



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**“ASOCIACIONES BACTERIANAS ALTERANTES Y AGENTES DE
INFECCIONES ALIMENTARIAS EN PESCADO DE AGUA DULCE
ALMACENADO A REFRIGERACIÓN”**

**Memoria que para optar al grado de
Doctor en Veterinaria presenta:**

CÉSAR JAVIER GONZÁLEZ SERRANO

Dña. M^a Luisa García López y D. Andres Otero Carballeira, Profesores Titulares de Universidad del Área “Nutrición Y Bromatología”, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada “Asociaciones bacterianas alterantes y agentes de infecciones alimentarias en pescado de agua dulce almacenado a refrigeración”, de la que es autor D. César Javier González Serrano, ha sido realizada bajo nuestra dirección en este laboratorio y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Fue iniciada en Enero de 1991 y terminada en esta fecha.

León, Julio de 1996.

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, el autor fue beneficiario de una Beca del Programa de Formación de Persona Investigador, Subprograma de Formación de Profesorado Universitario, del Ministerio de Educación y Ciencia desde Enero de 1991.

Parte del trabajo aquí recogido fue financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Proyecto ALI 94-0079) y el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (Proyecto 92/229)

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi más sincero y cálido agradecimiento a las siguientes personas:

A los Doctores María Luisa García López y Andrés Otero Carballeira, por haberme brindado la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, por su labor de dirección científica y, principalmente, por su constante estímulo, apoyo y confianza a lo largo de estos años.

A los Doctores Miguel Prieto y Jesús Santos, no sólo por sus acertados consejos para llevar a cabo este trabajo de la manera más cómoda posible y por su inestimable ayuda a la hora de enfrentarme con los mil y un problemas que me planteaba la informática, sino por haber sido compañeros y amigos fuera de los límites de la Universidad.

Al Doctor Douglas McIntosh, del "Department of Biological Sciences" de la "Heriot-Watt University of Edinburgh ", gran amigo y maestro en el campo de la patogenicidad microbiana, que me mostró que uno de los aspectos más estimulantes de la Ciencia es que las cosas son como son y no siempre como queremos que sean.

Al Doctor Brian Austin, del "Department of Biological Sciences" de la "HeriotWatt University of Edinburgh", por abrirme las puertas de su laboratorio para llevar a cabo parte del trabajo experimental contenido en la presente Memoria

A Carlos Bayón y al Doctor Emilio Flaño, miembro del "Departamento de Biología Celular y Anatomía" de la Universidad de León, que me suministraron los ejemplares de trucha común y lucio respectivamente. Espero que me perdonéis si he sido cargante en alguna ocasión.

A la Doctora Ana Carvajal, del Departamento de "Patología Animal. Sanidad Animal" de la Universidad de León, por la provisión de material para cultivos celulares.

A David Pérez, Roberto Rodríguez y Bernardo Prieto por haberme obsequiado con vuestra amistad y compañía dentro y fuera del laboratorio.

A los restantes miembros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos que de una u otra manera me han ayudado, estimulado y acompañado durante estos seis años, así como a todas aquellas personas ajenas al mismo que se han interesado por mi trabajo y me han prestado una imponderable colaboración que espero algún día corresponder con algo más que un simple agradecimiento.

A mi familia y,
en especial,
a Luis Miguel

A Graciela

“...ni todo el oro del mundo
me devolverá aquellos días...”
(Matt Johnson, 1983)

ÍNDICE

Introducción:	JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.	
Capítulo I:	CALIDAD MICROBIOLÓGICA, HIGIÉNICA Y SANITARIA DEL PESCADO RECIÉN CAPTURADO. EVOLUCIÓN DE LOS RECuentOS DE MICROORGANISMOS Y VIDA ÚTIL DEL PESCADO ALMACENADO A REFRIGERACIÓN.	
	Introducción	17
	Material y métodos.....	25
	Resultados.....	31
	Discusión.....	44
Capítulo II:	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Aeromonas</i> MÓVILES.	
	Introducción	57
	Material y métodos	61
	Resultados	66
	Discusión	75
Capítulo III:	ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A <i>Aeromonas</i>.	
	Introducción	85
	Material y métodos	91
	Resultados	97
	Discusión	109
Capítulo IV:	SUCESIONES MICROBIANAS A LO LARGO DEL ALMACENAMIENTO A REFRIGERACIÓN.	
	Introducción	119
	Material y métodos	125
	Resultados	127
	Discusión	136
Capítulo V:	ESTUDIO TAXONÓMICO DE LOS MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS MÓVILES.	
	Introducción	147
	Material y métodos	152
	Resultados	161
	Discusión	183

Capítulo VI:	ESTUDIO TAXÓNOMICO DE LOS MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS INMÓVILES Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS.	
	Introducción	197
	Material y métodos	204
	Resultados	208
	Discusión	233
Capítulo VII:	IDENTIFICACIÓN CLÁSICA Y CLASIFICACIÓN MEDIANTE TAXONOMÍA NUMÉRICA DE <i>Micrococcaceae</i>.	
	Introducción	249
	Material y métodos	253
	Resultados	258
	Discusión	273
Capítulo VIII:	ESTUDIO TAXÓNOMICO E IDENTIFICACIÓN CLÁSICA DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS.	
	Introducción	281
	Material y métodos	284
	Resultados	289
	Discusión	299

Conclusiones.

Bibliografía.

JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

En un país como España, donde la participación del pescado y los productos derivados en la dieta alimentaria es de las más altas del mundo (rondando los 40 kg/habitante y año, Rodríguez, 1994), y donde la tradición pesquera es considerable, no es de extrañar que la búsqueda de procedimientos que permitan aumentar la disponibilidad de proteínas de origen acuático haya sido y sea objeto de esfuerzos destacados.

En tal sentido, las crecientes dificultades que de la mera captura pesquera de las especies marinas (sobrepesca, espacio económico exclusivo, etc.) vienen surgiendo, han conducido a un creciente desarrollo de la acuicultura, así como al aprovechamiento de las capturas de aguas continentales.

Así, se considera que la producción mundial de la acuicultura (superior a 14 millones de Tm, Rodríguez, 1994), equivale aproximadamente al 15% del total de la producción pesquera (capturas + producción). También a nivel mundial, en torno al 85% de la producción de la acuicultura corresponde a la producción piscícola procedente de aguas continentales (Rodríguez, 1994).

En la Unión Europea (CEE a 12) la producción de la acuicultura representa en torno al 11% del total de la producción pesquera (capturas + producción), y en el escenario del Plan de Orientación Plurianual para la Acuicultura de la Unión Europea (1992-1996), se preveía para el año 2000 en España, dejando a un lado la producción del mejillón (que supondrá en torno al 71% de la producción de la acuicultura), alcanzar el objetivo de que aproximadamente un 24% del resto de la producción se derive de la acuicultura continental.

En este contexto, no sólo la mera comercialización de los productos frescos, sino también la búsqueda de soluciones tecnológicas (p.e., desarrollo de nuevos productos o nuevas formas de presentación) que aumenten el valor añadido de los productos, obliga a partir de bases científicas sólidas. Entre otros factores que condicionan las posibilidades de comercialización de los productos, se sitúan todos aquellos que afectan a la vida útil de los productos y a la seguridad de los consumidores. La importancia de los microorganismos como agentes primordiales de estos efectos es evidente.

Más allá de otras consideraciones, desde el punto de vista del establecimiento de prioridades en las políticas alimentarias y de salud pública, no es infrecuente trasladar a términos monetarios las consecuencias de determinados hechos de índole fundamentalmente biológica. En tal sentido, con las limitaciones derivadas de toda estimación, se ha calculado (Todd, 1989) que los agentes responsables de enfermedades asociadas al consumo de alimentos representan un coste para la economía estadounidense de alrededor de 8400 millones de dólares cada año (con alrededor de 12 millones y medio de casos y más de 500 muertos anuales). En términos monetarios, un 80% del coste puede ser atribuido a procesos de origen microbiano (Todd, 1989). De la preponderancia de los microorganismos entre tales agentes, sirva el hecho de que la poderosa Agencia Estadounidense para los Alimentos y los Medicamentos (Food and Drug Administration) sitúa en primer lugar de sus prioridades de

actuación dentro del terreno de la sanidad (seguridad, inocuidad) alimentaria (“food safety”) el control de los riesgos de origen microbiano (Pariza, 1992).

En relación con la alteración, a modo de ejemplo, se estima que, en los países en vías de desarrollo, un 10% del pescado destinado al consumo humano se altera por acción microbiana y/o enzimática, lo que representa unas pérdidas anuales de unos 2 millones de Tm (Todd, 1987).

En este contexto se planteó el desarrollo de esta Tesis Doctoral, en la que se establecieron los objetivos siguientes:

PRIMERO.- Estimar la calidad microbiológica de los peces recién capturados, con vistas a determinar, en primer lugar, la importancia del pescado de agua dulce como vector (pasivo o activo) de agentes de infecciones e intoxicaciones alimentarias de origen microbiano. Para lo cual, junto con los microorganismos tradicionalmente implicados en brotes asociados al consumo de pescado, se prestó especial atención a dos grupos microbianos englobados dentro de los llamados “microorganismos emergentes” por su creciente importancia dentro de la Microbiología Sanitaria: *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

SEGUNDO.- Establecer, en base al estudio de los factores de virulencia, la importancia real, en relación con la salud pública, de la presencia de *Aeromonas* en pescado de agua dulce.

TERCERO.- Determinar la importancia del agua como origen de la flora microbiana presente en los peces, así como la influencia del manejo de éstos tras su captura en su carga microbiana.

CUARTO.- Evaluar la composición de la flora microbiana de los peces recién capturados con el fin de predecir la importancia de la misma en la alteración del pescado.

QUINTO.- Determinar la influencia del eviscerado o no, tras la captura de los peces, en la vida útil del pescado cuando se almacenaba a refrigeración.

SEXTO.- Estudiar la evolución de la flora microbiana durante el almacenamiento a refrigeración del pescado, con el fin de determinar: (i) las asociaciones microbianas alterantes; (ii) la utilidad de distintas determinaciones microbianas (recuento de mesófilos, recuento de psicrotrofos, recuento de micrococáceas, etc.) en el pescado para evaluar la vida útil o algún otro aspecto de calidad del pescado (calidad sanitaria, calidad higiénica).

SÉPTIMO.- Evaluar la utilidad del análisis numérico de características fenotípicas a la hora de establecer la clasificación (e identificación, en su caso) de bacterias aisladas de pescado de agua dulce o de su hábitat.

CAPÍTULO I:

CALIDAD MICROBIOLÓGICA, HIGIÉNICA Y SANITARIA DEL PESCADO RECIÉN CAPTURADO. EVOLUCIÓN DE LOS RECUENTOS DE MICROORGANISMOS Y VIDA ÚTIL DEL PESCADO ALMACENADO A REFRIGERACIÓN

INTRODUCCIÓN

Durante la alteración del pescado se producen modificaciones en el olor, sabor y textura que acompañan a los cambios en la morfología o aspecto externo (Peláez, 1989). Asociado a la alteración se encuentra el concepto de vida útil del pescado. Por un lado, la vida útil se puede definir como el período en el que se considera que un alimento puede ser distribuido y ofrecido al consumidor sin sufrir rechazo por parte del consumidor. Esta definición correspondería a la vida útil comercial. Por otro lado, la vida útil máxima comprendería aquel período en el que el pescado es apto para el consumo, pero sus cualidades organolépticas distan mucho de ser apropiadas para ser aceptadas por los consumidores.

La alteración del pescado, entero o eviscerado, almacenado a refrigeración, que se produce incluso a temperaturas en el rango entre -4°C y 0°C (Shewan, 1971), se debe principalmente, y entre otros fenómenos tales como la autólisis muscular y la presencia de enzimas digestivos (Bremner, 1991), a la proliferación de microorganismos con capacidad alterante (Pedrosa-Menabrito y Regenstein, 1988). Entre los factores que pueden afectar a la velocidad de alteración del pescado se encuentran: la técnica empleada en la obtención de los ejemplares, la flora microbiana (composición cualitativa y cuantitativa) presente de forma natural en el pescado recién capturado (en la piel, agallas y tracto gastrointestinal de los ejemplares sanos) y la manipulación post-captura que puede aportar más microorganismos al pescado (Peláez, 1989). Tradicionalmente se ha asumido que la masa muscular permanece estéril durante los primeros días de almacenamiento (Shewan, 1971), si bien Evelyn y McDermott (1961) opinan lo contrario. En este sentido, Poulter y Nicolaidis (1985) y Bennour y col (1991) detectaron niveles elevados de microorganismos en la masa muscular de diversas especies de pescado recién capturado. Shewan (1971) propone una serie de vías de penetración de los microorganismos en la masa muscular del pescado entero:

1. Los microorganismos presentes en las agallas pasan al sistema circulatorio y, desde este punto, colonizan el tejido muscular.
2. Las bacterias saprofitas del intestino atraviesan la pared del tubo digestivo, colonizan el peritoneo y entran en contacto con la masa muscular adyacente.
3. La piel es penetrada por las bacterias una vez que es superado el impedimento que supone el mucus superficial, que posee propiedades antibióticas y contiene lisozima.

El pescado es un alimento muy perecedero ya que es un excelente sustrato para el crecimiento de microorganismos (Venugopal, 1990). Esto es debido, entre otros muchos factores, a la presencia de niveles altos de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular; asimismo, el bajo contenido en colágeno y lípidos favorece la proliferación bacteriana (Venugopal, 1990). El no poseer estructuras conjuntivas similares a las de la carne de los animales de abasto, las cuales dificultan y retrasan la colonización microbiana del tejido muscular, determina su baja resistencia a la penetración microbiana (Peláez, 1989).

Una vez que el pescado es capturado y sacrificado se establece el “rigor mortis” y se produce un descenso del pH; acto seguido, se desencadenan una serie de procesos que dan lugar a su alteración (Pedrosa-Menabrito y Regenstein, 1987). Dentro de estos procesos hay que distinguir cuatro tipos:

1. Actividad autolítica como consecuencia de la presencia en el tejido muscular, de modo natural, de enzimas autolíticas (catepsinas, peptidasas) y de la liberación de las enzimas contenidas en los lisosomas. Ambas contribuyen a la alteración del pescado, pero no causan modificaciones significativas en el músculo (Venugopal, 1990).
2. Acción microbiana sobre compuestos no proteicos de bajo peso molecular (Hobbs y Hodgkiss, 1982; Liston, 1980b). A partir de los aminoácidos libres se producen amoniaco, ácidos grasos volátiles y H₂S. También pueden hacer uso de otros compuestos aminados, como el óxido de trimetilamina (OTMA), que es reducido a trimetilamina (TMA) y, en menor escala, a dimetilamina (DMA) y formaldehído. La reducción del OTMA se encuentra ligada a la utilización del ácido láctico (Castell y col, 1959). El TMA es el compuesto responsable del olor característico a pescado marino de baja calidad (alterado), siendo muy reducida su presencia en pescado de agua dulce. Paralelamente, la producción de proteasas por parte de las bacterias se ve reprimida por la presencia de compuestos de bajo peso molecular.
3. Acción microbiana sobre constituyentes proteicos del músculo: se da en los últimos estadios de la vida útil del pescado, coincidiendo con los primeros indicios de alteración, o bien cuando el pescado ya está alterado, una vez que el contenido en aminoácidos libres se ve reducido drásticamente (Venugopal, 1990). Gram (1992) afirma que la proteólisis es un fenómeno poco importante en la alteración del pescado. Por otro lado, Karnop (1982) opina que los microorganismos proteolíticos únicamente son capaces de desarrollarse una vez que el pescado manifiesta signos claros de alteración. La actividad proteolítica es evidente cuando los recuentos bacterianos se incrementan hasta las 10⁶ unidades formadoras de colonias (ufc)/g o cm² de músculo o piel, respectivamente (Venugopal, 1990). Como consecuencia de la proteólisis se forman aminoácidos y compuestos volátiles, como H₂S y mercaptanos. También se producen putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e histamina (Fernández-Salguero y Mackie, 1987). La producción de proteasas se ve estimulada por péptidos liberados a consecuencia de la acción de enzimas proteolíticas producidas en pequeñas cantidades durante las primeras etapas de la conservación a bajas temperaturas.
4. Otros fenómenos (Martin y col, 1978; Pedrosa-Menabrito y Regenstein, 1987): la oxidación de los ácidos grasos libres (principalmente en pescado graso), la hidrólisis de las grasas (se producen cambios en la textura), la degradación autolítica de los nucleótidos (de ATP hasta hipoxantina y ácido úrico).

Tres fenómenos, como la reducción del OTMA, la hidrólisis de las proteínas y la producción de H₂S a partir de aminoácidos sulfurados se vieron pronto relacionados con la alteración del pescado almacenado a refrigeración. Más tarde, se observó que algunos microorganismos no proteolíticos, ni reductores del OTMA eran capaces de producir malos olores cuando crecían en extractos de músculo de pescado libres de proteínas (Castell y Greenough, 1957). Finalmente, se puso de manifiesto que los fenómenos proteolíticos comenzaban cuando el pescado ya mostraba signos claros de alteración (Castell y Greenough, 1959). Lerke y col (1967) observaron que los signos característicos de alteración se manifestaban al inocular microorganismos alterantes en fracciones de músculo de pescado libres de proteínas, mientras que en las fracciones proteicas (peso molecular mayor de 5000

Dalton) no se producían. De todas maneras, apreciaron que la alteración de la fracción libre de proteínas se veía acelerada en presencia de proteínas. De aquí se deduce el papel secundario que juegan las proteínas en la alteración del pescado mantenido a refrigeración. Los olores comúnmente asociados a la alteración son los descritos como afrutados, amoniacaes, amargos y a pescado alterado.

Durante la segunda mitad del siglo XX y, con particular énfasis en los años sesenta y ochenta, distintos autores (Abo, 1980; Acuff y col, 1984; Andrews y col, 1977; Evelyn y Mc Dermott, 1961; Gram, 1992; Gram y col, 1990; Hansen y Jorgensen, 1965; Lee y Harrison, 1968; Liston, 1980b; Schoebitz y col, 1985; Shewan, 1971) llevaron a cabo estudios acerca de la carga microbiana inicial del pescado fresco (ya sea entero, eviscerado o fileteado). También prestaron especial atención a la evolución de los niveles de microorganismos a lo largo del almacenamiento a refrigeración (y hasta el momento de la alteración) de dicho pescado, así como a los patrones microbianos de alteración en pescado sometido a tratamientos tecnológicos tales como el ahumado y el envasado en atmósferas modificadas. Shaw y Shewan (1968) y Lee y Harrison (1968), entre otros, estudiaron la contaminación microbiana inicial de distintas especies de pescado de origen marino, centrándose sus trabajos en el aislamiento e identificación de los microorganismos sospechosos de ser responsables de la alteración del pescado cuando éste se mantenía almacenado a bajas temperaturas. A través de estos estudios se llegó a la conclusión de que la flora microbiana del pescado recién capturado era semejante a la del agua obtenida en los lugares de procedencia de los distintos ejemplares (Shewan, 1971). También se observó que el género microbiano más frecuentemente asociado a la alteración del pescado fresco era *Pseudomonas*.

