn. Soc. Hort. Sci.* **53**, 439–443.
8. Iwata, T., Yoshida, T. (1979). Chilling injury to fruit of Japanese apricot (*Prunus mume*) and preventive measures. *St. Inst. Hort. Kyoto Univ.* **9**, 135–140.
9. Jones, R. L., Freebairn, H. T., McDonald, J. L. (1978). The prevention of chilling injury, weight loss reduction and ripening retarding in banana. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **103**, 219–221.
10. Kader, A. (1992). *Postharvest technology of horticultural crops*. Cooperative Extension Univ. California. Special publication 3311.
11. Lyons, J. M., Raison, J. K., Steponkus, P. L. (1980). *The plant membrane response to low temperature stress in crop plants*. Academic Press, London and New York.
12. Marcellin, P., Ulrich, R. (1983). Comportement des fruits et légumes en conditions modulées et programmées. *Int. J. Refrig.* **6**, 329–336.
13. Martínez-Javega, J. M., Mateos, M., Cuquerella, J., Navarro, P. (1987). Improving storage life of citrus fruit by temperature management. XVII Int. Cong. of Refrig. Wien. Vol. C, 321–326.
14. Martínez-Javega, J. M. (1990). Recent researches in the application of individual seal packaging in fruits and vegetables. *Actas del III Congreso Int. Tecnología y Desarrollo Alimentarios, Murcia*, **2**, 429–435.
15. Martínez-Javega, J. M., Cuquerella, J. (1990). Respuesta del limón “Verna” al tratamiento de cuarentena por frío con vistas a la exportación al Japón. I Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, Lisboa, **III**, 28–33.
16. Martínez-Javega, J. M., Saucedo, C., Del Río, M. A., Mateos, M. (1992). Influence of storage temperature and coating on the keeping quality of “Fortune” mandarins. *Proc. Int. Soc. Citriculture* **3**, 1102–1103.
17. Martínez-Javega, J. M., Cuquerella, J., Del Río, M. A., Navarro, P. (1993). High temperature conditioning of “Fortune” mandarins to reduce chilling injury during low temperature storage. *Institut International du Froid. Reunion Commune des Commissions C2, D1, D2/D3. Fès, Royaume du Maroc*, in press.
18. Mateos, M., Del Río, M. A., Martínez-Javega, J. M., Navarro, P. (1990). Efecto de las envolturas plásticas individuales, calentamientos intermitentes y pretratamientos con CO₂ en la conservación de aguacate “Hass”. *Actas de Horticultura* **2**, 404–409.
19. Nordby, A. E., MacDonald, R. E. (1991). Relationship of epicuticular wax composition of grapefruit to chilling injury. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 957–962.
20. Picha, D. H. (1986). Postharvest fruit conditioning reduces chilling injury in watermelons. *Hort. Science* **21**, 1407–1409.
21. Salveit, M. E., Morris, L. L. (1990). Overview on chilling injury of horticultural crops. *In* Wang, C. Y. (ed.), *Chilling Injury in Horticultural Crops*, pp. 3–15. CRC Press, Boca Raton.
22. Spalding, D. A., Reeder, W. F. (1983). Conditioning of “Tahiti” limes to reduce chilling injury. *Proc. Fla. State Hort. Sci.* **96**, 231–234.
23. Truter, A. B., Eksteen, E. J. (1987). Controlled and modified atmosphere to extend storage life of avocados. *South African Avocado Growers’ Association Yearbook* **10**, 151–153.
24. Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *8 Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Molec. Bio.* **42**, 576–620.
25. Wade, N. L. (1981). Effect of storage atmosphere, temperature and calcium on low temperature injury of peach fruits. *Scientia Horticulturae* **15**, 145–154.
26. Wang, C. Y. (1991). Reduction of chilling injury in fruits and vegetables. *Postharvest News Inform.* **2**, 165–168.
27. Wang, C. Y., Kramer, G. F. (1990). Polyamines reduce chilling injury in “McIntosh” apples and “Zucchini” squash. *Hort. Science* **25**, 1096–1098.
28. Whitaker, B. D., Wang, C. Y. (1987). Effect of paclobutrazol and chilling on leaf membrane lipids in cucumber seedlings. *Physiol. Plantarum* **70**, 404–411.
29. Wild, B. L. (1990). Hot dip treatments reduce chilling injury during storage at 1°C. *Food Res. Quarterly* **50**, 36–41.

Control biológico en la conservación de frutas de pepita

Inmaculada Viñas

Área de Postcosecha, Centro R+D de Lleida, UdL-IRTA

Recibido 12 diciembre 1994/Aceptado 5 febrero 1995

Summary

Fresh fruits are susceptible of be attacked by several pathogenic fungi after harvest due to both their high water and nutrients content and their loss of most of the intrinsic resistance that protected them over their development while attached to the plant. Most rot pathogens can be controlled by various methods such as refrigeration, controlled atmospheres and fungicides. Biological control strategies are emerging as promising alternatives to the use of synthetic fungicides. Several factors must be considered for the selection of biocontrol agents to be used against postharvest fruit diseases. Survivability of the antagonist is a major factor to determine its usefulness. Antagonists must survive and be effective after their exposure to both postharvest treatments and storage conditions. Several antagonistic microorganisms have been found that can effectively inhibit postharvest diseases. Just as there is a diversity among microorganisms, there is also a diversity of mechanisms by which they operate. Although in most cases these mechanisms have not been satisfactorily elucidated, they are likely to involve antibiosis, nutrient competition, stimulation of host defense, predation and parasitism. In many cases, probably more than one mechanism operate. The marketing of some of these antagonists may be feasible and they could be an alternative to synthetic pesticides.

Key words: biological control, postharvest diseases, antagonists

Resumen

La fruta fresca es susceptible al ataque de hongos patógenos después de su recolección debido a su alto contenido en agua y nutrientes, y por la pérdida de la resistencia intrínseca que la protege durante

su desarrollo en el árbol. La mayoría de las podredumbres fúngicas son controladas por varios métodos tales como la refrigeración, las atmósferas controladas y los fungicidas. El control biológico surge como una prometedora alternativa al uso de fungicidas sistémicos. En la lucha contra las enfermedades de postcosecha de fruta deben ser considerados una serie de factores en la selección de los agentes de biocontrol. Un factor importante en su efectividad es la capacidad de supervivencia. Los antagonistas deben sobrevivir y ser efectivos después de la exposición a los tratamientos de postcosecha y en las condiciones de almacenamiento. Diversos microorganismos antagonistas presentan capacidad de inhibir eficazmente las enfermedades de postcosecha. Al igual que existe diversidad en los microorganismos, existe también diversidad en los mecanismos de acción. Aunque la mayoría de esos mecanismos no han sido aclarados satisfactoriamente, probablemente implican antibiosis, competición de nutrientes, estimulación de la defensa del huésped, depredación y parasitismo. Es muy probable que, en muchos casos, intervenga más de un mecanismo. La comercialización de algunos antagonistas es factible y puede presentarse como una alternativa a los plaguicidas sintéticos.

Introducción

La producción frutícola española es muy importante y los problemas relacionados con su conservación tienen un interés extraordinario. La problemática biotecnológica motivada por esta alta producción es afrontada actualmente mediante: refrigeración, atmósferas modificadas, medios de transporte rápidos y con tratamientos post-recolección a base de productos químicos de síntesis.

La fruta de pepita, al ser un producto perecedero, precisa de una tecnología lo más adecuada posible para su conservación, preservándose en el tiempo sus características organolépticas, así como su apariencia en frescura, color y tersura.

Los mohos son los principales agentes causantes de podredumbres en la fruta de pepita conservada en cámara frigorífica. *Penicillium expansum* es la especie más importante, con un porcentaje del 70–80% del total; en España causa pérdidas económicas cercanas a los 1000 millones de pesetas anuales. La utilización de productos químicos de síntesis es el sistema más usado para el control de las podredumbres fúngicas. No obstante, actualmente cada vez son mayores las objeciones de orden higiénico-sanitario que éstos plantean ya que los fungicidas se presentan como potenciales agentes oncogénicos.

Debido al grave problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana, los diferentes países, y en especial los más desarrollados, han establecido una serie de límites máximos de residuos (LMR) bastante restrictivos, en muchos casos por debajo de los recomendados por el «Codex Alimentarius» (FAO/OMS).