Años más tarde, diversos autores investigaron la utilidad de algunos parámetros bioquímicos (Bennour y col, 1991; Martin y col, 1978; Moral-Rama, 1987; Tejada y col, 1979) para determinar el establecimiento de la alteración del pescado mantenido en distintas condiciones de almacenamiento. Entre los parámetros que estudiaron destacan: las variaciones en el pH, la formación trimetilamina (responsable de malos olores) a partir del óxido de trimetilamina presente en los ejemplares recién capturados (útil en pescado de origen marino), las variaciones en los niveles de nitrógeno básico volátil total (TVB-N) y la dinámica de los productos de degradación de nucleótidos (índice o valor K -Gómez y col, 1990- e índice de hipoxantina). En algunos casos, estos parámetros guardan relación con la actividad bioquímica de los microorganismos alterantes (Martin y col, 1978). Existe mucha controversia acerca de su utilidad para determinar el índice de frescura del pescado y el final de la vida útil del mismo, así como de su correlación con el análisis sensorial del pescado. Bennour y col (1991), Gelman y col (1990) y Poulter y Nicolaidis (1985), por ejemplo, observaron que la medida del TVB-N y del pH no eran buenos indicadores de la frescura del pescado, si bien para Bennour y col (1991) el contenido en TVB-N era un índice valioso para determinar el grado de deterioro del pescado. Lobben y Lee (1968) observó que, en la alteración del pez de roca, se producía TVB-N, pero no se relacionaba, directamente, con el olor. En cuanto al índice TMA, Bennour y col (1991) y El Marrakchi (1990) afirmaron que servía tanto como índice de deterioro como de frescura de algunas especies de pescado. Sin embargo, el índice TMA, a diferencia del índice de formación de la hipoxantina, no es útil para la determinación de la calidad del pescado de agua dulce (Martin y col, 1978). Por lo que respecta al índice de hipoxantina y al valor K, diversos autores han significado la buena

correlación entre ambas medidas y los análisis sensoriales (Dawood y col, 1986a; Scott y col, 1986). También se han empleado métodos instrumentales para la determinación de la frescura y el deterioro del pescado (Burt y col, 1975; Gibson, 1985)

A finales de los años sesenta y principios de los setenta, y paralelamente al desarrollo de la acuicultura continental, se comenzó a estudiar en profundidad la microbiología del pescado de agua dulce. Horsley (1973) realizaron un estudio en el que se investigó la flora microbiana asociada a distintos ejemplares de salmónidos de vida libre capturados en diferentes zonas del curso de una corriente fluvial, así como la asociada a salmónidos obtenidos en estuarios y áreas lacustres. Debido a la creciente importancia que ha ido adquiriendo el cultivo de pescado de agua dulce en piscifactorías a lo largo de estos últimos años, el número de trabajos relativos a su microbiología (no sólo de las especies cultivadas, sino también de las especies de vida libre) se ha visto incrementado notablemente, tanto en los aspectos relacionados con aquellos agentes microbianos capaces de inducir procesos patológicos en pescado que diezman las poblaciones y condicionan la rentabilidad de las explotaciones (Austin y Austin, 1985), como en el campo de la Microbiología de los Alimentos (Acuff y col, 1984; Nedohula y Westhoff, 1993). A través de estos últimos se ha podido apreciar que existen diferencias entre los patrones de alteración del pescado de distintos orígenes, principalmente en lo que se refiere a la flora microbiana y a los procesos bioquímicos que participan en ella. Se ha comprobado que, en la mayoría de las ocasiones, la vida útil del pescado de agua dulce obtenido en zonas templadas del planeta y mantenido a refrigeración es similar a la del pescado de origen marino obtenido en esas mismas áreas y menor que la del pescado procedente de aguas tropicales (León-Fajardo y Marth, 1979). Se acepta, generalmente, que la vida útil del pescado almacenado en hielo está muy relacionada con la temperatura y tipo de medio en que son capturados, siendo mayor la vida útil a mayor temperatura ambiente (Poulter y Nicolaidis, 1985). En principio, la microbiología del pescado de origen marino es completamente diferente de la del pescado de agua dulce.

En general, los análisis llevados a cabo en el pescado abarcan, tanto la calidad microbiológica, higiénica y sanitaria tras la captura, como el comportamiento de los microorganismos durante su almacenamiento. La calidad microbiológica del pescado recién capturado está representada por la flora microbiana aerobia viable y por los gérmenes anaerobios, mientras que la calidad higiénica incluye los llamados microorganismos indicadores (enterobacterias y enterococos- León-Fajardo y Marth, 1979-), si bien en ocasiones se han tendido a identificar la una con la otra. Ambas han venido considerándose como reflejo de la microbiología del agua, y el ambiente en general, de los estanques o agua de cría (Leung y col, 1992b; Youssef y col, 1985) y son importantes desde varios puntos de vista.

Por un lado, la calidad microbiológica (determinaciones de microorganismos mesófilos y psicrotrofos) nos da una idea de cómo ha sido la manipulación previa del pescado, es decir, de las condiciones (temperatura, modo de conservación e incluso método empleado en la obtención del pescado) bajo las que se han mantenido los ejemplares desde su captura hasta los primeros análisis bacteriológicos llevados a cabo, pero no es útil para predecir la vida útil del pescado almacenado a refrigeración (Huss y col, 1974). Thatcher y Clark (1968) afirman que si el recuento de flora mesófila, en pescado de aguas templadas, está por encima del de flora psicrotrofa es indicativo de contaminación por parte de otras fuentes, distintas de su hábitat normal, que pudieran aportar esos gérmenes eminentemente

mesófilos (principalmente enterobacteriáceas y micrococáceas). Hansen (1973), al analizar muestras de trucha arco iris, encontraron diferencias entre los recuentos obtenidos tras realizar un manejo normal del pescado y los obtenidos tras un manejo aséptico del mismo. Esto determinó que existiera, durante parte del almacenamiento a refrigeración, una diferencia de dos unidades logarítmicas/g entre los recuentos llevados a cabo en ambos grupos de pescado. Es más, al final de la vida útil la trucha manejada de modo normal tenía una calidad organoléptica ligeramente inferior a la tratada de modo aséptico.

Por otro lado, la calidad higiénica nos informa de la contaminación inicial del pescado relacionada con un origen fecal, y aportada por el hombre durante su obtención, transporte, almacenamiento, eviscerado, fileteado, etc.... Shewan (1971) afirma que si bien los niveles de microorganismos indicadores (coliformes y enterococos) son bajos tras la captura, tras el manejo pueden aumentar considerablemente. Además, este aspecto tiene importancia desde el punto de vista sanitario, puesto que los microorganismos indicadores nos permiten predecir, indirectamente, la presencia de gérmenes patógenos o sus toxinas.

La calidad sanitaria del pescado, es decir, la presencia de microorganismos de interés desde el punto de vista de la salud pública, también ha sido objeto de estudio, si bien el pescado ha venido considerándose como un alimento seguro al recibir un tratamiento térmico terminal en la mayoría de los casos. De hecho, en la bibliografía revisada en el transcurso de la realización de esta Memoria no hemos apreciado que el número de intoxicaciones alimentarias declaradas debidas al consumo de pescado en países occidentales haya sido muy elevado, puesto que la mayor parte de los microorganismos patógenos vehiculados normalmente por este tipo de alimentos son fácilmente inactivados mediante las técnicas de cocinado habitualmente empleadas (Andrews y col, 1977). Pero estos microorganismos podrían suponer un riesgo, tanto en aquellos pescados que fuesen consumidos crudos o poco cocinados (Binta y col, 1982) como en aquéllos sometidos a tratamientos tecnológicos que no asegurasen su total inactivación (salmueras o ahumado). Por ello, es importante determinar qué microorganismos patógenos están presentes en pescado recién capturado, así como conocer cual puede ser su comportamiento durante el almacenamiento, de manera que se pueda establecer qué tipo de procedimiento tecnológico es el más adecuado para evitar problemas de intoxicaciones alimentarias. Se ha detectado la presencia, en pescado de origen marino, de los siguientes agentes de infecciones alimentarias “sensu lato”: *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatógeno, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Baker y col, 1990; Binta y col, 1982; Salama y Khalafalla, 1992; Youssef y col, 1992), algunos de los cuales han sido identificados como agentes causales de brotes de infección alimentaria “sensu lato” en los que el pescado se ha visto involucrado. También se ha detectado la presencia de microorganismos productores de histamina (Ababouch y col, 1986; López-Sabater y col, 1994).

Por lo que se refiere al pescado de agua dulce, Nedohula y Westhoff (1993) opinan que las condiciones intensivas de producción empleadas en acuicultura pueden facilitar el desarrollo y distribución de microorganismos patógenos. Se han aislado representantes del género *Salmonella* a partir de pescado de agua dulce (Andrews y col, 1977; D’Aoust y col, 1980; Silva y White, 1994; Wyatt y col, 1980), normalmente asociados bien a la contaminación fecal del agua de cría, a la contaminación cruzada por contacto con otros alimentos o utensilios, o bien a la falta de higiene en la manipulación. Este género se ha relacionado, al menos en un caso, con un brote de infección alimentaria por consumo de salmón (Cartwright y Evans, 1988). Wyatt y col (1980) opinan que la presencia de representantes de este género microbiano en pescado fresco es un aspecto a tener en cuenta

ya que pueden contaminar, de manera cruzada, otros alimentos que no van a ser tratados por el calor antes de ser consumidos.

Por otro lado, la descripción de los llamados nuevos patógenos o patógenos emergentes, microorganismos presentes en distintos alimentos y capaces de multiplicarse en condiciones consideradas disgenéticas (p.e., temperaturas de refrigeración, atmósferas modificadas, etc...) para los gérmenes causantes de intoxicaciones alimentarias anteriormente mencionados, ha llevado aparejado un incremento del interés mostrado por algunos investigadores (Leung y col, 1992b) hacia el estudio de la calidad sanitaria de los productos de la pesca que, en su mayoría, son conservados mediante el uso del frío. Entre estos microorganismos destacan el género *Aeromonas* y las especies *Plesiomonas shigelloides* y *Listeria monocytogenes*, bacterias que han sido aisladas en numerosas ocasiones a partir de productos de la pesca y otros alimentos de origen acuático (Nedohula y Westhoff, 1993; Weagant y col, 1988; Youssef y col, 1992).

Plesiomonas shigelloides es el único miembro del género *Plesiomonas*. Tradicionalmente ha sido incluido en la familia *Vibrionaceae*, pero se le considera más próximo a la familia *Enterobacteriaceae* (Brenden y col, 1988; Martínez-Murcia y col, 1992a). Su hábitat principal es el medio acuático, habiéndose visto implicado en brotes de gastroenteritis debidos al consumo de alimentos de ese origen, tales como ostras crudas (Rutala y col, 1982). Ha sido aislado a partir del intestino de pescado de agua dulce, considerado como reservorio de este microorganismo en la naturaleza (Arai y col, 1980; De Paola y col, 1995; Sugita y col, 1993). Tal y como ocurre con *Salmonella*, *P. shigelloides* es un microorganismo que se inactiva fácilmente por el calor, pero su presencia en alimentos que no fuesen a recibir posterior tratamiento térmico supondría un riesgo potencial para la salud pública, principalmente como patógeno oportunista en aquellos individuos pertenecientes a grupos de riesgo, como ancianos, bebés (Cooper y Brown, 1968) e individuos inmunodeprimidos (Brenden y col, 1988). Aldova (1995) se hace eco de que recientemente se han dado casos muy graves de diarrea debida a *P. shigelloides* en individuos debilitados e inmunodeprimidos. Aunque se le ha incluido en el grupo de los microorganismos patógenos emergentes, solamente un número reducido de cepas es capaz de crecer por debajo de los 8°C (Appleyard y Walker, 1995).

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva no esporulada que se ha aislado de gran variedad de alimentos, entre los cuales se encuentran el pescado de agua dulce y el de origen marino (Ben Embarek, 1994; Hartemink y Georgson, 1991; Leung y col, 1992a; Silva y White, 1994). Se caracteriza por la virulencia y elevada mortalidad de los brotes de infección alimentaria que causa. En una ocasión, al menos, se ha relacionado el consumo de pescado con un caso de listeriosis en humana (Facinelli y col, 1989). En otro caso, el consumo de pescado crudo y marisco podría haber jugado cierto papel en el desencadenamiento de una epidemia de listeriosis perinatal en Nueva Zelanda (Lennon y col, 1984). Debido a su virulencia, a su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración (Ben Embarek, 1994; Guyer y Jemmi, 1990) y a su presencia en productos de la pesca (salmón y trucha ahumadas) listos para el consumo (Farber, 1991; Jemmi y Keusch, 1994; Rorvik y col, 1995), podría ser considerado como uno de los microorganismos de obligado seguimiento en industrias de productos de la pesca (Jemmi y Keusch, 1994).

Aeromonas spp, por su parte, será objeto de un amplio estudio en sucesivos capítulos (II y III).

Dentro del apartado de la calidad sanitaria, también es importante mencionar, por último, la posible presencia de microorganismos patógenos esporulados tolerantes al frío,

tales como *Clostridium botulinum* tipo E, capaces de crecer en alimentos envasados en atmósferas modificadas y de producir toxina botulínica (Baker y col, 1990).

Por lo que respecta a la evolución de las poblaciones microbianas a lo largo del almacenamiento a refrigeración y a la consiguiente modificación de la calidad microbiológica, cabe decir que entre las distintas determinaciones microbiológicas que han sido tradicionalmente llevadas a cabo destaca la de la flora aerobia psicrotrofa viable. Este grupo microbiano, por su temperatura óptima de crecimiento y por sus características de crecimiento a bajas temperaturas, se va a desarrollar con mayor facilidad durante el almacenamiento a refrigeración de cualquier alimento, siempre y cuando no existan abusos de temperatura. El inconveniente que posee este parámetro es que precisa de incubaciones prolongadas (hasta diez días a 7°C) para ser determinado. Para estimar de forma indirecta los niveles de microorganismos psicrotrofos, de manera que se pueda obviar ese problema, se podrían realizar determinaciones de flora aerobia mesófila, pero siempre que la evolución de ésta y la de la flora aerobia psicrotrofa estén correlacionadas. La obtención de resultados en los análisis de flora aerobia mesófila es mucho más rápida que en los de flora psicrotrofa (se reduce a 48 h). En cuanto a la carga microbiana asociada a la alteración del pescado se puede afirmar que, en muchas ocasiones, es función del tipo de pescado. Así, León Fajardo y Marth (1979) opinan que debe existir alguna relación entre el tipo de pescado y la carga microbiana máxima que puede soportar sin alterarse. En este campo, los resultados obtenidos han sido muy variables y se comentarán con mayor detenimiento en la discusión del presente capítulo.

El uso de los datos obtenidos en los análisis microbiológicos realizados a lo largo de período de conservación del pescado de agua dulce, con el fin de predecir su vida útil ha sido objeto de estudio por parte de varios autores. A pesar de que en algunos casos ha existido buena correlación entre la predicción de la vida útil y el análisis bacteriológico, esto no siempre ha sido así (Gelman y col, 1990; Tejada y col, 1979). Gelman y col (1990) opinan que, por sí solos, pueden constituir un buen índice de frescura pero no son completamente adecuados para la medición del período de vida útil. Martin y col (1978) consideraron que los recuentos microbianos podrían, por un lado, informar acerca de la frescura o grado de deterioro del pescado y, por otro, predecir la vida útil futura. Venugopal (1990), sin embargo, afirma que el recuento de microorganismos totales no se puede reconocer como un buen método indicador de la calidad y la duración de la vida útil del pescado refrigerado en general. El método de referencia más aceptado y valorado para estimar ambos parámetros (calidad del pescado y duración de la vida útil) es el análisis sensorial (Bennour y col, 1991; Burt y col, 1975), en el cual se examinan las características organolépticas del pescado (apariencia general, apariencia de la carne, textura y olor -Burt y col, 1975) que se puntúan de acuerdo con diferentes escalas. Charm y col (1972) consideran que el olor del pescado es un indicador primario de calidad, mientras que la apariencia es un indicador menor de la misma. Este sistema también cuenta con inconvenientes como son el largo entrenamiento a que se han de someter los miembros del panel de catadores y la existencia de factores dependientes de las personas que lo aplican (Burt y col, 1975).

Los objetivos de nuestro estudio, contenidos en el presente capítulo, se relacionan a continuación. Por un lado, la determinación y comparación de la calidad microbiológica e higiénica de tres especies de pescado de agua dulce (trucha común -*Salmo trutta*-, trucha arco iris -*Oncorhynchus mykiss*- y lucio -*Esox lucius*-) en el momento de su obtención. Por otro,

conocer la evolución de los grupos microbianos de mayor interés desde el punto de vista de la conservación (flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrofa) a lo largo de su almacenamiento a refrigeración. En esta misma línea, también se ha investigado la presencia de determinados microorganismos agentes de infecciones alimentarias “sensu lato”, tales como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Plesiomonas shigelloides*. Asimismo, y con el fin de estimar de un modo indirecto la posible presencia de microorganismos esporulados tolerantes al frío de importancia en salud pública, se realizó el seguimiento de los niveles de anaerobios totales a lo largo del período de conservación. Finalmente, también se ha procedido a la determinación, de manera aproximada, de la vida útil comercial de estas especies de pescado, basándonos en las modificaciones de las características organolépticas a lo largo del almacenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de pescado

Se han estudiado tres especies de pescado de agua dulce: trucha común (*Salmo trutta*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y lucio (*Esox lucius*). El origen, el método de captura, el número de lotes estudiados correspondientes a cada especie y la época del año en que fueron obtenidos aparecen detallados en la tabla I.1. Inmediatamente tras su captura, los distintos ejemplares de pescado fueron sacrificados mediante rotura mecánica de la espina dorsal a nivel de la unión de la cabeza con el tronco.

Tabla I.1. Características generales de los pescados de agua dulce estudiados.

Especie	Origen	Método de captura	Lotes	Fecha de capturas
Trucha común	Vida libre	Caña y anzuelo	10	Abril-Julio 1991
Trucha arco iris	Piscifactoría	Red	10	Febrero-Julio 1992
Lucio	Vida libre	Shock eléctrico y red	4	Agosto 92-Marzo 93

Plan de muestreo

Inmediatamente después de su captura los ejemplares de trucha arco iris y lucio fueron colocados en recipientes de plástico de cierre hermético, tipo "Tupper-ware", y cubiertos con hielo picado. El primer análisis microbiológico se llevó a cabo dentro de las seis a ocho horas siguientes a su obtención. Los ejemplares de trucha común, por ser obtenidos en el transcurso de jornadas de pesca deportiva, no fueron sometidos a refrigeración hasta cinco horas después de ser capturados. El primer muestreo, en este caso, se realizó entre las nueve a trece horas siguientes a su llegada al laboratorio. Cada lote de pescado contenía entre tres y seis ejemplares, en función del tamaño de los mismos. Asimismo, y acompañando a cada lote de pescado, se obtenían muestras de agua tomada en los lugares donde se capturaron los distintos ejemplares (200 ml de agua en recipientes de vidrio estéril).

Una vez que las muestras de pescado hubieron llegado al laboratorio y se realizó el primer análisis microbiológico, la mitad de los ejemplares de cada lote fueron eviscerados, con el fin de estudiar el efecto de esta manipulación sobre la evolución de los distintos grupos microbianos y sobre la vida útil del pescado fresco, y mantenidos a refrigeración (3-4°C) durante quince días. La otra mitad de los ejemplares de cada lote se almacenaba, sin eviscerar, en idénticas condiciones. El agua procedente de la fusión del hielo era eliminada diariamente y reemplazada por más hielo picado.

Las muestras tomadas a partir del pescado recién capturado, así como el método empleado en cada caso para la obtención de homogeneizados y/o diluciones de la muestra original, se describen a continuación:

- **Piel o superficie externa.** Procedimiento de raspado y aclarado con agua de peptona bacteriológica (Oxoid) al 0,1% (Williams, 1967). Para ello se empleó un cilindro de 3.5 cm de altura y 6 cm² de base, con ambos extremos huecos, que se aplicaba sobre la superficie de la pieza de pescado. A continuación, se añadían 10 ml de agua de peptona bacteriológica al 0.1% y, con ayuda de una espátula estéril, se raspaba la superficie a muestrear con el fin de liberar los microorganismos al medio fluido. A partir de esta muestra inicial se realizaron diluciones decimales, empleando el mismo tipo de diluyente que para el aclarado, siguiendo el procedimiento descrito por la APHA (1984).
- **Agallas e intestino.** Procedimiento de escisión y homogeneizado (Stomacher Lab-blender) en agua de peptona bacteriológica al 0.1%.

Durante el almacenamiento a refrigeración del pescado, y con intervalos de 72 horas, se tomaron las siguientes muestras:

- Ejemplares eviscerados: piel y superficie de la cavidad abdominal. En ambos casos, por el procedimiento de raspado y aclarado anteriormente descrito.
- Ejemplares no eviscerados: piel (mediante raspado y aclarado) y tejido muscular. La obtención de muestras de tejido muscular se llevó a cabo por escisión, realizando diversos cortes, con un bisturí estéril, en una zona de 9 cm² de piel. A continuación, ésta se retiraba de forma aséptica y se procedía a tomar una muestra significativa de tejido muscular de la zona subyacente. Como en los casos anteriores, a partir de la muestra homogeneizada inicial en agua de peptona bacteriológica al 0.1% se realizaron diluciones decimales en este mismo diluyente.

Todos los métodos arriba detallados se utilizaron para llevar a cabo las determinaciones de microorganismos aerobios viables. Para el estudio de las poblaciones de microorganismos anaerobios totales en todas las muestras, los aclarados, homogeneizados y diluciones decimales se realizaron en el Caldo Reforzado para Clostridios (RCM, Oxoid) siguiendo las indicaciones recomendadas por Barnes (1985).

Determinaciones microbiológicas.

Una vez obtenidas las diluciones decimales de las distintas muestras, se procedió a la siembra de partes alicuotas de las mismas en los medios sólidos y/o líquidos correspondientes a cada uno de los grupos microbianos a investigar. Siempre que fue posible (sólo en los análisis de las muestras de trucha arco iris y lucio) también se realizaron siembras directas empleando el líquido de aclarado obtenido a partir de piel y de la superficie de la cavidad abdominal (dilución 10⁰).

Los grupos microbianos estudiados tras la captura del pescado y a lo largo del almacenamiento a bajas temperaturas fueron los siguientes:

Flora aerobia mesófila viable. Se determinó por la técnica de siembra en profundidad. El medio empleado fue Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid), incubándose las placas durante 48 h a 30°C (APHA, 1984).

Flora aerobia psicrotrofa viable. Se empleó la técnica de recuento por siembra en la superficie del medio TSA (Oxoid) e incubación a 7°C durante 10 días (APHA, 1984).

En ambos casos, y tras el período de incubación, se procedió al recuento de las colonias visibles macroscópicamente. Tras este recuento, y con la ayuda de un Disco de Harrison (Harrigan y McCance, 1976), se realizó la selección y aislamiento al azar de colonias (cinco por dilución) a partir de las placas que contenían entre 30 y 300 colonias (*Flora aerobia mesófila viable*) y entre 25 y 250 (*Flora aerobia psicrotrofa viable*).

Flora anaerobia total. Partiendo de las diluciones decimales llevadas a cabo en Caldo RCM (Oxoid) se realizaron las siembras de alícuotas de 0.1 ml en la superficie del Agar RCM (Oxoid). Una vez repartido homogéneamente el inóculo en la superficie del medio con ayuda de un asa de vidrio estéril, las placas se colocaron en jarras de anaerobiosis en las cuales se introducía un sistema de producción de CO₂ (Sistema para la Generación de Gas para anaerobiosis, Oxoid). La incubación se realizó a 37°C durante cinco días, período tras el cual se procedió al recuento de colonias presentes en el medio (Barnes, 1985).

Aeromonas. Todo lo referente al recuento y aislamiento de miembros de este grupo microbiano se trata con detalle en el capítulo II.

Los grupos microbianos descritos a continuación fueron investigados, solamente, al llevar a cabo el primer muestreo de cada lote, inmediatamente tras la captura de los distintos ejemplares, con el fin de evaluar su calidad higiénica y sanitaria:

Enterobacteriáceas. En este caso, la técnica empleada fue la de siembra en profundidad, utilizando el medio Agar Glucosa con Cristal Violeta, Rojo Neutro y Sales Biliares (VRBGA, Oxoid), con sobrecapa del mismo medio (APHA, 1984). Las placas se incubaron en posición invertida durante un período de 48 horas a 37°C, tras el cual se procedió al recuento de colonias características, de color púrpura con un halo de este mismo color a su alrededor.

Enterococos. Se determinaron por la técnica del Número Más Probable (NMP, Harrigan y McCance, 1976) utilizando series de tres tubos por dilución, que contenían 9 ml del Caldo Kanamicina Esculina Azida (KAA, Oxoid). Los tubos, tras ser inoculados con 1 ml de las correspondientes diluciones, se incubaron a 37°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el período de incubación se observó la presencia o ausencia de ennegrecimiento (característico de este grupo microbiano como consecuencia de la hidrólisis de la esculina) en los tubos. Con objeto de confirmar su presencia, se procedió a su subcultivo en el Agar KAA (Oxoid). Si, tras incubar las placas durante 24 h a 37°C, se apreciaban áreas de ennegrecimiento alrededor de las colonias, los tubos correspondientes eran confirmados como positivos (Mossel y Moreno, 1985). Para el cálculo cuantitativo de la presencia de Enterococos se utilizaron las tablas del NMP que aparecen en Harrigan y McCance (1976).

Plesiomonas shigelloides. Para la detección de este microorganismo en muestras de agua y pescado se empleó la siembra directa en la superficie del Agar Inositol Verde Brillante con Sales Biliares (IBB, Schubert, 1984). A continuación, las placas se incubaron a 35°C durante 48 horas. Las colonias rosado blanquecinas y de 2 mm de diámetro (sospechosas de pertenecer a esta especie microbiana) se aislaron para posterior confirmación. Esta confirmación consistió en la realización de las pruebas bioquímicas que se detallan a continuación y en las que la cepa tipo de *Plesiomonas shigelloides* ATCC 14029 se utilizó como control positivo.

1. **Prueba de la oxidasa.** A un cultivo de 24 h en Agar Nutritivo (Oxoid) se le añadieron unas gotas de un reactivo que se obtiene mezclando, a partes iguales, una solución acuosa de clorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina (Sigma) al 1% y otra solución de α -naftol (Sigma) al 1% en etanol (Panreac) al 95% (Cowan, 1974). La aparición, en unos segundos, de color púrpura en la superficie de las colonias era indicativo de la presencia de la enzima citocromo-*c* oxidasa.
2. **Siembra en el medio TSI (Agar Tres Azúcares Hierro, Oxoid).** Tras la incubación a 35°C durante 48 h, las cepas pertenecientes a la especie *P. shigelloides* daban lugar a una reacción alcalina (rosácea) en el pico y ácida (color amarillo) en el fondo del tubo, sin producción de gas ni de H₂S (Koneman y col, 1989).
3. **Siembra en el medio Inositol-gelatina:** Tras el período de incubación correspondiente, a 35°C durante 48 h, las cepas que se adscribieron a *P. shigelloides* dieron lugar a una reacción característica en la que el indicador viraba hacia el color amarillo, debido a la producción de ácido a partir de inositol, y sin que se detectara licuefacción de la gelatina (Miller y Koburger, 1986).

Las cepas confirmadas como *P. shigelloides* fueron enviadas al Instituto Nacional Checo de Salud Pública (Praga, República Checa) para su serotipificación.

Salmonella. Se estudio se llevó a cabo empleando el método de filtración a través membrana con rejilla hidrofóbica (Iso Grid^R, Anónimo, 1989). Se siguieron los pasos que se detallan a continuación:

1) Preenriquecimiento no selectivo: se homogeneizaron, por cada lote, 25 g de pescado (25 ml de cada muestra de agua fluvial, en su caso) en 225 ml de Caldo Nutritivo (Oxoid) que se incubaron a 37°C durante 18 h.

2) Enriquecimiento selectivo: tras dicha incubación, de cada matraz de enriquecimiento no selectivo se transfirieron 0.1ml a tubos conteniendo 10ml de Caldo Rappaport-Vasiliadis (Oxoid), que se incubaron, en un baño termostático, durante seis horas a 35°C.

3) Filtración. A partir de cada caldo de enriquecimiento selectivo se filtraron 0.1 ml. El filtro (QA Life Sciences, Inc.; de 1600 celdillas) se transfirió a la superficie del medio EF-18 (QA Life Sciences, Inc.). A continuación, se realizó la filtración de 1 ml del caldo y se procedió como en el caso anterior.

4) Incubación y lectura. Las placas de EF-18 se incubaron 24 horas a 42°C, tras lo cual se procedió a la búsqueda de colonias sospechosas de pertenecer a *Salmonella*, colonias de coloración verde-azulada y que exhibían fluorescencia al aplicar luz UV ($\lambda = 365$ nm). Estas colonias, así como aquéllas que también mostraban fluorescencia bajo la luz UV tras aplicar unas gotas del reactivo para el test MUCAP (Bio-Life), fueron aisladas.

Todas las cepas sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* fueron confirmadas como tales mediante siembra en Agar TSI (Oxoid) y Agar LIA (Agar Lisina Hierro, Oxoid).

La identificación de aquellas cepas que dieron reacciones típicas (con producción de H₂S en ambos medios, pico alcalino en TSI, fondo ácido en TSI y fondo alcalino en LIA) fue confirmada mediante la utilización de galerías API 20E. Posteriormente fueron serotipificadas en el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias sito en Majadahonda (Madrid).

Listeria monocytogenes. Para la detección de este microorganismo se utilizó la técnica de enriquecimiento selectivo descrita por Lovett y col (1988). Se homogeneizaron 10 g de alimento en 90 ml de caldo de enriquecimiento de Lovett y col (1988), con incubación a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, se extendió 0.1 ml de cada caldo de enriquecimiento en la superficie del Agar Oxford (Oxoid). Las placas así sembradas se incubaron durante 48h a 30°C. Las colonias sospechosas de pertenecer a esta especie presentan, al crecer en este medio, las siguientes características: 1 mm de diámetro, color verdoso y con un halo de ennegrecimiento por hidrólisis de la esculina. Este protocolo aparece descrito en la Norma Provisional FIL-IDF 143 (1990).

Todas las colonias aisladas, tanto de las placas de recuento general como de los medios selectivos empleados para la detección de microorganismos patógenos, fueron subcultivadas en Caldo Triptona de Soja (Oxoid), las cepas aisladas de trucha común, o en Caldo Nutritivo (Oxoid), el resto. Posteriormente fueron purificadas en TSA (Oxoid). Las cepas puras se almacenaron, para realizar posteriores estudios, tanto en agar inclinado (TSA, Oxoid) a 4°C, como en glicerol al 40% (-70°C).

Las cepas de interés sanitario (*Salmonella*, *Plesiomonas shigelloides* y *L. monocytogenes*), aisladas y confirmadas como tales, fueron sometidas a un estudio de sensibilidad a los compuestos antimicrobianos que se relacionan a continuación: Ampicilina (25 µg), Cloranfenicol (150 µg), Colistina (100 µg), Gentamicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Acido Nalidíxico (30 µg), Nitrofurantoína (50 µg), Estreptomina (25 µg), Tetraciclina (100 µg), Ticarcilina (75 µg), Trimetoprim (2,5 µg) y Sulfametoxazol (50 µg).

Estos compuestos, que estaban contenidos en discos (Mast^R Diagnostics), se aplicaron sobre la superficie del medio Mueller-Hinton (Oxoid) tras haber sembrado, la cepa problema, por extensión en su superficie. Las placas se incubaron a 30°C y, tras 48 horas, se visualizó la presencia o ausencia de halos de aclaramiento alrededor del disco, indicadores de la sensibilidad del microorganismo examinado frente al antibiótico correspondiente (Hatha y Lakhsmanaperumalsamy, 1995).

Finalmente, se determinó el Índice de Resistencia a Múltiples Antibióticos de acuerdo a Hatha y Lakhsmanaperumalsamy (1995).

Estimación de la vida útil comercial. Análisis sensorial

Se llevó a cabo mediante la observación de las características organolépticas de los ejemplares estudiados y utilizando como referencia el esquema de puntuación establecido por el Consejo de la Unión Europea en su Reglamento (CEE) número 103/76, de 19 de Enero de 1976. Este esquema se basa en las modificaciones en el aspecto, y en otras cualidades perceptibles por los sentidos, que experimenta el pescado a lo largo de su conservación a bajas temperaturas. Estas modificaciones desembocan en la pérdida de frescura y en la

consiguiente alteración y rechazo por parte del consumidor. Consideramos que el pescado no cumplía unas condiciones mínimas para ser consumido cuando la media de la suma de las puntuaciones parciales correspondientes a cada característica tenida en cuenta era 1 o menor de 1.

Análisis estadístico

Las medias y desviaciones típicas de los recuentos microbianos (expresadas como logaritmo de unidades formadoras de colonias/cm², g ó ml), así como el test de significatividad entre dichas medias, se calcularon con el programa “Statistica for Windows Release 4.5” (Statsoft Ltd, Chicago).

RESULTADOS

En las tablas I.2 a I.5 aparecen los valores medios y las desviaciones típicas de los recuentos de las distintas floras microbianas investigadas en los ejemplares recién capturados y en el agua tomada de su hábitat.

Tabla I.2. Carga microbiana en la piel de los peces recién capturados.

Grupo microbiano	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
FAM ⁽¹⁾	* ^a 3.83±1.03 ⁽³⁾	^{ab} 2.92±1.20	^b 2.24±1.23
FAP ⁽²⁾	^a 4.44±0.82 ⁽³⁾	^b 2.80±0.72	^b 2.61±1.14
Anaerobios totales	^a 4.81±0.82 ⁽³⁾	^b 2.84±1.82	^b 2.29±1.75
Enterobacteriáceas	^a 1.37±1.18 ⁽³⁾	^a 1.00±0.00	^a 1.00±0.00
Enterococos	0.62±0.89 ⁽⁴⁾	ND ⁽⁵⁾	ND

⁽¹⁾FAM, flora aerobia mesófila viable; ⁽²⁾FAP, flora aerobia psicrotrofa viable; ⁽³⁾log ufc/cm²; ⁽⁴⁾log NMP/cm²; ⁽⁵⁾ND, niveles por debajo del límite de detección; *los recuentos en la misma fila que presentan alguna letra (superíndice) en común no muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí.

Tabla I.3. Carga microbiana en las agallas de los peces recién capturados.

Grupo microbiano	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
FAM ⁽¹⁾	* ^{ab} 4.29±0.72 ⁽³⁾	^a 3.85±0.77	^b 5.10±0.54
FAP ⁽²⁾	^{ab} 4.58±1.20 ⁽³⁾	^a 4.03±0.73	^b 5.71±0.74
Anaerobios totales	^a 4.89±0.05 ⁽³⁾	^a 3.33±1.48	^b 5.00±1.57
Enterobacteriáceas	^a 2.23±1.12 ⁽³⁾	^b 1.19±0.26	^a 3.49±1.03
Enterococos	^a 0.42±0.79 ⁽⁴⁾	^a 0.04±0.12	^a 0.20±0.30

⁽¹⁾FAM, flora aerobia mesófila viable; ⁽²⁾FAP, flora aerobia psicrotrofa viable; ⁽³⁾log ufc/g; ⁽⁴⁾log NMP/g; *los recuentos en la misma fila que presentan alguna letra (superíndice) en común no muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí.

Tabla I.4. Carga microbiana en el intestino de los peces recién capturados.

Grupo microbiano	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
FAM ⁽¹⁾	* ^a 6.65±0.91 ⁽³⁾	^b 3.84±0.60	^a 5.52±1.13
FAP ⁽²⁾	^a 6.94±1.01 ⁽³⁾	^b 4.25±1.20	^a 6.01±0.97
Anaerobios totales	^a 7.00±1.24 ⁽³⁾	^b 4.44±1.52	^b 5.44±1.65
Enterobacteriáceas	^a 4.67±1.14 ⁽³⁾	^b 1.37±0.68	^a 4.37±0.93
Enterococos	^a 0.25±0.64 ⁽⁴⁾	ND ⁽⁵⁾	^a 0.09±0.19

⁽¹⁾FAM, flora aerobia mesófila viable; ⁽²⁾FAP, flora aerobia psicrotrofa viable; ⁽³⁾log ufc/g; ⁽⁴⁾log NMP/g; ⁽⁵⁾ND, niveles por debajo del límite de detección; *los recuentos en la misma fila que presentan alguna letra (superíndice) en común no muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí.