La Unión Europea, sensible a esta problemática, determinó en su Consejo del 27 de noviembre de 1990 (L 350/71) que una serie de plaguicidas que son perjudiciales para los consumidores, no podrán ser utilizados cuando presenten un riesgo para la salud humana. Así mismo, en 1991 el Parlamento Europeo votó a favor de la total prohibición de los tratamientos con plaguicida de frutas y verduras en postcosecha, tan pronto como se presentaran alternativas económicamente viables.

Existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos y efectivos métodos de control de las enfermedades de postcosecha, que sean aceptados por el consumidor y que no supongan un riesgo para la salud humana y el ambiente. El uso de técnicas no químicas y tratamientos con fungicidas no selectivos

serán en el futuro respuesta para una parte de esta necesidad. La reducción del inóculo fúngico en la Central Hortofrutícola, a través de una buena desinfección y el uso de fungicidas no selectivos (carbonato sódico, bicarbonato sódico, clorina activa y ácido sórbico), pueden disminuir de forma significativa el riesgo a causa de enfermedades fúngicas.

Técnicas de conservación y manejo que minimicen el daño a la fruta, utilizando condiciones de almacenamiento óptimas para mantener la resistencia del huésped, serán también de ayuda para suprimir el desarrollo de las enfermedades fúngicas. Además de los métodos indicados, el control biológico se presenta como una alternativa muy prometedora al control químico.

El término Control biológico o Biocontrol de enfermedades ha experimentado desde el comienzo de su utilización cambios en cuanto a su contenido y definición. La más aceptada actualmente es la indicada por Baker (1), que define al control biológico como la reducción del inóculo o de la actividad productora de enfermedad del patógeno, debido a uno o más organismos, incluida la planta huésped y excluido el hombre. De esta definición se desprenden un gran número de posibles vías a explorar en la búsqueda del control de las enfermedades de postcosecha de frutas y verduras (23). Éstas son:

1. Uso de microorganismos antagonicos.
2. Uso de fungicidas naturales derivados de metabolitos de la planta.
3. Manipulación de la resistencia en productos recolectados.

Microorganismos antagonicos como agentes de biocontrol

Para controlar las enfermedades de postcosecha mediante la utilización de microorganismos antagonicos existen dos posibles vías. Podemos estimular y manejar antagonistas que ya existen sobre la superficie del fruto, o bien podemos introducir artificialmente antagonistas contra los patógenos.

Se ha demostrado que existen antagonistas naturales en la filosfera y rizosfera de plantas que pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad (2, 22). También se ha sugerido que ciertas poblaciones microbianas sobre la superficie de plantas, pueden en realidad estar bajo el control genético de la planta. Si éste es el caso, existe la posibilidad de que nosotros podamos manejar tales poblaciones con el objetivo de modificar la genética del huésped (23).

Existen tres factores por los que la utilización de antagonistas introducidos artificialmente en el ambiente de postcosecha puede constituir un área excepcionalmente productiva. Primero, una de las principales razones del fracaso de los agentes de biocontrol en el pasado ha sido la incapacidad para controlar las condiciones ambientales. Bajo las condiciones de almacenamiento de los productos recolectados, las condiciones ambientales están controladas. Segundo, es a menudo difícil dirigir los agentes de biocontrol hacia los lugares efectivos. Los productos recolectados no presentan este problema ya que las áreas de aplicación de los agentes de biocontrol son más limitadas de lo que puedan ser las plantas completas, haciendo más fácil dirigir tales agentes. Tercero, el alto valor que tienen los productos recolectados puede hacer que la aplicación de los agentes de biocontrol sea económicamente factible, aunque su coste sea superior a los procedimientos habituales.

Mecanismos de acción del antagonista sobre el patógeno

Conocer y comprender el modo de acción de los antagonistas es importante, por dos razones:

1. Permite un desarrollo más seguro de los procesos de aplicación de los antagonistas conocidos.
2. Proporciona una base segura para seleccionar nuevos antagonistas efectivos.

Modos de acción de los antagonistas

(i) Competencia por los nutrientes y/o el espacio. Los antagonistas están mejor adaptados a las condiciones adversas del medio que los patógenos. El antagonista ha de mostrar un rápido crecimiento, y ha de ser capaz de utilizar nutrientes a bajas concentraciones. Tiene que sobrevivir y desarrollarse en la superficie del fruto o en el lugar de infección, a bajas temperaturas y pH o en condiciones osmóticas que no son beneficiosas para el crecimiento del patógeno. Normalmente inhibe al patógeno pero no lo destruye.

(ii) Secreción de antibióticos. Se trata de un fenómeno frecuente en la naturaleza, que tiene un papel importante en la protección de las enfermedades, antes y después de la recolección.

Un claro ejemplo de este mecanismo de acción es la producción por *Pseudomonas cepacia* del antibiótico pirrolnitrina, que controla el desarrollo de algunos patógenos en diferentes frutos (17, 21).

(iii) Inducción de mecanismo de resistencia en el huésped. Durante la interacción del agente de biocontrol y el huésped se han observado procesos de desarrollo de resistencia en el huésped. Así, cuando se inocula una suspensión de células de la levadura antagonista US-7 en la superficie del pomelo, la producción de etileno aumenta, fenómeno que no se observa cuando no hay antagonista en la herida (24).

Un antagonista efectivo puede inducir resistencia al huésped indirectamente provocando cambios químicos y/o osmóticos a favor del antagonista favoreciendo el control del patógeno (17).

(iv) Interacción directa con el patógeno. Los antagonistas fúngicos como *Trichoderma* sp. atacan a los patógenos *Botrytis* sp. (24). Igualmente, las bacterias inhiben el hongo produciendo la lisis de sus esporas, tubos germinativos o hifas. Un ejemplo es *Bacillus pumilus* que actúa sobre los tubos germinativos, incluso después de un tratamiento en autoclave lo que indica que el agente causal de la lisis no es una enzima (3).

Ventajas del control biológico con antagonistas en relación con otros sistemas

Las principales ventajas del control mediante antagonistas en relación con otros sistemas de lucha se pueden resumir en:

1. Son más seguros en comparación con los principales productos químicos utilizados actualmente, ya que los microorganismos no se acumulan en los alimentos. Pero el ensayo de la inocuidad de algunos microorganismos es muy caro y ésta ha sido hasta el momento una importante limitación en la utilización de algunos agentes en la lucha biológica (9).

2. Los microorganismos utilizados como agentes de control, pueden ser más persistentes a lo largo del tiempo que los productos químicos, ya que los primeros no alteran de manera sustancial los principales aspectos del patógeno. Pero no se puede aplicar en todos los casos.

3. Los agentes microbianos producen un efecto insignificante en el balance ecológico, particularmente porque no destruyen a los enemigos naturales de las especies patógenas, a diferencia de algunos plaguicidas que además favorecen la aparición de nuevas enfermedades (10). También pueden producir el efecto "boomerang", en el cual los patógenos surgen con más fuerza que antes de utilizar el pesticida (9).

4. La utilización de microorganismos en el control de las enfermedades es muy a menudo comparable con los otros sistemas de lucha, incluidos los productos químicos (11).

Características de un antagonista ideal

A la hora de seleccionar un microorganismo como agente para el control biológico en postcosecha, además de estudiar su poder inhibitorio se deben tener en cuenta muchas otras características (23):

1. Estabilidad genética (2).
2. Efectividad a bajas concentraciones.
3. Poca exigencia en cuanto a requerimientos nutricionales (incluidas las bajas temperaturas y el almacenamiento bajo condiciones controladas).
4. Efectividad en un gran número de patógenos y para diversas frutas y vegetales.
5. Capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos.
6. Formulación estable en el tiempo.
7. Facilidad de aplicación.
8. No productor de metabolitos secundarios que sean tóxicos para personas y animales.
9. Resistencia a los plaguicidas.
10. Compatibilidad con otros tratamientos químicos o físicos.
11. No patógeno sobre el huésped.