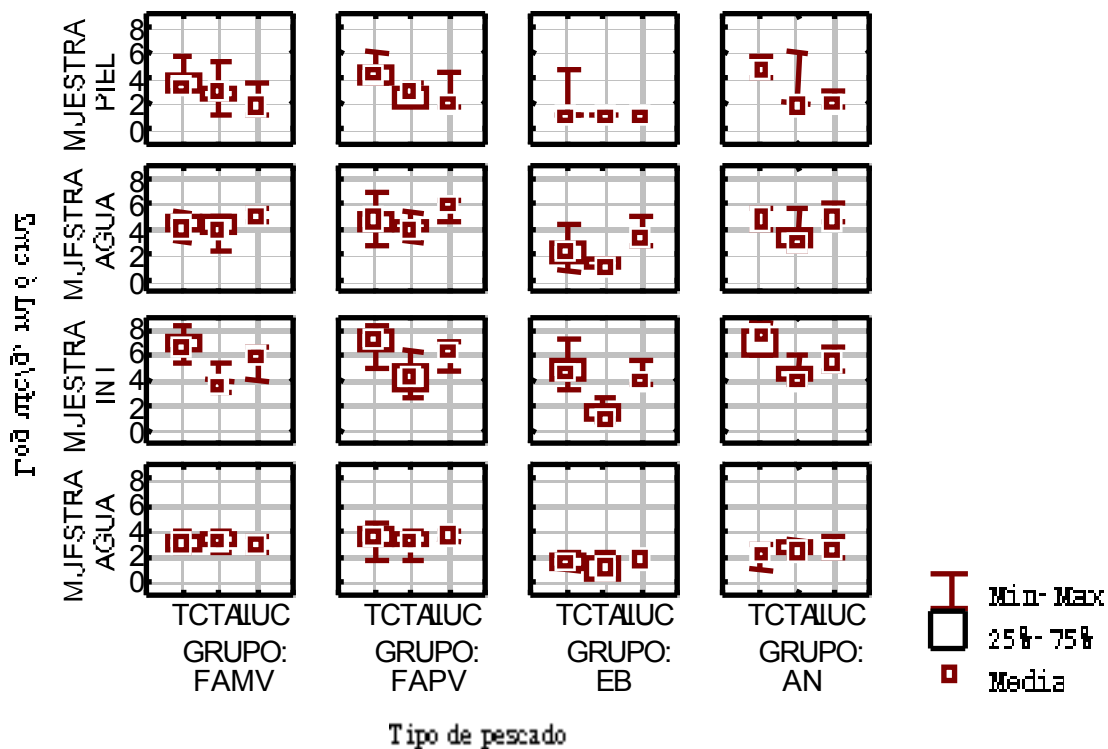
Tabla I.5. Carga microbiana del agua procedente de los lugares de captura de los distintos ejemplares.

Grupo microbiano	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
FAM ⁽¹⁾	* ^a 3.01±0.53 ⁽³⁾	^a 3.24±0.43	^a 2.87±1.03
FAP ⁽²⁾	^a 3.32±0.99 ⁽³⁾	^a 3.18±0.70	^a 3.63±0.34
Anaerobios totales	^a 2.01±2.05 ⁽³⁾	^a 2.41±0.92	^a 2.62±1.40
Enterobacteriáceas	^a 1.53±0.51 ⁽³⁾	^a 0.77±0.74	^a 1.71±0.50
Enterococos	^a 0.13±0.19 ⁽⁴⁾	^a 0.28±0.36	^a 0.81±0.22

⁽¹⁾FAM, flora aerobia mesófila viable; ⁽²⁾FAP, flora aerobia psicrotrofa viable; ⁽³⁾log ufc/ml; ⁽⁴⁾log NMP/ml; *los recuentos en la misma fila que presentan alguna letra (superíndice) en común no muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sí.

En la figura I.1 se presenta para cada grupo microbiano y lugar de muestreo (agua, piel, agallas e intestino) los recuentos (media, rango 25-75%, valores mínimo y máximo para cada determinación) obtenidos en cada una de las especies de pescado analizadas.

Figura I.1. Distribución de los recuentos de microorganismos mesófilos, psicrotrofos, anaerobios y enterobacteriacéas encontrados en ejemplares de peces de agua dulce recién capturados en función tanto de la especie como de la zona de muestreo.



En la tabla I.6 aparece el número de lotes de las distintas especies de pescado en las que se detectaron microorganismos patógenos de interés en relación con la Salud Pública.

Tabla I.6. Incidencia de microorganismos de interés sanitario en los distintos lotes de pescado (y sus muestras de agua correspondientes) analizados.

	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
<i>Salmonella</i> spp	0/10*	1/10 ⁽¹⁾	0/4
<i>P. shigelloides</i>	0/10	0/10	1/4 ⁽²⁾
<i>L. monocytogenes</i>	0/10	0/10	0/4

*, número de lotes en que fueron detectados los microorganismos problema/número total de lotes de cada especie de pescado investigados; ⁽¹⁾, solamente en una muestra de agua se detectaron dos cepas; ⁽²⁾ una cepa en una muestra de agua y otra en una de intestino, correspondientes ambas al mismo lote.

Los perfiles, en el sistema API 20E, de las cepas (2) de *Salmonella* aisladas en el agua de piscifactoría fueron idénticos entre sí y correspondían a *Salmonella* spp. En el estudio realizado en el C.N.M.V.I.S. de Majadahonda, se identificó a ambas cepas como *S. enterica* subsp. I y se determinó que el serotipo y el lisotipo, también en ambos casos, fueron *Typhimurium* 4,5,12:i:1,2 y 104 b, respectivamente.

Según el Esquema Antigénico Internacional de *P. shigelloides*, la cepa 313 (aislada a partir de muestras intestinales de lucio) pertenecía al serotipo O38:H desconocido. La cepa 314 (aislada en agua de río) no pudo ser serotipada mediante el Esquema Antigénico Internacional, pero sí mediante el Esquema de Schubert. De tal modo, resultó pertenecer al serotipo Schubert O29:inmóvil.

A continuación, se pueden apreciar los patrones de sensibilidad, frente a compuestos antimicrobianos, mostrados por las cepas de *Salmonella* y *P. shigelloides*.

Tabla I.7. Patrón de resistencia a compuestos antimicrobianos de los microorganismos de interés sanitario.

Antibiótico	Cepas analizadas		
	<i>Salmonella</i> 351*	<i>P. shigelloides</i> 313	<i>P.shigelloides</i> 314
Ampicilina	R ⁽¹⁾	R	R
Cloranfenicol	S ⁽¹⁾	S	S
Colistina	S	S	S
Gentamicina	S	S	S
Kanamicina	S	S	S
Acido nalidíxico	S	S	S
Nitrofurantoina	d ⁽²⁾	S	S
Streptomycin	R	R	R
Tetraciclina	R	S	S
Ticarcilina	R	R	R
Trimetoprim	S	S	S
Sulfametoxazol	R	d	R
Índice RMA ⁽³⁾	0.45	0.27	0.35

⁽¹⁾ S, sensibilidad, R, resistencia; ⁽²⁾ d, resultado dudoso; ⁽³⁾ RMA, Resistencia a Múltiples Antibióticos (cociente entre el número de antibióticos frente a los que una cepa es resistente y el número total de antibióticos examinados para esa cepa); *, la otra cepa de *Salmonella* identificada (352) presentó un antibiograma idéntico al de la cepa 351.

La vida útil comercial estimada (en función del estudio de las características organolépticas de los ejemplares de pescado analizados) de las distintas especies estudiadas, tanto evisceradas como no evisceradas, cuando se almacenaron a refrigeración aparece reflejada en la tabla I.8. Los valores que aquí se presentan son la media de la vida útil estimada de los ejemplares de pescado analizados.

Tabla I.8. Estimación de la vida útil comercial.

	ejemplares eviscerados	ejemplares no eviscerados
Trucha común	12*	9
Trucha arco iris	11-12	9
Lucio	13-14	10

*, número de días.

En las figuras I.2 a I.16 aparece reflejada la evolución de las poblaciones microbianas de microorganismos mesófilos, psicrotrofos y anaerobios en las distintas muestras estudiadas, desde el segundo muestreo llevado a cabo, hasta el final del almacenamiento (día 15). Los valores que se recogen en estas figuras son los correspondientes a las medias de los recuentos realizados y vienen expresados como log ufc/cm² ó g.

Figura I.2. Evolución de recuentos de flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrofa en muestras de trucha común.

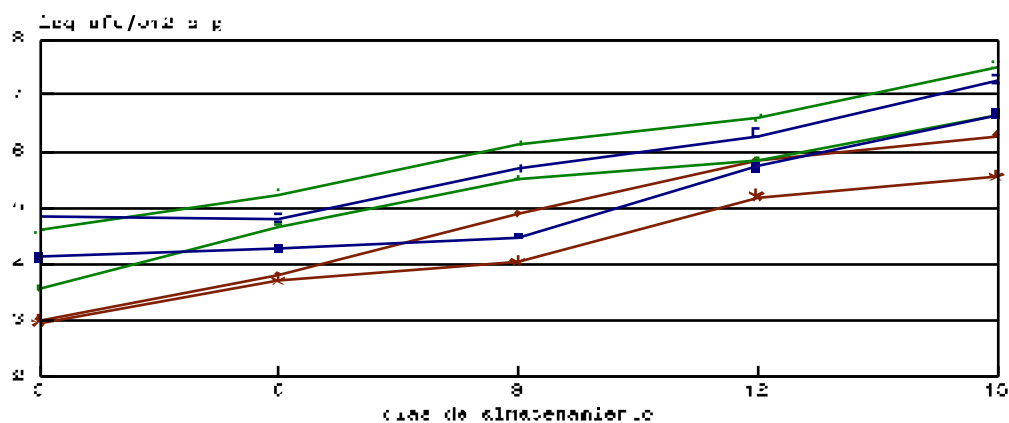


Figura I.3. Evolución de recuentos de flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrofa en muestras de trucha arco iris.

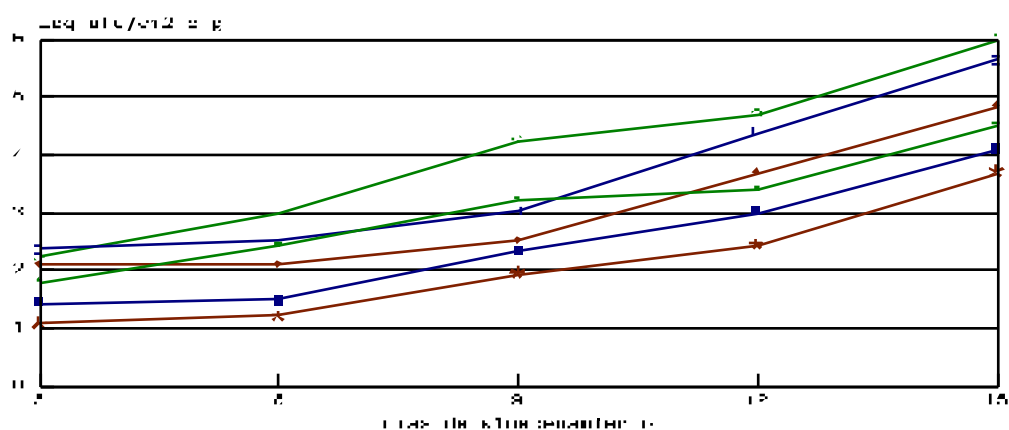
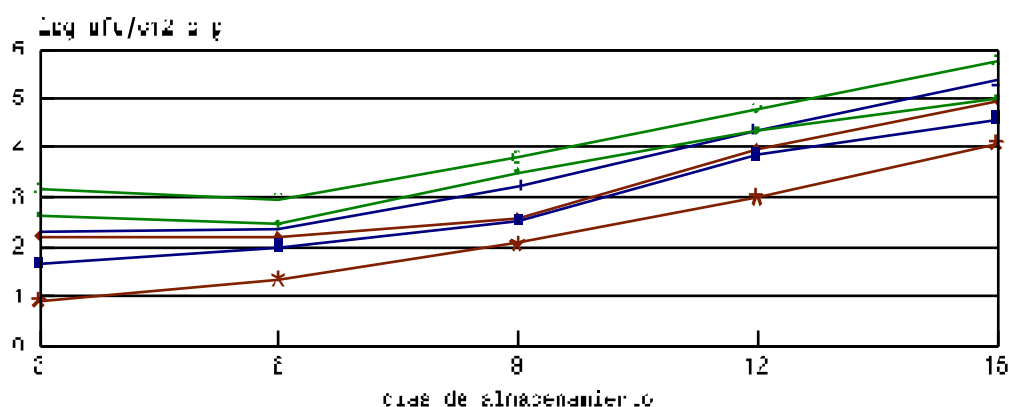


Figura I.4. Evolución de recuentos de flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrofa en muestras de lucio.



■ FAM piel	▲ FAM cavidad abdominal	★ FAM tejido muscular
■ FAP piel	▲ FAP cavidad abdominal	★ FAP tejido muscular

Figura I.5. Evolución de flora aerobia mesófila en muestras de piel.

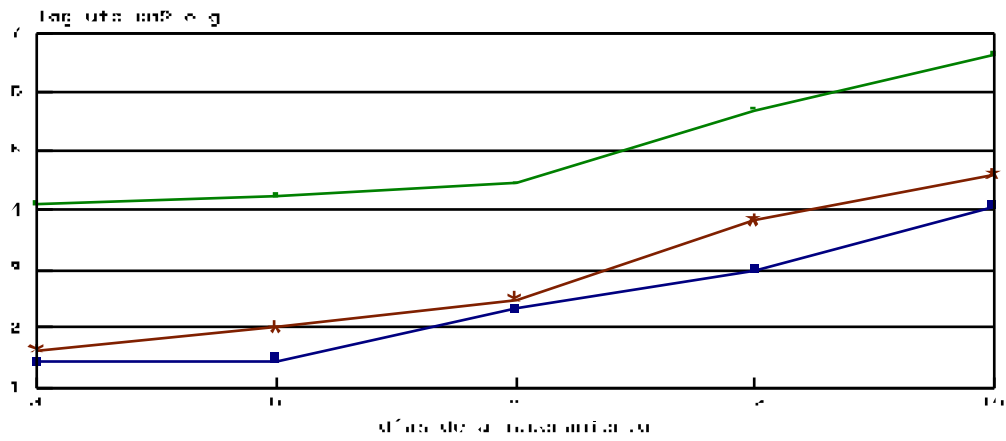


Figura I.6. Evolución de flora aerobia mesófila en muestras de la superficie de la cavidad abdominal.

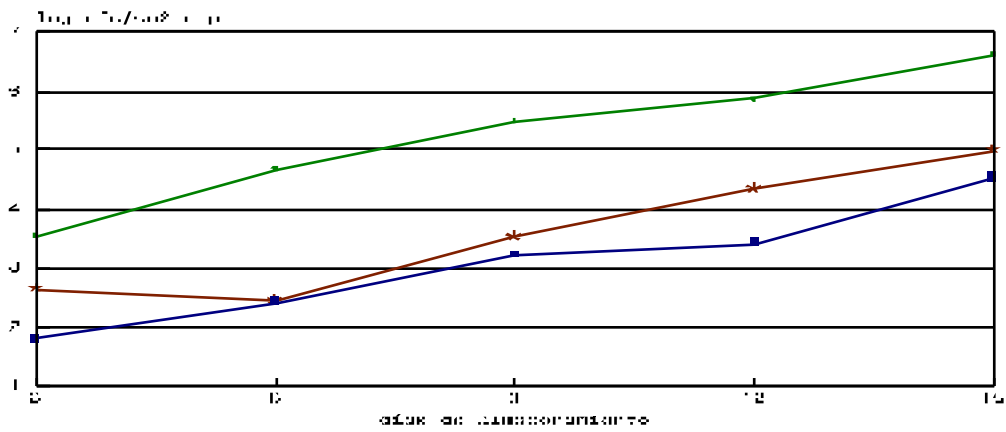


Figura I.7. Evolución de flora aerobia mesófila en muestras de tejido muscular.

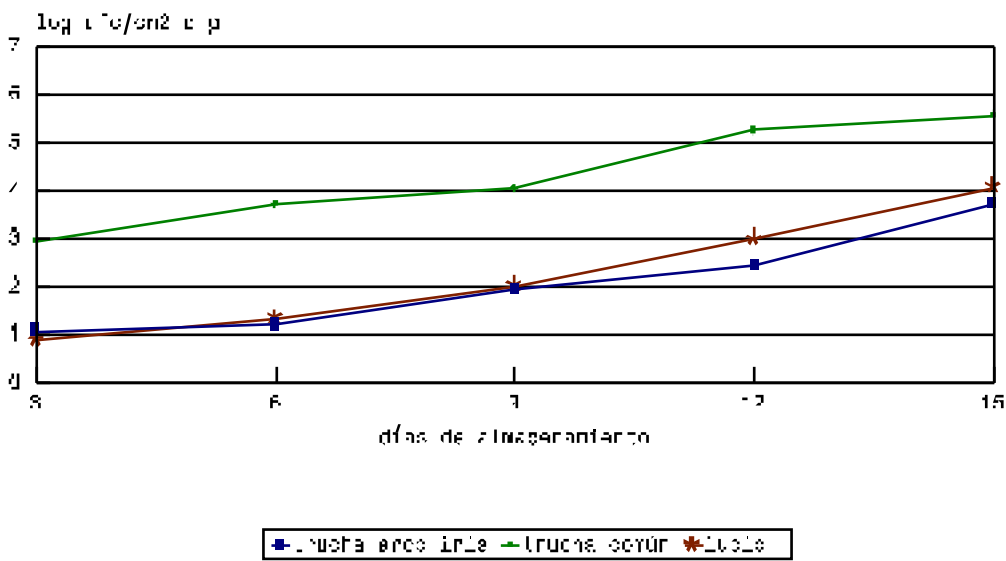


Figura I.8. Evolución de flora aerobia psicrotrofa en muestras de piel.

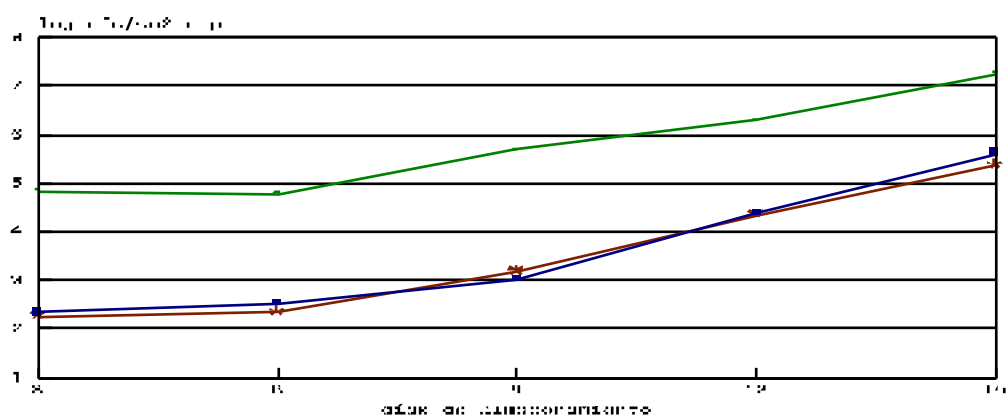


Figura I.9. Evolución de flora aerobia psicrotrofa en muestras de superficie de la cavidad abdominal.