Todo antagonista en potencia ha de tener pues la habilidad de colonizar y persistir con comodidad a niveles efectivos, ser compatible con otras prácticas, procesos y productos químicos de postcosecha y ser efectivo a bajas temperaturas y, en algunos casos, en condiciones de atmósfera controlada. Además, el organismo ha de ser producible a gran escala utilizando productos de bajo coste. Si se cumplen todas las condiciones, los microorganismos serán potencialmente comercializables.

Los antagonistas en atmósferas controladas

Las frutas están sometidas a un amplio margen de condiciones de almacenamiento para detener las alteraciones fisiológicas y microbianas. Una variedad de ambientes son creados y mantenidos para

conseguir este fin, incluyendo la refrigeración y las atmósferas modificadas/controladas. Aunque las enfermedades de postcosecha pueden ser reducidas al modificar las condiciones de almacenamiento, los tratamientos con fungicidas son todavía de gran importancia para reducir de forma eficaz las podredumbres fúngicas. El uso de microorganismos antagonistas como sustitutivos de los fungicidas bajo esas condiciones presenta algunos retos y oportunidades únicas, que a continuación se tratan.

La composición de las poblaciones microbianas epifíticas en los frutos recolectados a la entrada de la central hortofrutícola puede influir en su almacenamiento, y los tratamientos de pre-almacenamiento pueden afectar profundamente a tales poblaciones.

Los patógenos varían en su adaptabilidad a las diferentes condiciones de almacenamiento. En la selección de los antagonistas es preciso elegir aquellos mejor adaptados a la supervivencia y crecimiento sobre el fruto, y las superficies de vegetales y las heridas bajo condiciones de almacenamiento, y que tengan una ventaja adaptativa sobre determinados patógenos específicos. Por ejemplo, *Rhizopus stolonifer* es más sensible a las bajas temperaturas que muchos microorganismos, por tanto, un antagonista bien adaptado a estas temperaturas puede presentar ventajas contra este patógeno.

La adaptabilidad de los patógenos y antagonistas necesita ser examinada bajo condiciones ambientales específicas como las que se presentan en atmósferas de almacenamiento controladas y modificadas. Los nutrientes que se encuentran sobre la superficie de la planta pueden afectar a la composición y número de microorganismos epifíticos (18). Cuando los frutos y vegetales maduran en almacenamiento, desprenden una serie de nutrientes, sustancias volátiles y otros compuestos secundarios (7). Algunas de esas sustancias químicas pueden actuar favoreciendo el crecimiento microbiano y otras pueden ser biocidas o biológicamente inertes. Si deseamos aplicar de forma efectiva antagonistas para el control de las enfermedades de almacenamiento de frutas y vegetales, necesitamos entender los cambios nutricionales/medio químico que tienen lugar en las superficies de los productos almacenados, y cómo éstos afectan a las interacciones antagonista-patógeno-huésped.

Etapas de un programa de control biológico

Para definir un sistema biológico que controle a una determinada enfermedad se han de considerar muchos factores. Entre otros podemos citar la capacidad de mantenerse por sí mismo en la planta, y en qué condiciones ambientales se adaptará mejor y podrá obtener unos niveles de población suficientes para competir con la microflora existente (4).

Para que un microorganismo se convierta en un agente de control biológico y se pueda comercializar, como un producto más, han de seguirse una serie de investigaciones y pautas costosas:

(i) Aislamiento de los microorganismos. La primera fase del programa corresponde a la recogida masiva de los posibles antagonistas, los cuales con posterioridad serán ensayados con el fin de evaluar su potencial capacidad inhibitoria frente a los principales patógenos.

El aislamiento de los microorganismos se realiza a partir de la planta a proteger o de su entorno más inmediato. Ya que en el biocontrol, los antagonistas residentes en la superficie de la fruta pueden tener ciertas ventajas sobre los antagonistas casuales, tanto en el crecimiento, como en la colonización y la supervivencia (2, 6). En el caso de las enfermedades de postcosecha este aislamiento se realiza tanto en campo como durante el período de almacenamiento en la cámara frigorífica.

(ii) Selección de los microorganismos. Una vez aislados los microorganismos, la fase siguiente se corresponde con la selección de los mejores antagonistas mediante la realización de diversos sistemas de evaluación. Todos estos ensayos se basan en comprobar la capacidad de los microorganismos de interferir el crecimiento del patógeno, o bien reducir el desarrollo de la enfermedad.

Mediante estos ensayos se pretende determinar la existencia de capacidad antagonista y una vez descubierta ésta, se determina la concentración mínima inhibidora hacia los principales patógenos.

(iii) Pruebas posteriores. Después del ensayo de la capacidad inhibidora, el siguiente paso es estudiar de forma exhaustiva los mecanismos de inhibición, la biología de los microorganismos, su adaptabilidad a las condiciones ambientales (en el caso de postcosecha: frío normal y atmósfera controlada), la compatibilidad de los antagonistas con otros tratamientos, etc.

Todos estos ensayos es recomendable hacerlos a pequeña escala, para con posterioridad realizarlos a escala comercial (14).

Finalmente se tendrá que estudiar la toxicología del antagonista, así como su estabilidad y las diferentes formulaciones para su posterior aplicación comercial.

Situación actual del control biológico

Actualmente uno de los agentes microbianos más utilizados en lucha biológica en campo, son algunas cepas del género *Trichoderma*, ya que es un microorganismo de muy rápido crecimiento y con pocos requerimientos nutricionales y ambientales.

La fruta almacenada en cámaras frigoríficas representa una buena oportunidad para la aplicación del control biológico de las enfermedades en postcosecha, ya que la fruta se encuentra bajo condiciones ambientales controladas, tanto en lo que respecta a la humedad relativa, como a la temperatura y a la concentración de gases.

La dosis y la frecuencia de aplicación del antagonista dependen de su habilidad para interrumpir el ciclo de la enfermedad, la supervivencia del antagonista, el tipo de propágulos utilizados (células vegetativas, esporas, etc.) y los cambios en la susceptibilidad del fruto a la enfermedad. Los métodos de aplicación del antagonista pueden ser por baño o ducha, previa a la entrada de la fruta en cámara frigorífica, de idéntica manera a los sistemas utilizados en el control químico.

La bibliografía existente en el campo de la lucha biológica de las enfermedades de postcosecha en fruta de pepita es reducida. Recientemente han aparecido algunos estudios que abordan este tema (Tabla 1), pudiéndose destacar los obtenidos en manzana y pera (12–15).

Todos coinciden en afirmar que la supervivencia del antagonista y su efectividad, después de exponerlo a los tratamientos normales de postcosecha y bajo las condiciones ambientales de frigoconservación, son los factores que mayoritariamente determinan su utilización. También es muy importante su capacidad para colonizar la superficie de la herida.

Aunque los trabajos más avanzados en el control biológico de las enfermedades en postcosecha de la fruta de pepita, realizadas por Janisiewicz, apuntan a la utilización de bacterias y en concreto del género *Pseudomonas* (12–15). Otros estudios muy recientes, indican el interés de las levaduras como buenos antagonistas, al ser éstos los microorganismos más abundantes en la superficie de la fruta

TABLA 1. Antagonistas eficaces en el biocontrol de podredumbres en fruta de pepita

Fruta	Podredumbre	Agente causante	Agente biocontrol	Referencia
Manzana	Azul	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	12
			<i>Pseudomonas cepacia</i>	15
			<i>Cryptococcus</i> sp.	20
			<i>Pichia guilliermondii</i>	17
	Gris	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	25, 17
			<i>Pseudomonas cepacia</i>	15
			<i>Candida laurenti</i>	20
			<i>Acremonium breve</i>	13
De <i>Mucor</i>	<i>Mucor</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	15	
Pera	Azul	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	15
	Gris	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	15
	De <i>Mucor</i>	<i>Mucor</i>	<i>Candida albidus</i> , <i>C. flavus</i> y <i>C. laurentii</i>	20

almacenada en cámara frigorífica (5, 8). A este respecto, Roberts (20, 21), ha obtenido unos resultados muy prometedores con cuatro cepas de levaduras del género *Cryptococcus*, aisladas a partir de hojas y frutos de manzanas y peras que conservan su capacidad antagónica en las condiciones ambientales propias de atmósfera controlada frente a *Botrytis cinerea*. Así mismo, estudios realizados con dos cepas del género *Candida* (17) demuestran que éstas presentan cierta capacidad inhibitoria sobre *Botrytis cinerea* aunque es casi nula sobre *Penicillium expansum*.

Perspectivas

Los microorganismos antagónicos se pueden considerar “fungicidas vivos” en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. La trayectoria que se debe seguir desde el laboratorio a su producción comercial tiene varios obstáculos económicos y biológicos.

El mercado potencial de los antagonistas es enorme, lo que justifica la investigación y desarrollo necesario para lograr su comercialización. Sin embargo, la especificidad de un antagonista puede limitar su comercialización desde el punto de vista económico, incluso aunque éste sea altamente eficaz. Pero éste no es un serio inconveniente debido a que la creciente retirada de los fungicidas sintéticos del mercado, ha hecho reconsiderar la utilización de nuevas alternativas. En los sistemas de postcosecha, la investigación sobre el manejo de poblaciones de antagonistas en frutos, especialmente en heridas, es esencial para poder hacer predicciones sobre el comportamiento de los agentes utilizados en control

biológico. Parece posible incrementar la efectividad de los antagonistas, mediante la aplicación de determinados nutrientes en los frutos y la manipulación de las condiciones de almacenaje (16). Igualmente, una vez identificados los factores clave que gobiernan la capacidad inhibitoria de los antagonistas, se podría utilizar la ingeniería genética para mejorar el sistema, por ejemplo insertar los genes responsables de la producción de metabolitos antifúngicos a otros microorganismos con una mayor capacidad de supervivencia y colonización en fruta y en las condiciones de almacenamiento en postcosecha.

La comercialización de un antagonista requiere de una especial tecnología que combina los métodos de control biológico y las técnicas de procesado del producto. Así, Pusey et al. (19) fueron capaces de incorporar el antagonista *Bacillus subtilis* en la cera comercial utilizada normalmente en la línea de procesado del melocotón. En pruebas piloto, el control fue similar al control obtenido con el fungicida benomilo.

En ocasiones, la integración o pequeña modificación de los procedimientos del proceso pueden hacer al biocontrol más atractivo y económico como alternativa de control. McLaughlin et al. (17) demostraron que la adición de cloruro cálcico a la suspensión de levaduras mejora la habilidad de las levaduras para el control de varias enfermedades de postcosecha de manzanas. Este método modificado, reduce la cantidad de biomasa de levaduras necesaria para el control.

El registro y etiquetado de los microorganismos antagónicos para el control de las enfermedades de postcosecha, plantea problemas para los responsables del registro de plaguicidas. Hay que evaluar la toxicidad potencial y la patogenicidad de los antagonistas y de cada uno de los componentes que constituyan la formulación, aplicada a los alimentos. Todos los componentes tienen que ser inocuos para el hombre.

¿Cómo aceptará el consumidor la aplicación de estos microorganismos antagónicos en los alimentos? La presencia de microorganismos vivos en un alimento no es nuevo. Desde tiempos muy antiguos, la adición y fermentación por microorganismos ha sido un importante método de conservación. La incorporación de microorganismos iniciadores ("starters") en el procesado del pan y productos lácteos es universalmente aceptada. Por lo que los consumidores no tendrán ningún inconveniente en la utilización de los agentes microbianos, si éstos demuestran su inocuidad y son una alternativa eficaz a los fungicidas sintéticos

Bibliografía

1. Baker, K. F. (1987). Evaluating concepts of biological control of plants pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 67–85.
2. Blakerman, J. P. (1985). Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. *In* Windles, C. E., Lindow, S. E. (ed.), *Biological Control on the Phylloplane*, pp. 6–29. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN.
3. Blakerman, J. P., Brodie, D. S. (1976). Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. *In* Dickinson, C. H., Preece, T. F. (ed.), *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*, pp. 529–557. Academic Press, London.
4. Blakerman, J. P., Fokkema, N. J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**, 167–192.

5. Bowen, J. F., Beech, F. W. (1964). The distribution of yeast on cider apples. *J. Appl. Bacteriol.* **27**, 333–341.
6. Cook, D. G., Baker K. F. (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogen.* Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN.
7. Culter, H. G., Steverson, R. F., Cole, P. D., Jackson, D. M., Johnson, A. W. (1986). Secondary metabolites from higher plants. Their possible role as biological control agents. *ACS Symp. Ser.*, pp. 178–196. Amer. Chem. Soc., Washington.
8. Davenport, R. R. (1976). Distribution of yeast and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. *In* Dickinson, C. H., Preece, T. F. (ed.), *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*, pp. 325–359. Academic Press, New York.
9. Deacon, J. W. (1983). *Microbial Control of Plant Pests and Diseases.* Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., United Kingdom.
10. Griffiths, E. (1981). Iatrogenic plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **19**, 69–82.
11. Grossman, J. (1990). Compatibility of Pesticides and Biocontrols. *Agrochemical Ag.* December, 20–26.
12. Janisiewicz, W. J. (1987). Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Phytopathology* **77**, 481–485.
13. Janisiewicz, W. J. (1988). Biocontrol of post-harvest diseases of apples with antagonists mixtures. *Phytopathology* **78**, 194–198.
14. Janisiewicz, W. J. (1990). Biological Control of Postharvest Fruits Diseases. *In* Arora, D.K. (ed.), *Handbook of Applied Mycology*, vol I, pp. 301–325. Marcel Dekker Inc., New York.
15. Janisiewicz, W. J., Roitman, J. (1988). Biological control of blue-mold and gary-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* **78**, 1697–1700.
16. Janisiewicz, W. J., Usall, J., Bors, B. (1992). Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology* **82**, 1364–1370.
17. McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L., Chalutz, E. (1990). Effect of inoculum concentration and salts solutions on biological control of postharvest diseases of apples with *Candida* spp. *Phytopathology* **80**, 456–461.
18. Morris, C. E., Rouse, D. I. (1985). Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations. *In* Windels, C. E., Lindow, S. E. (ed.), *Biological Control of the Phylloplane*, pp. 63–82. Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, MN.
19. Pusey, L., Wilson, C. L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* **68**, 753–756.
20. Roberts, R. G. (1990a). Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* **80**, 526–530.
21. Roberts, R. G. (1990b). Biological control of mucor rot of pear by *Cryptococcus laurentii*, *C. flavus* and *C. albidus*. *Phytopathology* **80**, 1051.
22. Spurr, H. W., Knudsen, G. R. (1985). Biological control of the Phylloplane. *In* Windels, C. E., Lindow, S. E. (ed.), *Biological control of leaf diseases with bacteria*, pp. 45–62. Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, MN.
23. Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. (1989). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Ann. Rev. Phytopathol.* **27**, 425–441.
24. Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Biles, C. L., McLaughlin, R., Chalutz, E., Droby, S. (1991). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection* **10**, 172–177.
25. Wisniewski, M. Wilson, C. L., Chalutz, E. Heinsenber, W. (1988). Biological control of postharvest diseases of fruit inhibition of *Botrytis cinera* rot on apples by an antagonistic yeast. *Proc. Electron Microscopy Soc. Amer.* **46**, 290-291.

Revisión de libros

Atlas of Clinical Fungi

G. S. Hoog, J. Guarro (ed.)

*Centraalbureau voor Schimmelcultures/
Universitat Rovira i Virgili, 1995. 720 pp.
ISBN 90-70351-26-9*

El mundo de los hongos ha despertado desde antiguo la curiosidad de muy diversas personas, debido a su variedad y múltiples características. En el contexto de diferentes culturas, sus propiedades alucinogénicas han tenido una gran importancia, y la siguen teniendo todavía, aunque hayan perdido el valor esotérico que se les atribuía. Otro tipo de interés es el que despiertan sus propiedades culinarias, por otra parte no exentas de riesgo. Por ejemplo, y sin ir más lejos, en la península Ibérica existe una clara división entre culturas micófilas y micóforas. Y llegamos así hasta el interés de los científicos preocupados por descubrir su posición taxonómica con respecto a los demás organismos eucarióticos. Recientes estudios de Mitchell L. Sogin, del Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, EE. UU., confirman la adscripción de los hongos a un grupo separado de organismos (distinto de las plantas y de los animales) y, además, más cercano filogenéticamente a los segundos que a las primeras. En cualquier caso, el conocimiento sobre la diversidad taxonómica de los agentes fúngicos parece estar en aumento continuo.