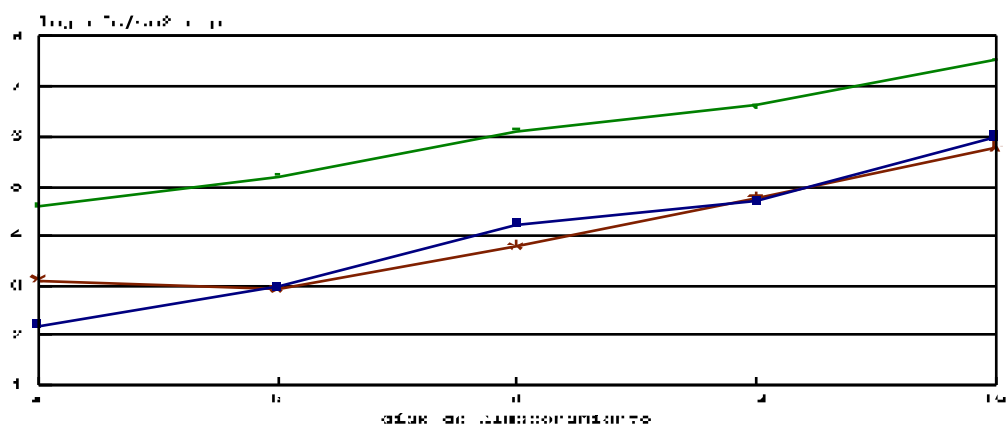
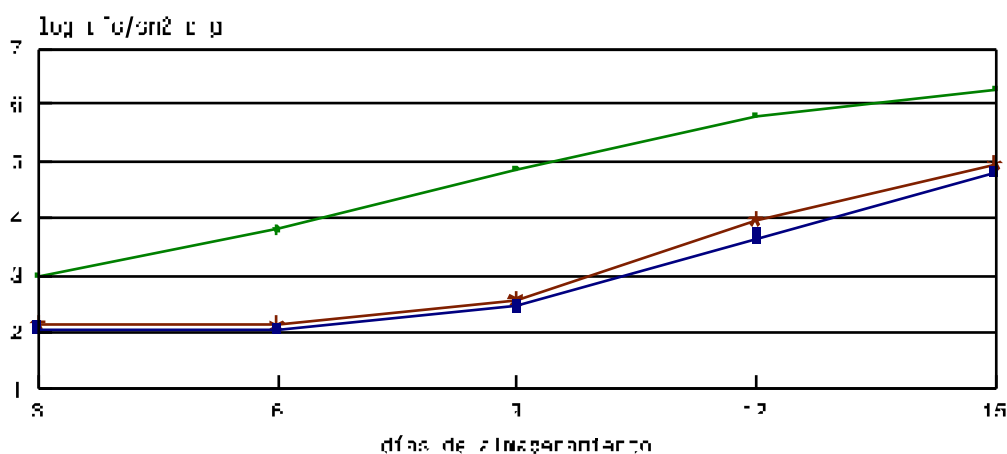


Figura I.10. Evolución de flora aerobia psicrotrofa en muestras de tejido muscular.



■ MUESTRA AROS INLE ■ MUESTRA SCYUP * MUESTRA

Figura I.11. Evolución de flora anaerobia en muestras tomadas de trucha común.

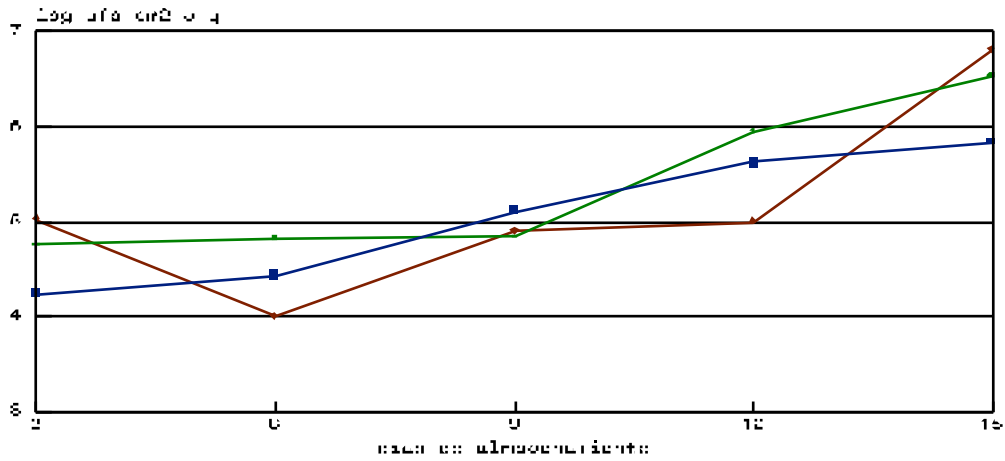


Figura I.12. Evolución de flora anaerobia en muestras tomadas de trucha arco iris.

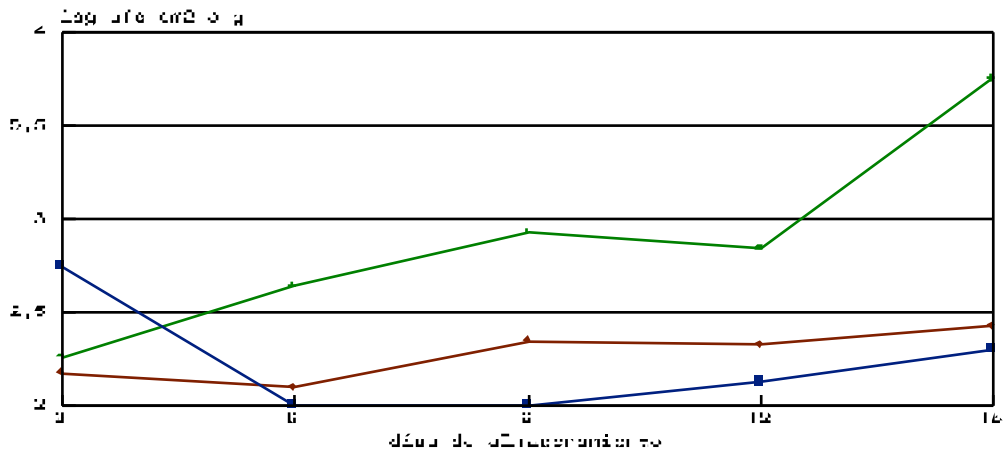


Figura I.13. Evolución de flora anaerobia en muestras tomadas de lucio.

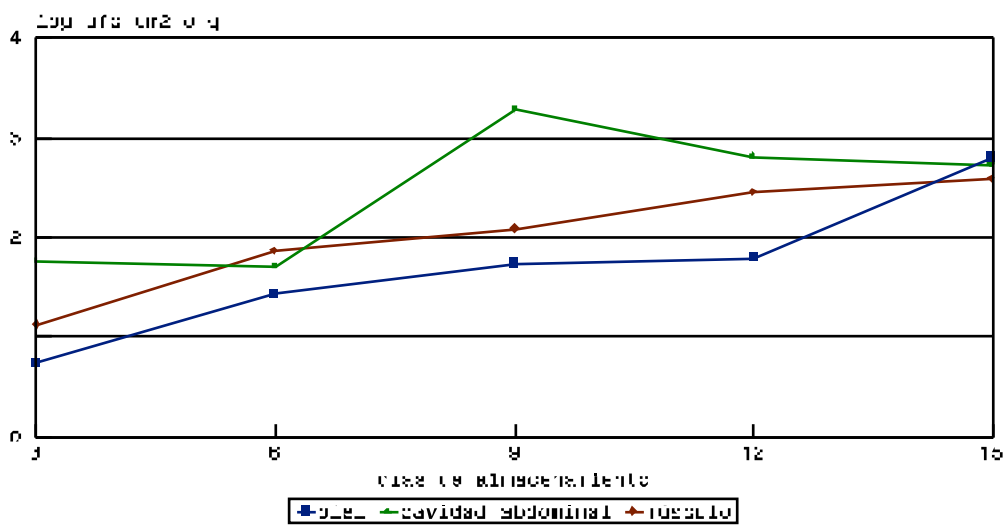


Figura I.14. Evolución de flora anaerobia en muestras tomadas de piel.

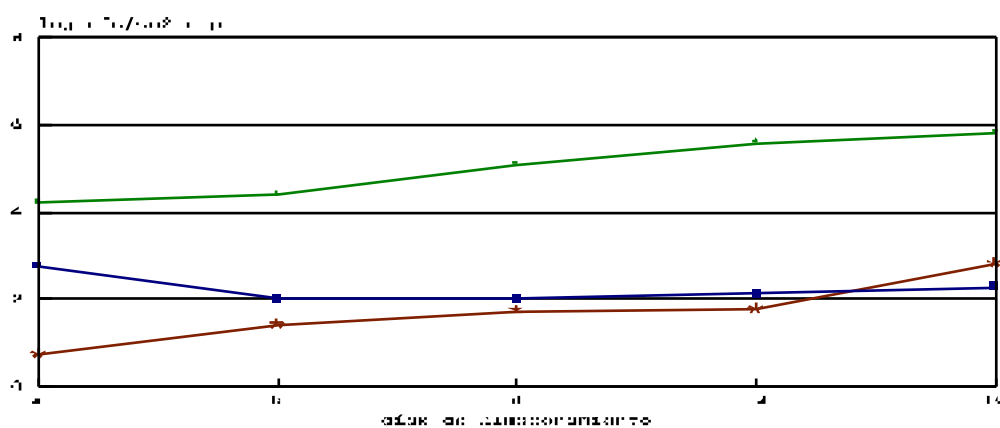


Figura I.15. Evolución de flora anaerobia en muestras tomadas de cavidad abdominal.

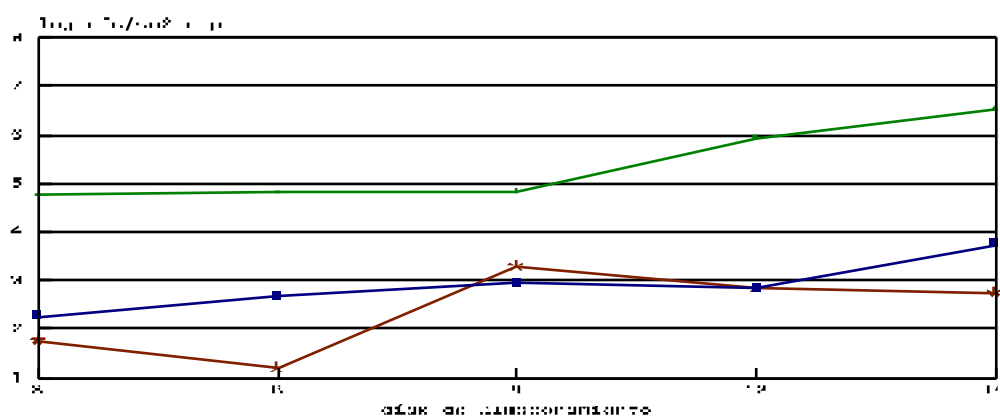
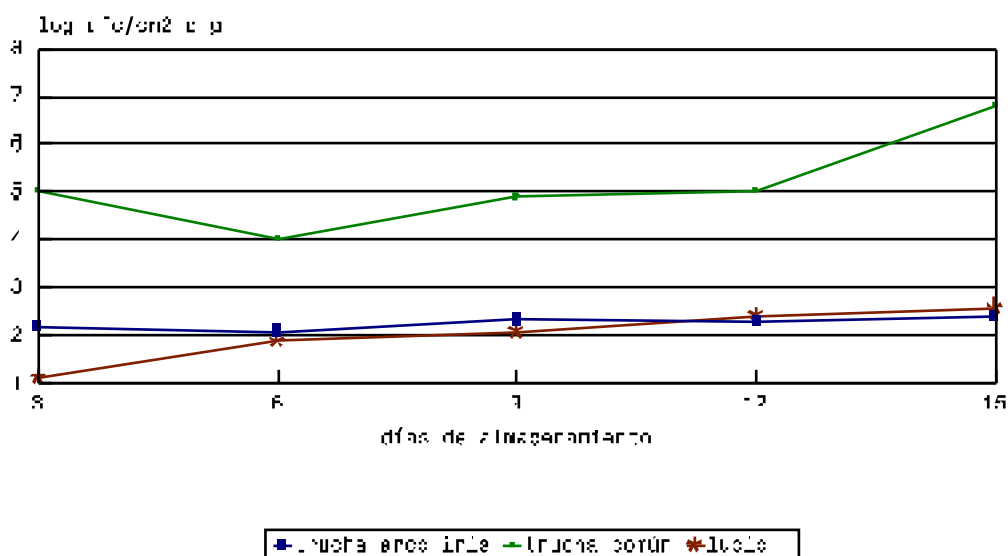


Figura I.16. Evolución de flora anaerobia en muestras tomadas de tejido muscular.



En la tabla I.9 (a y b) aparecen los datos numéricos relativos a la evolución de las distintas poblaciones de microorganismos estudiadas durante el almacenamiento a refrigeración de las tres especies de pescado de agua dulce investigadas.

Tabla I.9a. Evolución de los recuentos (valores medios expresados como log ufc/cm² ó g) de microorganismos mesófilos y psicrotrofos en distintas zonas muestreadas de peces de agua dulce durante su almacenamiento a refrigeración.

Zona de Muestreo	Días de almacenamiento	Especie de pescado			Grupo microbiano
		Trucha común	Trucha arco iris	Lucio	
Piel	3	4.10 ^{a*}	1.41 ^b	1.64 ^b	MESÓFILOS
	6	4.24 ^a	1.47 ^b	2.00 ^b	
	9	4.46 ^a	2.33 ^b	2.51 ^b	
	12	5.70 ^a	† <u>2.98</u> ^b	3.83 ^b	
	15	6.64 ^a	<u>4.08</u> ^b	4.60 ^b	
Abdomen	3	3.54 ^a	1.81 ^b	2.65 ^{ab}	
	6	4.68 ^a	2.43 ^b	2.44 ^b	
	9	5.49 ^a	3.22 ^b	3.52 ^b	
	12	5.86 ^a	<u>3.41</u> ^b	4.34 ^b	
	15	6.62 ^a	<u>4.53</u> ^b	4.99 ^b	
Músculo	3	2.95 ^a	<u>1.06</u> ^b	<u>0.89</u> ^b	
	6	3.68 ^a	1.19 ^b	1.33 ^b	
	9	4.03 ^a	1.94 ^b	2.03 ^b	
	12	5.20 ^a	<u>2.42</u> ^b	2.98 ^b	
	15	5.53 ^a	3.69 ^a	4.07 ^a	
Piel	3	4.85 ^a	2.34 ^b	2.27 ^b	PSICROTROFOS
	6	4.79 ^a	2.52 ^b	2.36 ^b	
	9	5.68 ^a	3.01 ^b	3.20 ^b	
	12	6.29 ^a	<u>4.38</u> ^b	4.36 ^b	
	15	7.27 ^a	<u>5.62</u> ^b	5.38 ^b	
Abdomen	3	4.59 ^a	2.20 ^b	3.14 ^a	
	6	5.22 ^a	2.97 ^b	2.94 ^b	
	9	6.12 ^a	4.25 ^b	3.79 ^b	
	12	6.60 ^a	<u>4.69</u> ^b	4.78 ^b	
	15	7.51 ^a	<u>5.98</u> ^b	5.74 ^b	
Músculo	3	3.01 ^a	<u>2.09</u> ^b	<u>2.16</u> ^b	
	6	3.80 ^a	2.07 ^b	2.15 ^b	
	9	4.88 ^a	2.48 ^b	1.57 ^b	
	12	5.83 ^a	<u>3.69</u> ^b	3.97 ^b	
	15	6.29 ^a	4.82 ^a	4.96 ^a	

*, los recuentos medios que en la misma fila comparten alguna letra (a la derecha) no muestran diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$). †, para una misma especie de pescado, una misma zona de muestreo y un mismo día de almacenamiento, únicamente eran diferentes ($p < 0.05$) los recuentos de microorganismos mesófilos y psicrotrofos en los casos en que los recuentos aparecen subrayados.

Tabla I.9b. Evolución de los recuentos (valores medios expresados como log ufc/cm² ó g) de microorganismos anaerobios en distintas zonas muestreadas de peces de agua dulce durante su almacenamiento a refrigeración.

Zona de Muestreo	Días de almacenamiento	Especie de pescado			Grupo microbiano
		Trucha común	Trucha arco iris	Lucio	
Piel	3	4.23 ^{a*}	2.75 ^b	0.73 ^b	ANAEROBIOS
	6	4.42 ^a	2.00 ^b	1.44 ^b	
	9	5.10 ^a	2.00 ^b	1.74 ^b	
	12	5.61 ^a	2.13 ^b	1.79 ^b	
	15	5.83 ^a	2.30 ^b	2.82 ^b	
Abdomen	3	4.74 ^a	2.26 ^b	1.76 ^{ab}	
	6	4.81 ^a	2.64 ^a	1.70 ^a	
	9	4.83 ^a	2.93 ^b	3.28 ^{ab}	
	12	5.94 ^a	2.84 ^b	2.82 ^b	
	15	6.53 ^a	3.75 ^b	2.73 ^b	
Músculo	3	5.01 ^a	2.18 ^b	1.12 ^{ab}	
	6	3.99 ^a	2.09 ^b	1.87 ^{ab}	
	9	4.88 ^a	2.34 ^b	2.08 ^b	
	12	5.00 ^a	2.32 ^b	2.45 ^b	
	15	6.80 ^a	2.43 ^b	2.58 ^b	

**, los recuentos medios que en la misma fila comparten alguna letra (a la derecha) no muestran diferencias significativas entre sí (p<0.05).*

A continuación se muestran las rectas de regresión obtenidas al comparar los recuentos de flora aerobia mesófila viable y los de flora aerobia psicrotrofa viable (valores medios expresados como log ufc/cm² ó g) tras la captura de los distintos ejemplares de pescado (figura I.17) y durante el almacenamiento a refrigeración de dichos ejemplares (figura I.18). En ambos casos se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos a partir de todas las muestras analizadas.

Figura I.17. Recta de regresión resultante de comparar los recuentos iniciales de flora aerobia mesófila viable (FAMV) y flora aerobia psicrotrofa viable (FAPV), en todas las muestras y tipos de pescado.

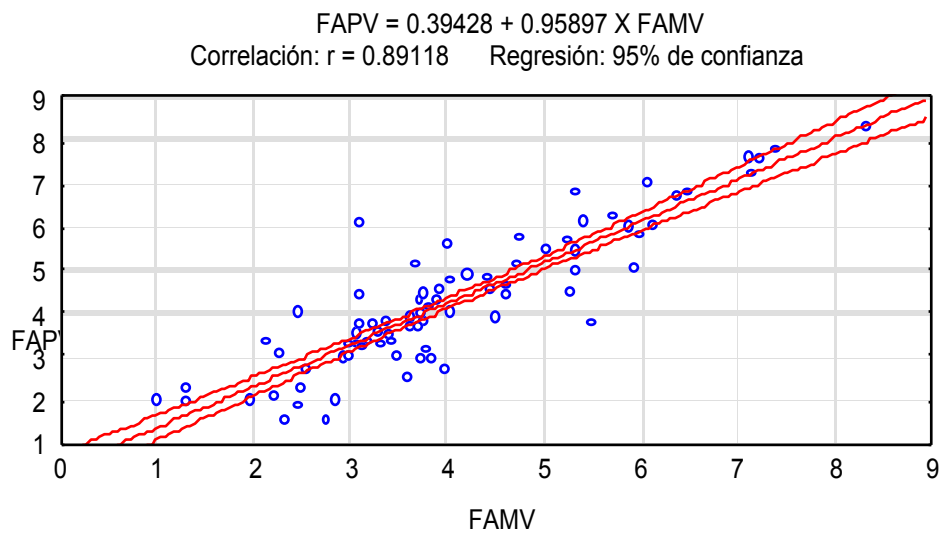
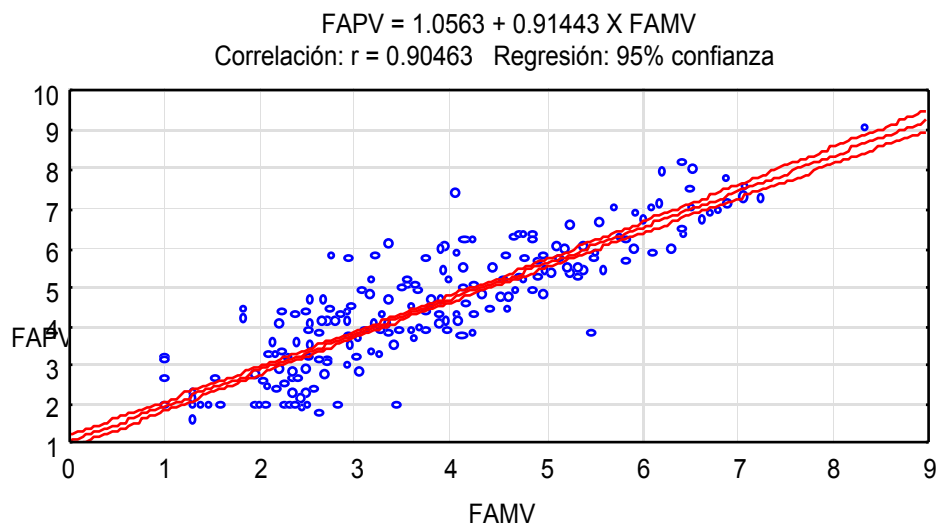


Figura I.18. Recta de regresión resultante de comparar los recuentos de flora aerobia mesófila viable (FAMV) y los correspondientes de flora aerobia psicrotrofa viable (FAPV) obtenidos durante el almacenamiento a refrigeración del pescado y en todas las muestras.



En la tabla I.10 aparecen las fórmulas derivadas de las rectas de regresión obtenidas en nuestro estudio, y los coeficientes de correlación correspondientes a cada una de dichas rectas, resultantes de la comparación de los recuentos obtenidos de flora aerobia mesófila viable y de flora aerobia psicrotrofa viable a lo largo del almacenamiento a refrigeración.

Tabla I.10. Fórmulas y coeficientes de correlación lineal derivados de la comparación de los recuentos de las flora aerobia mesófila y aerobia psicrotrofa a lo largo del almacenamiento.

Muestras consideradas	Fórmula ⁽¹⁾	r ⁽²⁾
Todas las de trucha común	FAP=0.83110 + 0.95216 x FAM	0.9019
Todas las de trucha arco iris	FAP=1.12020 + 0.93937 x FAM	0.8489
Todas las de lucio	FAP=0.89038 + 0.89808 x FAM	0.8916
De piel de todas las especies	FAP=0.87086 + 0.94719 x FAM	0.9155
De cavidad abdominal de todas las especies	FAP=1.17370 + 0.89887 x FAM	0.8540
De músculo de todas las especies	FAP=1.17350 + 0.88309 x FAM	0.9276

⁽¹⁾, FAM, flora aerobia mesófila viable; FAP, flora aerobia psicrotrofa viable. ⁽²⁾ r, coeficiente de correlación lineal correspondiente a cada fórmula.

DISCUSIÓN

El procedimiento de raspado y aclarado utilizado en este trabajo es un método no destructivo de muestreo que permite que los ejemplares analizados puedan ser comercializados sin problema al no sufrir ninguna merma en sus cualidades organolépticas. Además, se trata de un método eficaz en la recuperación de microorganismos.

En las tablas I.2 a I.5, que muestran los recuentos (valores medios y desviaciones típicas) de los microorganismos mesófilos, psicrotrofos y anaerobios, así como de enterobacterias y enterococos, en las muestras tomadas a partir de pescado recién capturado y en aguas de cría, se observa la influencia del diferente manejo de los lotes de trucha común en las que las condiciones de refrigeración se aplicaron unas horas después de su obtención (ver material y métodos), con respecto a los lotes de lucio y trucha arco iris. Así, se aprecian diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los recuentos de los distintos grupos microbianos obtenidos en las diferentes muestras de trucha común y los recuentos obtenidos a partir de las muestras correspondientes de las otras dos especies de pescado.

Los niveles iniciales de mesófilos y psicrotrofos en piel están dentro de los valores indicados por Hobbs (1983) para pescado fresco y de los encontrados por otros autores cuando estudiaron distintas especies de pescado de agua dulce procedentes de zonas templadas. Este es el caso de Acuff y col (1984) en tilapia (*Tilapia aurea*), Gelman y col (1990) en carpa (*Cyprinus carpio*), Horsley (1973) en salmónidos, Huang y Leung (1993) en pez gato (*Ictalurus punctatus*) y Nedohula y Westhoff (1993) en pez de roca (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Sin embargo, se encontraron por debajo de los niveles detectados por Gram y col (1990) en perca del Nilo (*Lates niloticus*). Del mismo modo, estos valores se encuentran dentro de los límites (10^2 - 10^7 ufc/cm²) a los que hace referencia la ICMSF (Liston, 1980a). Se han apreciado diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los recuentos iniciales obtenidos en trucha común y lucio, tanto en las determinaciones de flora mesófila como de flora psicrotrofa, y entre los observados en trucha común y trucha arco iris, en este caso únicamente en los recuentos de flora mesófila.

Por lo que respecta a los recuentos de microorganismos viables aerobios totales obtenidos a partir de las muestras de agallas, comprendidos también dentro de los márgenes fijados por la ICMSF (Anon -1986-, 10^3 - 10^9 ufc/g), son ligeramente superiores a los encontrados por Nedohula y Westhoff (1993) y Trust (1975). En este último caso no detectaron grandes diferencias entre los peces de vida libre (6.10×10^3 ufc/g) y los cultivados (1.47×10^3 ufc/g), aspecto similar al observado por nosotros al comparar los ejemplares de trucha arco iris (cultivada) y los de trucha común (vida libre), si bien nosotros también apreciamos diferencias significativas entre los ejemplares de trucha arco iris y los de lucio en los recuentos de mesófilos ($p < 0.05$) y de psicrotrofos ($p < 0.01$).

En la carga microbiana presente en el tracto intestinal, que también se encuentra dentro de los límites expuestos por la ICMSF (Anon -1986-, 10^3 - 10^9 ufc/g), se aprecia una mayor variabilidad entre las distintas especies estudiadas, apreciándose diferencias significativas entre las de vida libre y la procedente de piscifactorías en los recuentos de

microorganismos mesófilos ($p < 0.01$) y de psicrotrofos ($p < 0.05$). Este fenómeno se puede explicar si tenemos presente el uso de antibióticos en explotaciones acuícolas, que podrían incidir sobre las poblaciones microbianas a este nivel (Austin y Al-Zahrani, 1988). Por el contrario, De Paola y col (1995) no observaron ningún efecto sobre los recuentos de microorganismos totales en intestino de trucha arco iris durante un tratamiento con diversos antibióticos. Trust y Sparrow (1974) detectaron niveles de aerobios en intestino de salmónidos entre 3.4×10^3 a 9.7×10^5 ufc/g, similares a los encontrados por nosotros, pero menores, en su mayoría, a los obtenidos por De Paola y col (1995) en trucha arco iris (1.3×10^7 ufc/g), Nedohula y Westhoff (1993) en pez de roca (4.7×10^9 ufc/g), Sugita y col (1985) en carpa (*Cyprinus carpio*) y tilapia (*Sarotherodon niloticus*, niveles de hasta 10^8 ufc/g) y Trust y col (1979) en carpa (*Ctenopharyngodon idella*, 9.6×10^7 ufc/g) y carpa dorada (*Carassius auratus*, 1.8×10^8 ufc/g). Este hecho nos podría hacer pensar que la carga microbiana presente en el intestino de los peces de agua dulce está relacionada con la especie analizada pero, desde nuestro punto de vista, es más función del ambiente en que se desarrollan. Por ejemplo, los recuentos de microorganismos viables aerobios totales en intestino de trucha arco iris cultivada obtenidos por Trust y col (1979) se encuentran muy por debajo de los detectados en este estudio.

Los valores medios de los recuentos de microorganismos mesófilos y psicrotrofos en muestras de agua dulce no difieren entre sí al comparar los tres orígenes ($p < 0.05$), si bien son ligeramente inferiores a los obtenidos por otros autores, tales como Acuff y col (1984), del orden de 2×10^4 ufc/ml, De Paola (1995), 10^4 ufc/ml y Trust y col (1979), 10^4 ufc/ml, y similares a los encontrados por Horsley (1973), del orden de 10^2 - 10^3 ufc/ml, y sensiblemente superiores a los obtenidos por Huang y Leung (1993), alrededor de 10^2 ufc/ml. La carga microbiana del agua influye decisivamente en la del pescado recién capturado. Sin embargo, la existencia de grandes diferencias entre las distintas especies de pescado en lo que se refiere a los recuentos microbianos iniciales ($p < 0.05$) no se podría explicar teniendo en cuenta únicamente la contaminación microbiana del agua, ya que se aprecia la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los recuentos de las distintas muestras de agua correspondientes a los tres tipos de pescado. Tal y como hemos mencionado con anterioridad, las diferencias a las que acabamos de hacer referencia parecen deberse a otros factores tales como el retraso en la aplicación de bajas temperaturas a los ejemplares de trucha común tras su captura.

En general, se puede decir que los recuentos de flora aerobia psicrotrofa son ligeramente superiores a los de flora mesófila en agallas e intestino (tablas I.2 a I.5), pero sus diferencias no son significativas ($p < 0.05$) en ninguna de las muestras. Los niveles de microorganismos mesófilos y psicrotrofos en agua y superficie externa son muy parecidos entre sí y similares a los encontrados en salmón por Horsley (1973).

En las tablas I.2 a I.5 podemos observar que los valores de las desviaciones típicas en los recuentos de anaerobios, de la mayoría de las muestras, son muy altos, hecho que podría estar relacionado con una gran variabilidad entre los distintos lotes estudiados de cada especie. Asimismo, se aprecia una gran similitud entre los niveles de microorganismos anaerobios en piel de lucio y trucha arco iris, así como en las muestras de agua correspondientes. Por lo que respecta a las muestras de agallas, los niveles de anaerobios

detectados por nosotros en trucha arco iris son similares a los obtenidos por Trust (1975) en salmónidos de vida libre ($1,6 \times 10^3$ ufc/g), y se sitúan, significativamente ($p < 0.05$), por debajo de los encontrados cuando estudiamos los ejemplares de lucio. En las muestras de intestino al comparar las tres especies de pescado se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de trucha común y las dos especies restantes. Los resultados obtenidos en el tracto intestinal coinciden con los encontrados por otros autores en distintas especies de pescado de agua dulce de vida libre (Austin y Al-Zahrani -1988-, Sugita y col -1985-, Trust y Sparrow -1974- y Trust y col -1979-). Por el contrario, Trust y col (1979) no encontraron niveles significativos de este grupo microbiano en trucha arco iris cultivada.

En los niveles de enterobacteriáceas, empleados como indicadores de las condiciones higiénicas del pescado y del agua de cría, se observa que las muestras de piel tomadas a partir de trucha arco iris presentan unos recuentos claramente más bajos que los obtenidos en los otros dos tipos de pescado. Esta diferencia (de hasta tres unidades logarítmicas/cm² ó g) es mucho más evidente entre las muestras de agallas e intestino (hábitat natural de este grupo microbiano) de trucha arco iris y las muestras del mismo origen tomadas de lucio y trucha común ($p < 0.05$). Estas diferencias entre trucha arco iris y las otras dos especies de pescado podrían deberse a la utilización, en explotaciones acuícolas, de compuestos antimicrobianos añadidos al agua de los estanques y de antibióticos presentes en el pienso alimenticio administrado al pescado (Austin y Austin, 1992). La finalidad de unos y otros es la prevención de enfermedades infecciosas que pudieran diezmar las poblaciones. Estos compuestos se podrían encontrar en concentraciones elevadas en los estanques, y en condiciones bajo las que no se encuentran los peces de vida libre. A pesar de que los niveles de enterobacteriáceas en el agua de los estanques de cría de trucha arco iris eran ligeramente más bajos que en las muestras de agua correspondientes a trucha común y lucio, no se apreciaron diferencias significativas entre dichas muestras ($p < 0.05$).

En lo que se refiere al otro grupo de microorganismos empleado como indicadores de contaminación fecal, los enterococos o estreptococos del grupo D de Lancefield, se puede observar, en las tablas I.2 a I.5, que las desviaciones típicas de las medias de los recuentos presentan unos valores muy elevados. Esto es debido, principalmente, a que sólo fue detectada su presencia en un número reducido de muestras. En las muestras intestinales de las especies estudiadas en el presente trabajo encontramos enterococos, únicamente, en el 33% de las muestras analizadas. Trust y Sparrow (1974), por su parte, detectaron enterococos en intestino en el 46% de las muestras de salmónidos estudiadas, hecho que relacionaron con la calidad higiénica del agua. Los niveles son, en general, bastante más bajos que los obtenidos por Huang y Leung (1993) y Leung y col (1992b) en piel, vísceras y agua de pez gato (*Ictalurus punctatus*). En nuestro estudio, los niveles de estreptococos fecales en trucha arco iris son sensiblemente menores a los observados en lucio y, éstos, menores que en trucha común (con la excepción de las muestras de agua asociadas a los ejemplares de lucio). Se puede afirmar que, en general, la calidad higiénica de las especies de pescado de agua dulce analizadas en este trabajo es satisfactoria.

En ninguno de los lotes analizados se detectó la presencia de cepas sospechosas de pertenecer a la especie *L. monocytogenes*. Se podría considerar, en lo que se refiere a esta especie patógena, que las tres especies de pescado analizadas son seguras desde el punto de vista de la salud pública.

En cuanto al género *Salmonella* cabe decir que, únicamente, se aislaron dos cepas a partir de una de las muestras de agua tomadas en los estanques de una de las piscifactorías visitadas. La presencia de estas cepas (idénticas desde el punto de vista bioquímico, serológico -cepas de este mismo serotipo han sido aisladas en pescado por Hatha y Lakhsmanaperumalsamy (1995)- y de resistencia a antibióticos) en el agua, podría ser debida a la existencia de una explotación de especies avícolas cercana a la piscifactoría, animales considerados como reservorios de especies de *Salmonella*. De hecho, del antibiograma realizado se desprende que las cepas de *Salmonella* poseyeron unos índices RMA (resistencia a múltiples antibióticos) tales que, de acuerdo con Hatha y Lakhsmanaperumalsamy (1995), se podrían considerar como procedentes de fuentes de contaminación fecal de alto riesgo como son las granjas comerciales de aves (nuestro caso), núcleos urbanos, granjas de ganado porcino, etc... Además, el hecho de que mostraran resistencia a varios antibióticos supondría un riesgo añadido para la salud pública. A pesar de que algunos autores (Wyatt y col, 1980) relacionan su presencia en agua con su aislamiento en pescado vivo, lo cual pudiera significar un riesgo potencial para la salud pública, su incapacidad de crecer a temperaturas de refrigeración nos hace pensar que, de no existir abusos de temperatura durante el almacenamiento, el tipo de pescado analizado por nosotros es un producto seguro.

La especie *Plesiomonas shigelloides* fue aislada, únicamente, a partir del contenido intestinal de un lote de lucio (Agosto de 1992) y de la muestra de agua obtenida en la zona donde los ejemplares fueron capturados (ría Esla, a la altura de la población de Marne). Una característica peculiar de esta zona es que se encuentra unos kilómetros al sur de varios núcleos urbanos de tamaño mediano que se encuentran muy poblados en verano y que podrían actuar como fuente de contaminación fecal del agua. En este sentido, hay que añadir que esta especie presenta máximos de aislamiento durante los meses cálidos del año (Von Graevenitz y Altwegg, 1991), momento en el que se aislaron ambas cepas. Sugita y col (1993) detectaron *P. shigelloides* en el intestino de distintas especies de pescado de agua dulce, entre las cuales se encontraba la trucha común. Como consecuencia de esto, consideraron al tracto gastrointestinal como reservorio del microorganismo.

El hallazgo de este microorganismo en el transcurso de nuestro estudio es importante si se tiene en cuenta que, por lo que tenemos noticia, es la primera vez que se aísla *P. shigelloides* a partir de pescado de agua dulce en España. Incluso es bastante inusual su aislamiento en zonas templadas del hemisferio norte, siendo más común su presencia en zonas tropicales (Von Graevenitz y Altwegg, 1991).

El serovar O38 de *P. shigelloides*, cuya frecuencia de aislamiento con respecto al total de serovares detectados en diferentes muestras es del 3.4% (Aldova, 1995), ha sido detectado en pacientes que sufrían trastornos diarreicos en la antigua Checoslovaquia (Aldova, comunicación personal). Por su parte, el serovar Schubert O29 ha sido aislado a partir de insectos acuáticos (Aldova, comunicación personal).

En cuanto al impacto que, sobre la salud pública, pudiera tener la presencia de este germen en el intestino de estas especies de pescado se puede aplicar lo expuesto con anterioridad para el caso de *Salmonella*. En primer lugar, su proliferación puede ser controlada eficazmente utilizando bajas temperaturas, aunque recientemente se han descrito cepas de *P. shigelloides* capaces de crecer a temperaturas por debajo de los 8°C (Appleyard y Walker, 1995). En segundo lugar, y siempre que hubiera abusos de temperatura durante el almacenamiento, de manera que se permitiera su multiplicación, un tratamiento térmico apropiado inactivaría, ateniéndonos a su escasa resistencia al calor (Miller y Koburger,

1986), las células de esta especie presentes en el alimento. De todos modos, sería recomendable evitar el riesgo de contaminaciones cruzadas durante el eviscerado y el paso de bacterias contenidas en el intestino al resto de la pieza de pescado comestible.

La sensibilidad de las dos cepas *P. shigelloides* frente a algunos agentes antimicrobianos comúnmente empleados en medicina humana fue similar entre sí, con la excepción de la diferente respuesta frente al sulfametoxazol (tabla I.7). Kain y Kelly (1989) observaron que todas las cepas de esta especie que estudiaron fueron sensibles al trimetoprim y al cloranfenicol, resistentes a la ampicilina y a la ticarcilina y con resultados variables cuando estudiaron la sensibilidad a la tetraciclina y a la gentamicina. Nosotros obtuvimos resultados parecidos al utilizar trimetoprim, cloranfenicol, ampicilina y ticarcilina, pero sin entrar a considerar las concentraciones de antibiótico empleadas. Los patrones de respuesta a distintos antibióticos estudiados por De Paola y col (1995) y Penn y col (1982) son similares, asimismo, a los mostrados en la tabla I.7. Al igual que en las cepas de *Salmonella*, el índice RMA de ambas cepas de *P. shigelloides* indica un origen fecal de alto riesgo que en esta ocasión podría corresponder a la existencia de multitud de núcleos urbanos aguas arriba del lugar de captura del pescado donde el uso de antibióticos podría ser frecuente (Hatha y Lakshmanaperumalsamy, 1995).