Desde el punto de vista del microbiólogo clínico, los hongos han tenido siempre un signifi-

cado especial. Ha sido necesario estudiarlos profundamente para reconocerlos, identificarlos, establecer la correspondencia etiológica y buscar la terapéutica. Con el aumento espectacular (y dramático, valgan aquí estos dos adjetivos, frecuentemente confundidos en el “Spanglish” habitual de nuestros artículos científicos) del número y tipos de los pacientes inmunodeprimidos, el campo de la micología clínica esta creciendo en importancia y complejidad. Por una parte, hongos que fueron en el pasado poco conocidos, o considerados saprófitos inoocuos, son hoy responsables de infecciones graves. Por otra, hongos patógenos que se consideraba que infectaban sólo lugares específicos, como el tejido subcutáneo, causan ahora enfermedades significativas en otras zonas del cuerpo y, a veces, llegan a ser sistémicos.

La reciente publicación del nuevo *Atlas of Clinical Fungi*, dirigido por G. S. De Hoog y J. Guarro, supone una contribución esencial al conocimiento, estudio e identificación de los hongos de importancia clínica. El libro, magníficamente editado, es una impresionante obra que reúne la experiencia de los directores, y otros especialistas, para conseguir una descripción breve y precisa de los principales hongos de interés clínico. Tal como explican los directores de la obra, el reconocimiento de estos organismos, y su creciente importancia patológica, hacen necesario profundizar en la experiencia y conocimientos taxonómicos en el laboratorio de microbiología clínica, ya que la mayor parte de los hongos se

siguen clasificando todavía mediante criterios morfológicos. Una identificación incorrecta tiene un efecto negativo sobre el conocimiento de las micosis correspondientes, lo cual, a su vez, afecta el tipo de tratamiento a aplicar. Por otra parte, la identificación de patógenos poco frecuentes se hace a menudo por comparación de los aislados obtenidos con las listas publicadas en los principales manuales de micología médica. Pero este procedimiento cuenta con la dificultad de que esas listas son incompletas.

El *Atlas* de hongos de importancia clínica intenta resolver esas dificultades, o al menos ayudar a superarlas. La obra se propone como objetivo principal ilustrar la gran diversidad de los agentes fúngicos patógenos. Aunque (como advierten los directores) los agentes más comunes, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* o *Aspergillus fumigatus*, son tratados brevemente (pero se remite a los interesados a los manuales más utilizados), los oportunistas raros, con los que no suelen estar familiarizados los clínicos, merecen en el libro una atención especial.

El *Atlas* está dividido en dos partes. La primera es similar a los manuales habituales, aunque haciendo hincapié en el reconocimiento en el laboratorio de los agentes etiológicos. La explicación de los métodos de aislamiento e identificación es clara y concisa, proporcionando información tan completa y autorizada que mejora la de manuales más extensos. Las especies más comunes, o de mayor patogeneidad, de cada género, se describen con detalle, y aparecen ilustradas con un dibujo a línea preciso e inconfundible. La segunda parte describe los oportunistas raros, que han sido citados en pocas ocasiones. Dado que los clínicos pueden no estar familiarizados con esos agentes, las ilustraciones consisten en el dibujo a

línea y una lámina con varias fotografías de una nitidez fuera de lo común, realizadas con el microscopio óptico y con el electrónico de barrido. En este último caso, con aumentos inferiores, por lo general, a 10.000 ×.

Cada hongo es descrito mediante las características coloniales (generalmente, a los 10 días de incubación, a temperatura ambiente, y en uno de los medios de cultivo e identificación recomendados). La microscopía del anamorfo (talo asexual) y del teleomorfo (talo sexual) están descritas, en algunas ocasiones, en páginas diferentes. Si se hace así, se aportan las referencias cruzadas. Se dan también los sinónimos de los anamorfos y teleomorfos cuando han sido citados en la bibliografía médica reciente. La patogeneidad de las especies comprobadas se describe brevemente en un capítulo introductorio sobre patología clínica, magníficamente expuesto. Por último, para cada hongo se da una breve bibliografía sobre datos taxonómicos y textos de referencia para ampliar conocimientos.

Como resumen, puede decirse que este *Atlas* es una de las mejores obras que existen hoy en día en su género, que es la más reciente (junto con la de Davis Larone, *Medically Important Fungi. A Guide to Identification*, 3rd. ed., American Society for Microbiology, 1995), y, sin duda, que es una de las más importantes que se han escrito sobre el tema. Es, en fin, una obra valiosa e imprescindible no sólo para cualquier interesado en microbiología clínica, sino también para todas las personas preocupadas, en general, por estudiar la gran variedad de los microorganismos y, en particular, por conocer el amplio y diverso mundo de los hongos.

Ricard Guerrero
Universidad de Barcelona

Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria

G. I. Barrow, R. K. A. Feltham (ed.)
Cambridge University Press, Cambridge, 1993,
3rd. ed. 331 pp. ISBN 0-521-32611-7

Esta tercera edición del *Manual for the Identification of Medical Bacteria* mantiene el carácter de compendio claro y conciso sobre la diagnosis bacteriana de las ediciones anteriores. La adición de nuevos capítulos acerca de la teoría y práctica de la taxonomía bacteriana, incluyendo la utilización de los ordenadores en la identificación y la nomenclatura bacteriana, lo hace aún más apropiado como herramienta de consulta en los laboratorios de diagnosis microbiológica.

Kenneth J. Steel no vio aparecer la primera edición de su manual; murió, a los 34 años, unos meses antes de su publicación en 1965. Su colega Samuel T. Cowan dedicó esa primera edición a su estimado colaborador y amigo. La amplia difusión del manual, así como su enorme utilidad práctica, lo convirtieron en un clásico de la microbiología médica. En 1974, S. T. Cowan, reescribiendo algunos de los capítulos y añadiendo unos apéndices nuevos, volvió a publicar una segunda edición. En esta tercera edición, G. I. Barrow y R. K. A. Feltham recogen, con la ayuda de 15 expertos en diferentes campos, los últimos conocimientos sobre clasificación, nomenclatura e identificación de bacterias de interés médico.

La obra está dividida en dos partes: bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas. En cada parte se describen los diferentes grupos bacterianos y los géneros que los integran. Con gran lujo de detalles, se presentan en las tablas los caracteres fenotípicos que permiten identificar cualquier cepa aislada. Al final del apartado dedi-

cado a cada género, resulta de gran ayuda un escueto resumen de sus características esenciales para la diagnosis.

Además de las dos partes principales, la obra se completa con otros capítulos de gran utilidad práctica. En algunos de ellos se discute la teoría y la práctica de la caracterización, identificación y taxonomía bacterianas. Otros dos capítulos tratan sobre la utilización de los ordenadores y el sistema de tarjetas en la identificación bacteriana. Para finalizar, un último capítulo sobre el control de calidad hace que la obra sea de obligada lectura en el laboratorio de microbiología. Sin embargo, hay que destacar la ausencia de los conceptos e informaciones sobre la taxonomía molecular, que con tanto auge, y tan buenos resultados, está desarrollándose en la actualidad, por lo que las técnicas moleculares para el análisis de ácidos nucleicos están a la orden del día, incluso en la identificación y taxonomía bacterianas.

Los apéndices ocupan aproximadamente un tercio de la extensión total del libro, y constituyen una inestimable ayuda para el trabajo en el laboratorio de microbiología médica. Los apéndices A a E resultan de gran utilidad en la preparación de medios de cultivos, de reactivos de laboratorio, de colorantes para tinciones, e incluso en la realización de pruebas bioquímicas básicas para la identificación de cepas bacterianas. El apéndice F contiene las pautas para la correcta utilización de los ordenadores en microbiología, en especial para la clasificación e identificación. Los apéndices G a I tratan de establecer las bases, de necesario cumplimiento por cualquier persona relacionada con la microbiología, de la nomenclatura de taxones bacterianos. Un sucinto glosario de términos y cerca de 1500 referencias bibliográficas completan los extraordinarios apéndices de esta obra.

Jordi Mas-Castellà
Universidad de Barcelona

Limnology Now

A Paradigm of Planetary Problems

R. Margalef (ed.)

Elsevier Science B. V., Amsterdam, the Netherlands, 1994. 553 pp. ISBN 0-444-89826-3

Cuando una disciplina como la limnología tiene en su haber más de 100 años de existencia, un título como *Limnology Now* avanza por sí solo objetivo y contenido. Ambos quedan de manifiesto en la presentación de la obra (a cargo de R. Margalef y M. Valls) según la cual el libro pretende ofrecer el estado actual del conocimiento de la limnología en general y los objetivos y perspectivas de los más importantes aspectos de esta disciplina.

El libro está formado por las contribuciones de 25 autores, quienes a lo largo de 15 capítulos desgranar su concepción y experiencia de los aspectos de la limnología en los cuales han centrado su actividad. El libro es fruto de la participación de los autores en los prestigiosos cursos de Limnología organizados por el Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza a lo largo de los últimos años.

Un libro realizado a base de las contribuciones de diversos autores, aunque pierde en unidad y ordenación sistemática de los contenidos, suele ganar en perspectiva y profundidad de las materias que trata. La variedad de autores, por otra parte, permite cobijar una pluralidad de conceptos, de enfoques y de metodologías en las materias que se someten a observación y estudio experimental, y en la interpretación de los resultados.

No cabe duda de que una obra de este tipo va dirigida a un público con conocimiento de la materia. No obstante, no es cuestión de presuponer en el estudiante, ya sea de licenciatura, ya sea graduado, la ausencia de la suficiente madurez intelectual que le permita sacar provecho de su

lectura. Nos hemos acostumbrado demasiado, en muchos ámbitos de la enseñanza superior, a graduar el nivel de conocimientos que hay que ofrecer en una escalada absurda, a la par que cómoda, de los contenidos. Sin saberlo, muchas veces se está poniendo límites a la curiosidad, lo que equivale a rebajar la capacidad intelectual y la facultad de decisión personal.

La limnología es definida por W. T. Edmondson como un campo multidisciplinar en el que intervienen todas las ciencias que contribuyen al entendimiento de la naturaleza de las aguas continentales. Entre esas materias, enumera la física, la química, las matemáticas, la biología y las ciencias de la tierra. El largo camino recorrido por la limnología pasa desde su consideración inicial como ciencia que estudiaba los lagos, a su estado actual, en el que incorpora el estudio de los ríos, corrientes y humedales. Margalef se refiere a la limnología como la rama de la ecología que ha experimentado el más rápido desarrollo a lo largo de las últimas décadas, desarrollo que no es tan manifiesto en la variedad de temas que aparecen en las revistas especializadas, como en la preocupación generada por la disminución de la disponibilidad del agua y por la contaminación debida a diferentes agentes. En los aspectos aplicados son varios los autores que subrayan que los programas actuales en investigación limnológica obedecen a la presión social y económica para solucionar esos problemas. Ejemplos de los más "populares" son el descenso de los acuíferos, la contaminación y el suministro de aguas.

Otro punto de interés a destacar en el libro es el concepto en expansión de la ecología global, derivada de las sólidas conexiones detectadas entre la biosfera y la totalidad del planeta. A este respecto, se destaca el papel esencial de las aguas continentales como nexo entre las partes terrestres y oceánicas del planeta. Es innegable que el desarrollo de la ecología global ha constituido un estímulo para el progreso científico, al haber

tomado en consideración las múltiples variables y condiciones que interaccionan, y habiendo conocido los problemas del efecto invernadero, la lluvia ácida, la pérdida de fertilidad del suelo, etc. La multidisciplinariedad inherente al ejercicio de esta ciencia destaca consecuentemente en el tratamiento de los temas del libro.

Aunque el detalle de los capítulos sea largo, puede servir de orientación para que tanto el especialista como el interesado "global" se forme una idea del contenido de la obra, ya que los títulos son suficientemente explicativos y los autores conocidos: *The place of epicontinental waters in global ecology* (Margalef), *Phytoplankton: which, and how much?* (Capblancq, Catalan), *Prokaryotology for the limnologist* (Pedrós-Alió, Guerrero), *Macrophytes, taking control of an ancestral home* (Duarte, Planas, Peñuelas), *Interannual variability in limnic ecosystems: origin, patterns, and predictability* (Catalan, Fee), *Transport processes in lakes: a review* (Imberger), *The structure and dynamics of lotic ecosystems* (Ward), *The tamed river* (Prat, Ward), *Seasonal rhythm and secular changes in Spanish reservoirs* (Armengol, Toja, Vidal), *Chemical composition of lakes in crystalline basins* (Psenner, Catalan), *The high north: present and perspectives* (Planas), *Tropical South America: present and perspectives* (Tundisi), *Austral rivers of South America* (Bonetto), *Parched continents: our common future?* (Comín, Williams), *Not Politics, but Ecology* (Vallentyne) y *What is limnology?* (Edmonson).

Todos estos temas, juntos, constituyen ese paradigma de los problemas planetarios a que alude el subtítulo del libro, por lo que ningún biólogo, sean cuales fueren sus intereses, generales o específicos, debería perder la oportunidad de adentrarse en la lectura de esta magnífica obra.

Carmen Chica

Redacción de Microbiología SEM

Biostabilization of Sediments

W. E. Krumbein, D. M. Paterson, L. J. Stal (ed.)

Universität Oldenburg-Verlag, 1994. 526 pp. ISBN 3-8142-0483-2

Los biofilms son acumulaciones laminares de microorganismos sobre una superficie, en la que también se encuentran gran cantidad de polímeros de origen microbiano. Dichos polímeros forman un entramado que retiene las células con materia orgánica y compuestos inorgánicos, sujetando todo el conjunto al sustrato.

Wolfgang E. Krumbein, uno de los directores del libro, considera que los biofilms son ambientes acuáticos estabilizados y bien estructurados, a una temperatura en la que el agua es normalmente líquida y fluida. Los biofilms pueden originarse en ambientes muy distintos y sus efectos sobre el medio son variados, por lo que son estudiados por científicos de diferentes disciplinas. Intervienen en la regulación del flujo de sustancias químicas y de gases entre la columna de agua y la atmósfera. Los biofilms costeros, que constituyen los tapetes microbianos, contribuyen a la estabilización de los sedimentos litorales.

Este libro trata de los biofilms como estabilizadores de sedimentos. Una parte del mismo contiene las ponencias presentadas en un simposio sobre tapetes microbianos celebrado en Oldenburg (Alemania), en 1993, para conmemorar el 500 aniversario del nacimiento de Theophrastus Bombastus von Hohenheim, es decir, Paracelso. Este famoso médico y alquimista del Renacimiento describió la acción de los mucílagos en la formación de rocas. En algunos capítulos se rememoran los primeros estudios llevados a cabo en tapetes microbianos y el debate surgido a finales del siglo XIX entre Huxley y

Haeckel sobre los componentes del mucílago que recubre el fondo de los océanos.

El libro presenta también, en cuatro secciones, un estudio muy completo de la composición y del potencial biomineralizador de los tapetes microbianos y otros biofilms. En la primera sección, dedicada a la ecofisiología y estructura, se tratan temas como la respuesta a los cambios ambientales de las comunidades microbianas de los sedimentos poco profundos, las relaciones ecofisiológicas que intervienen en la estabilización, la mineralización de tapetes de cianobacterias en aguas termales, etc.

La segunda sección está dedicada a la estabilidad de los sedimentos. Comprende estudios detallados sobre resuspensión y estabilización de sedimentos con biofilms; sobre la influencia de los acontecimientos a microescala en la cohesión a macroescala de los exopolímeros; sobre la precipitación de carbonato cálcico, inducida por bacterias, que determina la litificación de los tapetes microbianos; sobre los tapetes microbianos en su calidad de constructores de estructuras superficiales sedimentarias; sobre la existencia en la actualidad de diversos tipos de estromatolitos vivos; etcétera.

La tercera sección recoge el estudio detallado de la bioestabilización de sedimentos en ambientes litorales del Mar del Norte, sometidos a diferentes impactos ambientales y a un cambio

climático potencial. Este trabajo fue subvencionado por la Unión Europea (Programa MAST). Creemos muy adecuado que se haya incluido aquí. Con frecuencia, los resultados de muchos proyectos de investigación no alcanzan difusión más que en informes burocráticos. Descripciones y resultados muy interesantes duermen archivados en los despachos de los organismos que han concedido las subvenciones.