El almacenamiento de todos los ejemplares sometidos a estudio se prolongó hasta el día 15 con el fin de observar y estudiar las asociaciones microbianas que participan en la alteración de los lotes eviscerados y no eviscerados de las tres especies de pescado objeto de este trabajo. Esto se realizó con independencia del momento en que se detectaron los primeros signos de alteración.

En la tabla I.8 podemos observar que mediante la evisceración se consigue prolongar, entre 2 y 4 días, la vida útil del pescado (dependiendo de la especie analizada). Esta prolongación de la vida útil se debe, probablemente, a la eliminación de agentes potenciales de alteración como pudieran ser las enzimas digestivas y los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal. Bremner (1991) afirma que el eviscerado es beneficioso si se efectúa correctamente, ya que el intestino constituye un reservorio de enzimas capaces de digerir el tejido muscular circundante, lo cual podría dar lugar a sabores amargos desagradables y coloraciones amarillentas. Del mismo modo, también se eliminan grandes cantidades de bacterias, proteolíticas y lipolíticas, y fluidos, contenidos por algunos órganos, que pudieran colorear la carne. Finalmente, considera que se facilita el proceso de refrigeración al permitir que la llegada de las bajas temperaturas a todos los tejidos sea más rápida. Por su parte, Shewan (1971) opina que la mayor ventaja de eviscerar es la prevención de alteraciones autolíticas más que los problemas derivados de la descomposición bacteriana y advierte del peligro de llevar a cabo evisceraciones inadecuadas, ya que pueden ser más negativos que no eviscerar. Scott y col (1986) observaron que el aumento de la vida útil conseguido en el pescado eviscerado con respecto al pescado entero no tuvo su reflejo o incidencia en los niveles microbianos, pero sí en una disminución de los fenómenos autolíticos. A la vista los datos obtenidos en nuestro trabajo, parece aconsejable la evisceración del pescado de agua dulce antes de su comercialización con el fin de obtener un producto apto para ser conservado durante más tiempo. Además, se evitará la manifestación de algunas de las características organolépticas desagradables anteriormente mencionadas.

En los ejemplares no eviscerados se consideró que el punto final de la vida útil coincidía con la presencia de áreas de lisis en la zona muscular adyacente al peritoneo y con

la percepción de malos olores procedentes de esa misma zona, fenómenos observados anteriormente por Hansen (1973) y Tejada y col (1979) en trucha arco iris. La mayor duración relativa de la vida útil de los ejemplares de lucio no eviscerados pudo deberse al mayor grosor de la pared del tubo digestivo, de modo que la permeabilidad intestinal al paso de las enzimas y de los microorganismos presentes en su interior se vería reducida.

La estimación de la vida útil de la trucha arco iris en este estudio es ligeramente superior a la obtenida por Hansen (1973) y Tejada y col (1979) en esta misma especie y condiciones de almacenamiento, pero inferior a la estimada por Poulter y Nicolaidis (1985) en Bolivia. Tejada y col (1979) observaron la aparición de los primeros signos de alteración a los 8 días de almacenamiento, en los ejemplares no eviscerados, y a los 11 días en los ejemplares eviscerados. Hansen (1973), por su parte, cifraba la vida útil de los ejemplares no eviscerados en 4-7 días, y la de los eviscerados en 6-12 días, mientras que Dawood y col (1986a) estimaron una vida útil de 14 días en los ejemplares de trucha arco iris eviscerada que investigaron, valores cercanos a los obtenidos por nosotros para la misma especie. En los estudios de Poulter y Nicolaidis (1985) sobre trucha capturada en Bolivia y almacenada entera a refrigeración, se estimó, mediante métodos sensoriales, que la vida útil de la misma era de 15 a 21 días (aunque ya detectaban alteraciones en la pared abdominal a los 12 días de iniciarse el almacenamiento), circunscribiéndose este rango a 17-18 días cuando se tenían en cuenta criterios microbiológicos. Estos períodos son claramente superiores a los establecidos en nuestro estudio para el caso de ambos tipos de truchas no evisceradas investigadas, pero hay que puntualizar que en el trabajo al que acabamos de hacer mención se asumía que los criterios para determinar la aptitud para el consumo de pescado en países como Bolivia eran distintos a los criterios observados en las zonas desarrolladas del planeta. En este hecho puede encontrarse, por tanto, la razón por la cual se estimaron unos valores de vida útil tan largos en el trabajo de Poulter y Nicolaidis (1985). La vida útil de otras especies de pescado de agua dulce mantenidas a refrigeración se aproxima bastante a los valores observados en nuestro trabajo. Así, Huang y Leung (1992) estimaron que la vida útil del pez gato eviscerado era de diez días. Acuff y col (1984), estudiando ejemplares de tilapia eviscerados, la establecieron en 12 días. En contraste con nuestros resultados, Gelman y col (1990), determinaron que la carpa no eviscerada almacenada a bajas temperaturas (0-2°C) tenía un período de vida útil superior en tres días a la de los ejemplares eviscerados (que era de 18 días), fenómeno que podría ser consecuencia de un eviscerado deficiente. Poulter y Nicolaidis (1985), por su parte, determinaron que la vida útil de la carpa entera (*Cyprinus carpio*) y del pejerrey (*Basylithys bonariensis*) almacenados a refrigeración era de 17-20 días y 15-21 días, respectivamente. En los ejemplares de pez gato (*Ictalurus punctatus*) estudiados por Manthey y col (1988), su prolongada vida útil se podría deber a que procedían de aguas cálidas. Es sabido que los pescados de origen tropical almacenados a refrigeración presentan una vida útil mayor que los procedentes de zonas templadas y almacenados en las mismas condiciones. Éste, asimismo, podría ser el caso de algunas de las especies de pescado de agua dulce estudiadas por Poulter y Nicolaidis (1985) en Bolivia. Así, el sábalo (*Prochilodus platensis*) y la corvina (*Plagioscion squamosissimus*) mostraron unos períodos de vida útil superiores a los 25 días.

En nuestro trabajo no hemos apreciado una excesiva influencia de la contaminación inicial del pescado (tablas I.2 y I.8) sobre la duración de la vida útil. Charm y col (1972) afirman que el número inicial de microorganismos, aparte de un número crítico mínimo, tiene poca o ninguna influencia en la duración de la vida útil. En este sentido, Huss y col (1974) afirman que los recuentos iniciales de microorganismos viables no sirven para predecir

la vida útil, pero sí reflejan las condiciones higiénicas bajo las cuales se manipula el pescado. Según este mismo autor, la manipulación condiciona la contaminación microbiana de modo que malas condiciones higiénicas multiplican los niveles iniciales de gérmenes por 10 ó por 100, pero un cuidado extremo en la manipulación no proporciona mucha más vida útil.

En cuanto al efecto de la inmediatez en la aplicación de la refrigeración sobre la duración de la vida útil, Ward y Baj (1988) se hacen eco de varios trabajos en los cuales se obtuvieron resultados dispares. Algunos autores postularon que, por cada hora de retraso en la aplicación de la refrigeración, la vida útil se acortaba en un día. Por el contrario, otros autores, trabajando con sardinas, no apreciaron diferencias entre los ejemplares refrigerados inmediatamente y aquéllos cuya refrigeración se había pospuesto hasta cinco, e incluso, doce horas. Barile y col (1985) observaron que la única diferencia que se podía apreciar entre el pescado que era refrigerado entre las cero y las seis horas tras su captura, y aquel refrigerado entre las nueve y doce horas residía en la composición de la flora alterante. Dawood y col (1986b) apreciaron que el mantenimiento del pescado a temperaturas ambientales altas durante períodos de hasta seis horas afectaba a la textura y al aroma del pescado de modo marginal. Asimismo, no mostraba malos olores y se mantenía firme al tacto hasta los 10 días de almacenamiento, período ligeramente inferior al de la vida útil de las truchas refrigeradas inmediatamente o mantenidas a 10°C durante un máximo de 6 horas. Estos mismos autores (Dawood y col, 1986b) consideran que el mantenimiento del pescado a 10 ó 20°C un máximo de 6 horas asegura que el desarrollo de microorganismos alterantes se vea retrasado con respecto a un almacenamiento similar a 30°C. Como puede verse en la tabla I.8 en nuestro trabajo no se han observado grandes diferencias entre la vida útil del pescado refrigerado inmediatamente (trucha arco iris y lucio) y aquél sometido a refrigeración varias horas más tarde (trucha común). En general, Dawood y col (1986b) recomiendan que el periodo entre captura y aplicación de la refrigeración sea el mínimo posible y que el pescado se mantenga durante el almacenamiento a refrigeración a la temperatura más baja posible.

Un aspecto interesante a tener en cuenta, desde el punto de vista tecnológico, es la utilización de hielo picado. Este procedimiento es ampliamente utilizado en la conservación del pescado (Liston, 1980b; Moral Rama y Beltrán, 1989; Poulter y Nicolaidis, 1985). Con él se consigue alargar su vida útil mediante un doble efecto. Por un lado, la temperatura que proporciona al pescado a nivel de la piel es cercana a 0°C, temperatura a la cual la mayor parte de los microorganismos alterantes ven retrasado e, incluso, inhibido su crecimiento. Por otro lado, el agua procedente de la fusión del hielo puede tener la capacidad de lavar y arrastrar a los microorganismos presentes en la superficie del pescado. De todos modos, el uso de hielo no detiene completamente la actividad microbiana (Dawood y col, 1986b). La relación hielo:pescado que se ha utilizado en este trabajo, 3:1, ha mostrado, en estudios previos, su eficacia en la conservación del pescado (Bennour y col 1991). Valores por debajo de 1:1 (1:2) permiten una alteración rápida (León Fajardo y Marth, 1979).

La evolución de las medias de los recuentos de microorganismos aerobios viables (figuras I.2 a I.10) en las muestras tomadas durante el almacenamiento (piel, superficie de la cavidad abdominal y músculo) sigue un patrón similar (muestran paralelismo) en las distintas especies de pescado analizadas. No se aprecian diferencias significativas entre la evolución de los niveles microbianos correspondientes al lucio y a la trucha arco iris ($p < 0.05$) si bien los primeros son ligeramente más altos en las determinaciones de flora mesófila (figuras I.5 a I.7), con la excepción de un muestreo realizado en la cavidad abdominal al comienzo del

almacenamiento (figura I.6). En los recuentos de microorganismos psicrotrofos las curvas de lucio y trucha arco iris son, prácticamente, idénticas (figuras I.8 a I.10). Del mismo modo cabe decir que, en la mayor parte de los casos, sí se aprecian diferencias significativas al comparar los recuentos de estas dos especies a lo largo del almacenamiento a refrigeración con los recuentos correspondientes a trucha común ($p < 0.05$). Este hecho podría estar relacionado con las condiciones en que se mantuvieron los ejemplares de esta última especie tras el período post-captura, las cuales dieron lugar a las diferencias existentes al principio del almacenamiento, y no a las condiciones en que se encontraban los distintos ejemplares antes de su recolección (diferencias entre especies de vida libre y especies cultivadas). Las excepciones más notorias a esta tendencia se dan al final del almacenamiento en las muestras tomadas de tejido muscular, donde no se aprecian diferencias significativas entre las tres especies de pescado ($p < 0.05$), y en el primer muestreo realizado en la superficie de la cavidad abdominal (tabla I.9). En este último caso, las diferencias entre las muestras tomadas en trucha común y lucio y las tomadas en trucha arco iris podrían estar relacionadas con la carga microbiana presente a nivel intestinal tras la captura del pescado (tabla I.4), de las cuales se desprende que el intestino de trucha arco iris presentaba recuentos significativamente más bajos que el intestino de las otras dos especies de pescado ($p < 0.05$). Por lo que se refiere a las muestras de tejido muscular que anteriormente mencionábamos se observa que, mientras en los ejemplares de trucha arco iris y lucio se produce un incremento de cerca de una unidad logarítmica/g entre los días 12 y 15 de almacenamiento, en los ejemplares de trucha común a este mismo nivel se da un incremento mucho menor, de menos de media unidad logarítmica/g. Por todo ello cabría decir que, independientemente de su origen, las especies de pescado de agua dulce muestran unos patrones de evolución microbianos semejantes cuando los ejemplares se manipulan del mismo modo. En otros estudios llevados a cabo con pescado de agua dulce almacenado a refrigeración (Acuff y col, 1984; Tejada y col, 1979) se observa un comportamiento similar al aquí expuesto pero, en aquéllos, se aprecia un fuerte incremento de los niveles microbianos en los últimos estadios del almacenamiento, una vez finalizado el período de vida útil.

Al comparar los recuentos de flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrofa en cada una de las especies estudiadas y en cada una de las muestras (figuras I.2 a I.4) se aprecia paralelismo entre las evoluciones de ambas poblaciones microbianas. Los recuentos de microorganismos psicrotrofos son superiores a los correspondientes de mesófilos, sobre todo después del día 6 del almacenamiento, aumentando la diferencia a medida que avanza el mismo. Esto se puede deber a que los primeros son microorganismos capaces de crecer a las temperaturas a las que se almacenaron todos los ejemplares analizados mientras que, entre los mesófilos, hay cepas que se desarrollan más lentamente a esas mismas temperaturas. Es decir, la diferente capacidad de adaptación de las floras psicrotrofa y mesófila a las temperaturas proporcionadas por el hielo podría explicar la diferente evolución de ambas durante el almacenamiento. Las diferencias que se observaron entre ambas poblaciones fueron cercanas o superiores a una unidad logarítmica/g, pero no fueron significativas en la mayor parte de las ocasiones, y principalmente cuando tuvimos en cuenta la zona de muestreo y las especies de pescado por separado. Únicamente fueron significativas ($p < 0.05$) en las truchas procedentes de piscifactoría en los momentos finales del almacenamiento a refrigeración (tabla I.9), lo cual confirma lo postulado anteriormente acerca de la mejor adaptación de la flora psicrotrofa a las bajas temperaturas. Cuando realizamos el análisis estadístico de estos mismos datos sin tener en cuenta la especie de pescado, sino únicamente

la zona de muestreo y el momento del almacenamiento, se apreciaron diferencias significativas en el primer muestreo y al final de dicho almacenamiento en el tejido muscular. Cuando se analizaron los recuentos en función del momento de muestreo e independientemente de la muestra y de la especie de pescado (se consideraron globalmente) se observaron diferencias significativas entre los recuentos de microorganismos mesófilos y psicrotrofos ($p < 0.05$).

Jay (1987) considera deseable que, para determinar el número de microorganismos psicrotrofos presentes en una muestra, existan métodos que aporten resultados en 24-48 horas. El paralelismo observado entre la evolución de la flora aerobia mesófila y la flora aerobia psicrotrofa nos llevó a pensar que se podrían predecir los niveles de flora aerobia psicrotrofa (la población microbiana responsable de la alteración en pescado almacenado a refrigeración) en cualquier punto del almacenamiento a partir de los recuentos de microorganismos mesófilos. Con este procedimiento se podría acortar el período necesario para obtener resultados en 8 días (10 días -correspondientes a una incubación a 7°C- es el tiempo necesario mínimo para el recuento de microorganismos psicrotrofos en un laboratorio, frente a un máximo de 2 para el de microorganismos mesófilos) y se podría prescindir del uso de un incubador a refrigeración, del cual no disponen todos los laboratorios en los que se llevan a cabo análisis de rutina en alimentos. Teniendo en cuenta los elevados coeficientes de correlación “r” que se muestran en las figuras I.17 y I.18 y en la tabla I.10, superiores a 0.84, se puede afirmar que la flora aerobia psicrotrofa en las distintas muestras tomadas en pescado de agua dulce (especialmente en la piel y del tejido muscular) como en las distintas especies de pescado (principalmente en trucha común y lucio) se puede predecir, con bastante precisión, a partir de la determinación de flora aerobia mesófila. Se puede llevar a cabo empleando las fórmulas de regresión que aparecen en la tabla I.10. Esto también se puede extrapolar a los recuentos microbianos realizados en el pescado recién capturado. Así, se pueden predecir los niveles de microorganismos psicrotrofos a partir de los recuentos de microorganismos mesófilos, con un coeficiente de correlación “r” cercano a 0.9 (figura I.17).

Otro aspecto interesante, descrito previamente por otros autores, es la existencia, en muestras de piel y tras al aplicarse temperaturas de refrigeración, de un período de adaptación o período de latencia en el transcurso de la evolución de los microorganismos presentes, de modo inicial, en el pescado (figuras I.5 y I.8). Shewan (1971) afirma que este período puede ser debido al mucus superficial presente en el pescado recién capturado, al que atribuye propiedades antibióticas, así como que contiene lisozima y anticuerpos. Horsley (1973) también apunta esta posibilidad. Acuff y col (1984) y Poulter y Nicolaidis (1985) observaron, en tilapia almacenada a refrigeración y trucha común, respectivamente, períodos de adaptación de hasta nueve días en los recuentos llevados a cabo en piel, mientras que los que apreciaron Gelman y col (1990), Gram y col (1990) y Huang y Leung (1993) en diversos pescados fueron ligeramente más cortos. En nuestro trabajo, el período de latencia pudo ser visto en las muestras de piel, tanto en los recuentos de mesófilos como en los de psicrotrofos. Además, en los muestreos llevados a cabo al analizar trucha arco iris y lucio se observan, al comparar los recuentos iniciales y en los días 3 y 6 (tabla I.2 y tabla I.9), descensos cercanos a una unidad logarítmica/cm² en los niveles de ambos grupos microbianos. No se ha observado, al contrario que lo apreciado por Ryder y col (1993) en hoki (*Macruronus novaezelandiae*) almacenado en hielo, el establecimiento de una fase logarítmica y fase estacionaria posteriores a la fase de latencia sino, más bien, una evolución lineal.

En los recuentos realizados a partir de muestras de superficie interna de la cavidad abdominal (figuras I.6 y I.9), excepción hecha de las tomadas a partir de lucio, no se observa período de latencia. Este fenómeno podría ser debido a dos causas. Por un lado, a la no existencia del efecto de lavado y arrastre de microorganismos, llevado a cabo por el agua de fusión del hielo empleado en el almacenamiento, que sí se podría aplicar al caso de la piel. Por otro lado, la temperatura a este nivel no es tan baja como en la piel, ya que no existe contacto directo entre el hielo, que proporciona una temperatura de 0°C al fundirse, y la superficie de la cavidad abdominal. Debido a estos hechos, posiblemente los recuentos en las muestras de cavidad abdominal son más altos que en piel durante, prácticamente, todo el almacenamiento a refrigeración (figuras I.2 a I.4).