La cuarta y última sección del libro describe una detallada metodología del estudio de la microbiología, bioquímica y potencial de estabilización de los biofilms y tapetes microbianos, así como las técnicas de medida de la fuerza de cohesión y potencial de bioestabilización contra las fuerzas de erosión.

Este excelente libro interesará a biólogos marinos, ecólogos y geólogos; a ingenieros de costas, ecólogos microbianos y paleontólogos; a todas las personas, en fin, interesadas en conocer las múltiples interrelaciones existentes entre la biota y el substrato geológico. Pocas veces un libro realizado a partir de una reunión científica y de un proyecto de investigación ha resultado tan completo para los expertos, interesante para los profanos y oportuno para las personas dedicadas al fomento y administración de la ciencia.

Mercè Piqueras

Redacción de Microbiología SEM

Cuadernos de Microbiología

Publicación periódica patrocinada por Biocheck, S. A.

En octubre de 1994 salió a la luz el primer número (número 0) de una nueva publicación sobre microbiología, patrocinada por Biocheck, S. A. (la dirección de la empresa es: c/Sabadell, 41. 08191 Rubí. Barcelona). El nombre de "Cuadernos" es muy adecuado; cada número se compone actualmente de ocho páginas, que pueden coleccionarse dentro de unas tapas que la misma empresa editora proporciona.

No es costumbre hacer en este espacio (sección de libros, de nuestra revista) la recensión de publicaciones periódicas, y menos si tienen carácter comercial, como en este caso. Sin embargo, creemos que la originalidad y la posible utilidad de *Cuadernos de Microbiología* merecen el comentario, para que la conozcan los socios de la SEM que no la hayan recibido previamente. Esta publicación no deja de ser, en principio, un catálogo de los aparatos y material de laboratorio distribuidos por la empresa editora.

Como expresa el editorial del número 1, "Cuadernos" se sitúa más allá de la pura información comercial. Incluye algunos artículos cortos de fondo, que en los dos primeros números (el 0, octubre 1994; y el 1, febrero 1995) tratan temas tan variados como "Nuevo sistema miniaturizado

para la identificación de *Listeria monocytogenes*", "Resumen de normas ISO para medios de cultivo y reactivos preparados en laboratorio", "La salud y el trabajo", "El microbiólogo y la industria alimentaria", etc. Además, el microbiólogo, encontrará en sus páginas servicio bibliográfico muy actualizado, bolsa de trabajo, calendario de congresos, jornadas científicas, ferias, etc., y una sección de correo del lector. Esta última es una tribuna en la que los lectores pueden dar a conocer opiniones, solicitar informaciones, expresar problemas, etc.

La presentación es sencilla y los números pueden guardarse en su cubierta de anillas en cualquier estantería del laboratorio. El aspecto visual es agradable. Sin embargo, tenemos que hacer una observación a los editores: deberían estar atentos a poner en cursiva, y escribir siempre correctamente, los nombres de géneros y especies bacterianos. Habría que cuidar éste y otros aspectos (que no son detalles o manías de carácter académicos) relacionados con la microbiología básica y aplicada. Ello contribuirá a hacer que la publicación no sea sólo un folleto útil para anunciar productos y materiales de gran utilización en el laboratorio, sino una herramienta más para mejorar la calidad de la enseñanza, estimular la investigación y potenciar la aplicación de la ciencia microbiológica.

Núria Gaju
Universidad Autónoma de Barcelona

XV Congreso Nacional de Microbiología

Madrid, 25–28 de septiembre de 1995

Organizado por: Departamento de Microbiología II. Fac. de Farmacia, UCM
Departamento de Microbiología III. Fac de Biología, UCM

Sede del Congreso: Facultades de Medicina y Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Secretaría del Congreso: Departamento de Microbiología II
Fac. de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid
Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tel.: 91-3941834/91-3941744. Fax: 91-3941745.

Hace cincuenta años se creó la *Sociedad Española de Microbiología*. Para celebrar todo lo positivo que ha habido en nuestra actividad y, sobre todo, para mirar hacia el futuro con la convicción de que la Microbiología en España seguirá representando un territorio de actividad científica y profesional de vanguardia, se está trabajando desde hace meses para ofrecer un Congreso en el que todos aquellos que desarrollan estudios microbianos se sientan representados. Esperamos vernos honrados con vuestra presencia.

César Nombela Cano

Presidente del Comité Organizador



XV Congreso Nacional de Microbiología

Apellidos, nombre

Dirección

.....

Población CP Provincia

Título de la comunicación

..... Área temática

Palabras clave (máximo 5)

Cuota de inscripción: socio de la S.E.M. 28.000 PTA

socio menor de 28 años (justificar) 17.000 PTA

no socio de la S.E.M. 35.000 PTA

recargo después del 30-6-1995 5.000 PTA

Adjunto un talón nominativo nº _____ a favor del XV Congreso Nacional de Microbiología o copia del resguardo de transferencia a la Cuenta Corriente 0049-2196-231-4008934 del Banco Central Hispano, por un importe total de PTA: _____

ERRATUM

Ensayos in vitro del comportamiento antagónico de *Trichoderma* spp. frente a especies patógenas de la zona hortícola de La Plata, Argentina

Cecilia Mónaco,*^{1,2} Analía Perelló,¹ M. Cristina Rollán²

¹ *Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires*

² *Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina*

Volumen 10 (4), página 426, en la Tabla 1, línea 2 debería leerse *Sclerotinia sclerotiorum*.

Página 426, en la Tabla 1 línea 3 debería leerse *Sclerotium rolfsii*.

PREMIO

Asociación Benéfico-Docente Profesor Vicente Callao

Se convoca un premio al mejor trabajo biográfico sobre la vida del Profesor Vicente Callao Fabregat, destacando sobre todo sus actividades científicas y valores humanos, con motivo del 25 aniversario de su fallecimiento.

La dotación de dicho premio es de 250.000 PTA.

Los trabajos deberán ser remitidos a la dirección de esta Asociación Benéfico-Docente, en el Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja, 18071 Granada.

El plazo de recepción termina el día 31 de octubre de 1996.

El Presidente

Prof. Alberto Ramos Cormenzana

Science, Culture & Communication for the 21st Century

8th International Conference of the
International Federation of Science Editors

9–13 July 1995, Barcelona (Catalonia, Spain)

Venue ● School of Biology
University of Barcelona
Av. Diagonal, 645
E-08028 Barcelona
Spain

Organized by ● International Federation
of Science Editors
● Catalan Research Foundation

Secretariat/IFSE-8. Apartado 16009. E-08028 Barcelona. Spain
Tel.: 34-3-4482373. Fax: 34-3-3341079. E-mails: guerrero@porthos.bio.ub.es, guerrero@servicom.es

Normas para los autores

Microbiología SEM (la revista científica de la Sociedad Española de Microbiología, SEM) acepta artículos y notas de investigación originales dentro del campo de la microbiología y, ocasionalmente, artículos de revisión. Textos en inglés (preferentemente) o español. La aceptación corresponde al Consejo Editorial. Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los originales publicados en *Microbiología SEM* podrán ser reproducidos siempre que se indique su origen.

PRESENTACIÓN DE LOS ORIGINALES. Los artículos estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con un amplio margen en la parte izquierda. No deberán exceder de 16 páginas impresas, incluyendo tablas y figuras (lo que corresponde aproximadamente a 25 hojas mecanografiadas). Los artículos incluirán una primera página en la que se indicará por este orden: Título del artículo, nombre y apellido del autor o autores, centro en el que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo, así como de tres a cinco "palabras clave". En los artículos en español se deberá incluir una versión inglesa del título. Los artículos constarán de: Resúmenes en inglés y en español (de no más de 250 palabras cada uno), Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Las secciones de Resultados y Discusión se podrán juntar en una sola.

Las abreviaturas, símbolos y siglas deberán seguir las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica. Deberá emplearse siempre el Sistema Internacional de Unidades (SI).

La bibliografía será citada en el texto mediante números y se dispondrá numerada y en orden alfabético de acuerdo con los ejemplos que se ofrecen a continuación:

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Seeberg, E., Nissez-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In* Nombela, C. (ed.), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3-12. Elsevier Science Pub., Amsterdam.

Las referencias a tesis doctorales, originales no aceptados todavía o comunicaciones presentadas a congresos, deben incluirse en el texto del artículo de acuerdo con los siguientes ejemplos: (García, P. et al. 1985, en preparación), (Smith, T. 1985. Tesis doctoral University of Massachusetts, Amherst) o (Suárez, A., González, F. 1975. Res. V Congr. Nac. Microbiol., p. 1845).

Las fotografías, que deberán estar preparadas para su reproducción directa, se limitarán a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso, indicando el apellido del primer autor a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte. En los artículos en español las figuras incluirán asimismo un texto en inglés. El tamaño de las fotografías no excederá de 13 x 20 cm. Las dimensiones de los rótulos deberán ser las adecuadas para ser legibles en caso de que se reduzca la fotografía. La presentación de dibujos en tinta china y papel vegetal seguirá las mismas normas. No se admitirán fotografías en color.

Las tablas se enviarán en hojas aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números arábigos y deberán llevar el correspondiente título explicativo. Los autores deberán indicar a lápiz en el margen del texto la situación aproximada en donde deben aparecer las tablas y figuras.

NOTAS. Las Notas, que no deberán exceder de seis páginas mecanografiadas, incluyendo figuras y tablas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las normas previamente descritas para los artículos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento. Los resúmenes no serán superiores a 50 palabras. Sólo incluirán, como máximo, dos figuras y una tabla, o viceversa.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN. Los artículos de Revisión versarán sobre temas de microbiología de gran interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Sin embargo, si algún autor está interesado en publicar artículos de Revisión, éstos tendrán que ser supervisados. Los originales deberán comprender aproximadamente de 12 a 20 páginas (incluidas figuras y tablas), mecanografiadas a doble espacio.

CORRECCIÓN DE PRUEBAS. Los autores recibirán pruebas de imprenta, que deberán estar de vuelta en la redacción en el plazo de una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán publicadas tal como han sido enviadas a los autores. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes, que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por los autores. Se enviarán 25 separatas gratuitas por artículo; si se desearan más, deberá indicarse por escrito cuando se devuelvan la pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

El artículo, original y dos copias en papel, se enviará a la siguiente dirección: *Microbiología SEM*. Apartado 16009, 08080 Barcelona, o al miembro del Consejo Editorial de la revista que esté más relacionado con el contenido del artículo. Posteriormente, caso de ser aceptado, se pedirá también una versión en disco de ordenador.

Instructions to authors

Microbiología SEM (the official journal of the Spanish Society for Microbiology, SEM) publishes original research articles, research notes and reviews covering all aspects of microbiology. All submissions should be written in English (preferably) or Spanish. The decision to accept manuscripts is made by the Editorial Board. Submission of an article to this journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere. Consent is given for reproducing publication of this journal if accredited as the source.

ORGANIZATION AND FORMAT OF THE MANUSCRIPTS. Type every portion of the manuscript double-space with wide margin at the left on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially. Articles must be restricted to a maximum of 16 printed pages, including figures and tables (this corresponds to approximately 25 typewritten pages).

The front page should include title, name(s) of the author(s), institution affiliation(s) and complete address(es). Three to five "key words" would also be included. Articles should be divided into: Abstracts in English and in Spanish (not exceeding 250 words each), Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission and the *Système International d'Unités* (SI) is to be used throughout.

Cite each listed reference by numbers in the text. References should be numbered and arranged in alphabetical order as indicated in the following examples:

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Seeberg, E., Nissee-Meyer, J., Strike, P. (1976). *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In* Nombela, C. (ed.), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3-12. Elsevier Science Pub., Amsterdam.

References to thesis, manuscripts not yet accepted for publication or meetings should be indicated in the text as follows: (García, P. et al. 1985, in preparation), (Smith, T. 1985. Ph. D. thesis, University of Massachusetts, Amherst) or (Suárez, A., González, F. 1975. V Congr. Nac. Microbiol., p. 1845).

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the article should be submitted. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on the back and identified with the first author's name written in pencil. Legends for line-drawings and photoprints must be typed double-space on a separate sheet. The size of the photographs should not exceed the printing area (13 x 20 cm). All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black ink on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using Arabic numerals. Please indicate with a soft pencil the approximate location of tables and figures in the left margin of the pages of the manuscript.

NOTES. Notes should be restricted to 6 typewritten pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the instructions given for articles, but without the heading divisions, and their abstracts should not exceed 50 words. Figures and tables should be restricted to a maximum of 2 figures and 1 table or vice versa.

MINIREVIEWS. Minireviews articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. However, if some authors are interested in publishing minireviews, these will be submitted for publication. They should not be longer than approx. 12 to 20 double-spaced typewritten pages, including the space needed for figures and tables.

PROOFS CORRECTION. On acceptance of the article, galley proofs will be sent to the corresponding author to check for typesetting accuracy. The corrected proofs should be duly returned within one week's time. If delays were observed, the proofs will be published as they have been sent. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author's expense. Twenty five offprints of each article are supplied free of charge. Additional reprints will be billed at cost price if requested upon returning the corrected galley proofs.

Articles must be submitted, original and two copies in paper, to the following address: *Microbiología SEM*. Apartado 16009, 08080 Barcelona, Spain, or to one of the members of the Editorial Board according to the discipline represented. If the article is accepted for publication, a version in diskette will be requested.

Editorial Board addresses/Direcciones de los miembros del Consejo Editorial

Salomón Bartnicki-García
Department of Plant Pathology
University of California-Riverside
Riverside, CA 92521, USA

Juan J. Borrego
Departamento de Microbiología
Universidad de Málaga
Campus Universitario Teatinos
29071 Málaga

Enrico Cabib
National Institutes of Health
Bldg. 10 Room 9H-11
Bethesda, MD 20892, USA

Victoriano Campos
Fac. de Ciencias Básicas y Matemáticas
Universidad Católica de Valparaíso
Av. Brasil, 2950
Valparaíso, Chile

Josep Casadesús
Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla

Esteban Domingo
Centro de Biología Molecular
CSIC-UAM
28049 Cantoblanco (Madrid)

Mariano Esteban
Centro Nacional de Biotecnología
CSIC
28049 Cantoblanco (Madrid)

Isabel Esteve
Microbiología
Instituto de Biología Fundamental
Universidad Autónoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona)

Margarita Flores
Departamento de Microbiología III
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid

M. Luisa García López
Dpto. Higiene y Tecn. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de León
24071 León

Juan Iriberry
Departamento de Microbiología
Universidad del País Vasco
Apartado 644
48080 Bilbao

Germán Larriba
Departamento de Microbiología
Universidad de Extremadura
06071 Badajoz

Paloma Liras
Área de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de León
24071 León

José M. López Pila
Institute for Environmental Hygiene
Corrensplatz, 1
D-1000 Berlin 33, FRG

Rubens López
Centro de Investigaciones Biológicas CSIC
Velázquez, 144
28006 Madrid

Manuel Benjamín Manzanal
Dpto. Interfac. de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
33071 Oviedo

David A. A. Mossel
Eijkman Found. for Medical Research
P.O. Box 6025
3503 PA Utrecht
Netherlands

Juan A. Ordóñez
Dpto. Higiene y Microbiol. Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid

José Claudio Pérez Díaz
Servicio de Microbiología
Hospital Ramón y Cajal
28035 Madrid

Manuel de la Rosa
Servicio de Microbiología
Hospital Virgen de las Nieves
Av. Coronel Muñoz, 2
18014 Granada

Harold W. Rossmore
Department of Biological Sciences
Wayne State University
Detroit, MI 48202, USA

Moselio Schaechter
Dpt. Molec. Biology and Microbiology
136 Harrison Ave.
Tufts University
Boston, MA 02111, USA

Josep M. Torres-Rodríguez
Unidad de Microbiología
Inst. Municipal de Investigación Médica
UDIMAS, Univ. Autónoma de Barcelona
Pg. Marítim, 25-29
08003 Barcelona

Hans G. Trüper
Institute of Microbiology
University of Bonn
Meckenheimer Allee, 168
D-5300 Bonn 1, FRG

Antonio Ventosa
Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla
41012 Sevilla

Miquel Viñas
Dpto. Microbiol. y Parasitol. Sanitarias
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
08028 Barcelona