Por lo que respecta a las muestras tomadas a partir de tejido muscular en trucha común, tampoco se observa período de latencia, lo cual puede estar relacionado con las mismas causas apuntadas en el caso anterior. Algunos autores, como Poulter y Nicolaidis (1985), no sólo no observaron dicho período de latencia, sino que los recuentos microbianos en el tejido muscular a lo largo del almacenamiento a refrigeración fueron considerablemente más altos que a nivel de la piel. El período de latencia “aparente” en los análisis realizados, en muestras de este mismo origen, en trucha arco iris y lucio no es tal, ya que los microorganismos no fueron detectados a niveles apreciables (por encima del límite de detección: 10^1 ufc/g para mesófilos y 10^2 ufc/g para psicrotrofos) hasta los muestreos realizados después del día seis de almacenamiento.

En todos los casos, a partir del día tres de almacenamiento se observa que, tal y como apuntan Huss y col (1974), los recuentos microbianos aumentan en una unidad logarímic/g cada 5 días de almacenamiento. En general, la evolución microbiana no es lineal, lo cual puede explicarse por el descenso de la actividad metabólica de los microorganismos mesófilos, seguido por un predominio gradual de los microorganismos psicrotrofos, tal y como apuntan Dawood y col (1986a).

Cuando los ejemplares de trucha común eviscerados comenzaron a mostrar signos de alteración (día 12) los niveles de flora psicrotrofa en piel y cavidad abdominal (figura I.3) eran del orden de 5×10^6 ufc/cm², por encima del límite de aceptabilidad propuesto por la ICMSF (Anon, 1986) para pescado de cualquier origen (10^6 ufc/cm²). Llegados a este punto, cabe decir que el método empleado en el muestreo en piel y cavidad abdominal, raspado y aclarado, en principio no es tan efectivo como la escisión a la hora de recoger todos los microorganismos presentes en una muestra de superficie, si bien es bastante eficaz. Por lo que respecta a los ejemplares no eviscerados, al final de su vida útil se observaron valores de microorganismos psicrotrofos en piel y músculo cercanos a 10^5 ufc/cm² y 10^4 ufc/g respectivamente, por debajo del límite de aceptabilidad establecido por la ICMSF (Anon, 1986).

En los ejemplares de trucha arco iris al final de su vida útil los recuentos de microorganismos psicrotrofos, tanto en los ejemplares eviscerados (11-12 días) como en los no eviscerados (9 días), también se encuentran por debajo del límite de la ICMSF (Anon, 1986), siendo del orden de 5×10^4 ufc/cm² en los primeros y de 5×10^2 ufc/g en los segundos. En los ejemplares eviscerados estos niveles se encuentran por debajo, incluso, de los obtenidos por Hansen (1973) y Tejada y col (1979) cuando estudiaron esta misma especie. Parece claro que los fenómenos autolíticos tienen un mayor peso que la proliferación microbiana en la alteración de la trucha arco iris no eviscerada almacenada a refrigeración.

El final de la vida útil en los ejemplares de lucio eviscerados (13-14 días) está relacionado con niveles microbianos (tanto mesófilos como psicrotrofos) ligeramante por encima de 10^5 ufc/cm², mientras que a los ejemplares enteros (10 días) les corresponden valores del orden de 10^3 ufc/g.

En trabajos previos, realizados en pescado de agua dulce almacenado a refrigeración, distintos autores obtuvieron resultados muy variables cuando trataron de determinar el número de microorganismos presentes en distintas muestras al final de la vida útil. Así, Poulter y Nicolaidis (1985) detectaron, en trucha común, del orden de 10^7 ufc/g en tejido muscular y 10^4 ufc/cm² en piel; Acuff y col (1984) encontraron, en tilapia, niveles de 3×10^5 ufc/cm² (día 12); Gelman y col (1990), en carpa, hallaron valores, en pescado entero, de 5×10^5 ufc/g (día 18), mientras que en los ejemplares eviscerados estuvieron comprendidos entre 10^3 y 10^4 ufc/g (15 días), y afirmaron que valores entre 10^5 y 10^6 ufc/g son equivalentes a un estadio intermedio entre alterado y aceptable; finalmente, Huang y Leung (1993), en pez gato, detectaron niveles de 10^5 ufc/g al final de la vida útil (día 10).

A la vista de los resultados expuestos parece lógico pensar que, existiendo una gran variabilidad entre cada especie y siendo, muchas veces, función de sus condiciones de manejo, no hay correlación entre el establecimiento de los procesos de alteración (final de la vida útil) y una carga microbiana determinada. Esto podría deberse a que, entre la flora total, se encuentran no sólo los microorganismos responsables de la alteración, sino microorganismos capaces de crecer en las condiciones de almacenamiento pero que no participan en la descomposición del pescado (Bennour y col, 1991). Algunos autores (Gelman y col, 1990) han comprobado la ausencia de relación entre carga microbiana y deterioro de características organolépticas. Por el contrario, otros (Tejada y col, 1979) han encontrado correlación entre el análisis sensorial, encaminado a determinar la alteración, y la contaminación microbiana en todas las etapas del almacenamiento. Poulter y Nicolaidis (1985) afirmaron que la determinación olfatoria y visual de algunas características, además de la utilización de un panel de catadores, era un sistema adecuado para la estimación de la frescura y calidad del pescado siendo, los análisis microbiológicos, de gran valor pero que contaban con el inconveniente del retraso en la obtención de resultados. Observaron, asimismo, que otros parámetros, como el pH y el nitrógeno básico volátil total, no eran adecuados para la estimación de la calidad del pescado. Dawood y col (1986a) recomiendan el análisis sensorial para evaluar la calidad del pescado almacenado a refrigeración. Consideran, asimismo, que los recuentos de microorganismos y la determinación del índice de hipoxantina también son indicadores válidos de calidad del pescado. Nosotros opinamos, en consecuencia, que una carga microbiana presente, en un determinado momento del almacenamiento, en un tipo de pescado y relacionada, por tanto, con un determinado grado de frescura, no necesariamente tiene que significar lo mismo en otro tipo de pescado en ese mismo instante del almacenamiento. De todas maneras, Gram (1992) opina que, aunque los recuentos microbianos rara vez son un buen indicador de la calidad sensorial o vida útil esperada del pescado, se pueden tomar como indicadores generales del estado higiénico del pescado. Por su parte, Ryder y col (1993) afirman que la vigilancia de los niveles bacterianos es útil como un indicador objetivo de alteración del pescado y es obligado por razones sanitarias.

Los patrones de evolución de los recuentos de anaerobios totales en las tres especies de pescado estudiadas (figuras I.11 a I.13) son claramente diferentes. Mientras en trucha

común los niveles en el día tres se encuentran entre 10^4 y 10^5 ufc/cm² ó g, en trucha arco iris se encuentran entre 10^2 y 10^3 ufc/cm² ó g y, en lucio, entre <10 y 10^2 ufc/cm² ó g, siendo estas diferencias significativas ($p<0.05$) entre trucha común y trucha arco iris y, en la mayor parte de los casos, entre trucha común y lucio. Al final de la vida útil de la trucha común, los recuentos están una unidad logarítmica/g ó cm² por encima de los niveles en el día tres (tabla I.9), en cada una las muestras correspondientes; en trucha arco iris se observan ligeros descensos y aumentos en piel y cavidad abdominal, respectivamente, mientras en lucio (las tres muestras) los niveles, por lo general, aumentan. Este comportamiento no se puede explicar desde la perspectiva de una mayor proliferación de este grupo microbiano en aquellas muestras que presentan condiciones de anaerobiosis puesto que, mientras el pescado está fresco apenas se aprecia aumento de sus niveles en muestras musculares (anaerobias tras el sacrificio), aunque sí se aprecian cambios en piel, en trucha y lucio, lugar aeróbico por excelencia.

Por otro lado, se podría razonar, de dos maneras, el hecho de que durante casi todo el almacenamiento los recuentos en cavidad abdominal fueran más altos que los correspondientes a muestras de piel, del mismo modo a como ocurría en los recuentos de microorganismos aerobios. En primer lugar se podría explicar basándonos en que, a nivel de la cavidad abdominal, la tensión de O₂ puede ser más baja que en la piel. Pero parece mucho más sencillo de interpretar si tuviésemos en cuenta que el medio empleado en la realización de este estudio (Agar y Caldo RCM -Oxoid-) pudiera permitir el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos, tales como bacterias acidolácticas (Esquivel, 1995), que pueden ser fácilmente aisladas en las incubaciones llevadas a cabo en condiciones de anaerobiosis. Este último argumento adquiere consistencia al observar, en las figuras I.14 a I.16, que las diferencias (cerca de dos unidades logarítmicas/g ó cm²) entre las medias correspondientes a trucha común, por un lado, y a trucha arco iris y a lucio, por otro, son similares a las obtenidas en la evolución de los recuentos de microorganismos aerobios (figuras I.5 a I.10).

Estos resultados, y las conclusiones que de ellos se derivan, no parecen hacer recomendable el uso del medio RCM (Oxoid) para el recuento de microorganismos anaerobios estrictos y, por tanto, los recuentos obtenidos a partir de su utilización no sirven como parámetros indicadores de la existencia de microorganismos anaerobios patógenos tolerantes al frío.

CAPÍTULO II.:

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Aeromonas* MÓVILES

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el género *Aeromonas* se ha incluido dentro de la familia *Vibrionaceae* (cocobacilos Gram negativos, catalasa y oxidasa positivos, anaerobios facultativos). Colwell y col (1986) propusieron la inclusión de este género en una nueva familia, *Aeromonadaceae*, nombre finalmente aceptado por el "International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*" (1992). La taxonomía dentro del género *Aeromonas* ha variado considerablemente durante los últimos años. En la última edición del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (1984), Popoff divide el género en cuatro especies: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* y *A. salmonicida*, siendo las tres primeras móviles y, la última, inmóvil. Desde la publicación de este Manual se han ido describiendo otras especies de *Aeromonas* en las que se incluyen algunas cepas que previamente fueron identificadas como pertenecientes a las "especies clásicas". Son: *A. media* (Allen y col, 1983a), *A. eucrenophila* (Schubert y Hegazi, 1988), *A. schubertii* (Hickmann-Brenner y col, 1988), *A. veronii* (Hickmann-Brenner y col, 1987), *A. trota* (Carnahan y col, 1991a), *A. jandaei* (Carnahan y col, 1991b), *A. allosaccharophila* (Martínez Murcia y col, 1992b) y *A. encheleia* (Esteve y col, 1995b). En los trabajos llevados a cabo por Abbot y col (1992) se ha puesto de manifiesto la existencia de trece grupos de hibridación (GH). En la tabla II.1 se muestra la correspondencia entre las especies descritas en los últimos años (basadas en criterios fenotípicos) y los GH obtenidos por estudios del genoma bacteriano.

Tabla II.1. Especies de *Aeromonas* descritas.

Especie	Subespecie (biotipo)	Grupo de hibridación ⁽¹⁾
<i>A. hydrophila</i>		1, 2, 3
<i>A. salmonicida</i>	<i>salmonicida</i>	3
	<i>masoucida</i>	3
	<i>achromogenes</i>	3
	<i>smithia</i>	3
<i>A. caviae</i>		4, 5
<i>A. media</i>		5
<i>A. eucrenophila</i>		6
<i>A. sobria</i>		7
<i>A. veronii</i>	<i>sobria</i>	8
<i>A. veronii</i>	<i>veronii</i>	10
<i>A. jandaei</i>		9
<i>A. schubertii</i>		12
<i>A. trota</i>		13
<i>A. allosaccharophila</i>		14
<i>A. encheleia</i> ⁽²⁾		
No adscrito		11

⁽¹⁾ datos de Abbot y col (1992) y Esteve y col (1995c); ⁽²⁾ Esteve y col (1995b).

Si bien los representantes del género *Aeromonas* son considerados como ubícuos (Berrang y col, 1989), el medio acuático es su hábitat primario (Eddy y Carpenter, 1964; Hazen y col, 1978), habiéndose aislado de todo tipo de aguas, dulces o saladas, residuales, aguas corrientes de uso doméstico (Burke y col 1984) e incluso de aguas embotelladas (Slade y col, 1986) y aguas cloradas (Le Chevallier y col, 1982), siendo, además, parte importante de la flora de peces y otros organismos acuáticos (Kaper y col, 1981). Los niveles más altos de *Aeromonas* presentes en el agua se dan en verano, decreciendo sus niveles a medida que la temperatura del agua disminuye (Cavari y col, 1981; Kaper y col, 1981; Pathak y col, 1988; Rippey y Cabelli, 1979; Seidler y col, 1980). También la presencia de *Aeromonas* en heces de pacientes con trastornos gastrointestinales es máxima en esa misma época (Burke y col, 1983a; Eddy y Carpenter, 1964; Gracey y col, 1982a; Poffé y Op de Beek, 1991).

Cepas del género *Aeromonas* se han aislado de alimentos tales como pescado (Boulanger y col, 1977; Fricker y Tompsett, 1989; Gobat y Jemmi, 1993; Knochel y Jeppesen, 1990; Myers y col, 1982; Olivier y col, 1981; Pathak y col, 1988), marisco (Abeyta y col 1986; Altwegg y col, 1991; Hudson y De Lacy, 1991), leche y productos lácteos (Freitas y col, 1993; Hunter y Burge, 1987; Kirov, 1993; Santos, 1994), carne de vacuno y ovino (Majeed y col, 1989; Nishikawa y Kishi 1988), carne de pollo y porcino, verduras y hortalizas (Callister y Agger, 1987; Nishikawa y Kishi 1988). Su presencia en estos alimentos, principalmente en los no relacionados directamente con el hábitat acuático, puede deberse al contacto de los mismos con agua contaminada (Fricker y Tompsett, 1989; Krovacek y col, 1992). Esto se daría en riego de verduras y hortalizas con ese agua o en el del lavado de las canales con agua no suficientemente clorada, si bien también podrían verse contaminados de manera cruzada por contacto con otros alimentos (Knochel y Jeppesen, 1990). En este sentido, varios autores recomiendan la vigilancia de su presencia en aguas, no sólo de bebida, sino en aquéllas asociadas a la acuicultura (Abeyta y col, 1986; Araujo y col, 1991) ya que se ha puesto de manifiesto que sus niveles no van parejos a los de los indicadores clásicos de contaminación fecal (Feuerpiel y col, 1992; Le Chevalier y col, 1982). Otros autores (Eley y col, 1993), por su parte, han propuesto la vigilancia de su presencia en alimentos, principalmente en aquéllos mantenidos a refrigeración, al ser fuentes potenciales de contaminación. La importancia del origen fecal de las *Aeromonas* contaminantes de los alimentos parece escasa teniendo en cuenta el bajo nivel de individuos sanos portadores de *Aeromonas* móviles (Araujo y col, 1991; Gracey y col, 1982a; Nishikawa y Kishi, 1988; Poffé y Op de Beek, 1991).

Por lo que se refiere a la incidencia particular de estos microorganismos en pescado fresco, ésta varía según la zona geográfica, siendo diferentes las especies de *Aeromonas* predominantes en los distintos tipos de pescado, así como según su origen, siendo encontrados con una mayor frecuencia en pescado de agua dulce que en pescado marino (Nishikawa y Kishi, 1988). Asimismo, en la bibliografía aparece reseñado el aislamiento, en pescado, de cepas de este género con propiedades enterotoxigénicas y citotóxicas (Boulanger y col, 1977; Myers y col, 1982).

De modo general, cabe decir que representantes del género *Aeromonas* son responsables de procesos infecciosos, tanto en animales poiquilotermos como en animales homeotermos. Así, son los agentes causales de forunculosis en salmónidos (Austin y Allen

Austin, 1985), así como distintos procesos infecciosos en mamíferos que Von Graevenitz y Altwegg (1991) dividen en varias categorías.

Su interés en Microbiología de los Alimentos se centra en dos aspectos fundamentales: como agente de infecciones alimentarias “sensu lato” (Palumbo y col, 1985) y como grupo microbiano alterante de alimentos como el pescado (Gram, 1991; Knochel, 1990). El género *Aeromonas* ha sido identificado como la causa de gastroenteritis humana en diferentes ocasiones. Así, Altwegg y col (1991) describen el aislamiento de *A. hydrophila* de heces de individuos que habían consumido un cóctel de gambas en el que también se detectó la presencia de ese microorganismo. Por su parte, Abeyta y col (1986) aislaron *A. hydrophila* a partir de ostras implicadas en una intoxicación alimentaria. Las cepas por ellos aisladas fueron clasificadas como enteropatógenas. La presencia en distintos alimentos (crudos o cocinados -Fricker y Tompsett, 1989-) de miembros de este género microbiano poseedores de diversos factores de virulencia (Kirov, 1993; Janda, 1991) y capaces de desarrollar un proceso gastroentérico (Beuchat, 1991), puede suponer un peligro para la salud, tanto para individuos sanos (Altwegg y col, 1991), como para aquéllos pertenecientes a determinados grupos de riesgo, entre los que se encuentran los ancianos, pacientes inmunodeprimidos, pacientes con trastornos hepato biliares y niños de corta edad (Gracey y col, 1982a; Kirov, 1993; Palumbo y col, 1989). Goodwin y col (1983) hacen referencia a que se han aislado *Aeromonas* en individuos enfermos no pertenecientes a estos grupos de riesgo, si bien no eran los únicos microorganismos patógenos aislados. Kirov (1993) considera que la presencia de *Aeromonas* en alimentos supone un peligro potencial para la salud y, en especial, en los individuos inmunodeprimidos. Por otra parte, y para reforzar lo anteriormente expuesto, la presencia de *Aeromonas* en heces está más asociada con diarrea que con el estado de portador, tal y como se ha visto en los estudios de Burke y col (1983a), Ghanen y col (1993) y Gracey y col (1982a).

Dentro de las especies que forman el grupo de las *Aeromonas* móviles, hay algunas que se han visto asociadas, en mayor frecuencia, con la presencia de factores de virulencia. Entre ellas están *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. veronii sobria* (Schubert, 1991). Daily y col (1981), por otra parte, consideran que *A. sobria* tiene una mayor relación que *A. hydrophila* con la infección en humana. Carnahan y col (1991b), Namdari y Bottone (1988a) y Rautelin y col (1995) han asociado a las especies *A. jandaei* y *A. caviae*, respectivamente, con procesos diarreicos humanos. Según Schubert (1991), *A. eucrenophila* y *A. media* nunca han sido aisladas de pacientes con síntomas de gastroenteritis humanas.

El papel de las *Aeromonas* en la alteración de alimentos almacenados a refrigeración se debe, principalmente, a su intensa actividad enzimática (Knochel, 1990), y a su capacidad de multiplicación a bajas temperaturas (Berrang y col, 1989; Beuchat, 1991; Palumbo y col, 1991; Rouf y Rigney, 1971; Walker y Stringer, 1987). Su carácter psicrotrofo es especialmente interesante en alimentos que no van a recibir un tratamiento térmico posterior (Callister y Agger, 1987), puesto que su termorresistencia es baja (Condón y col, 1992). Knochel (1990) ha puesto de manifiesto que las cepas aisladas de muestras clínicas crecen mal a temperaturas de refrigeración, mientras que las aisladas de truchas vivas crecen mal, o no lo hacen, a 37°C. Sin embargo, las cepas de alimentos pueden crecer en las dos condiciones extremas. Asimismo, se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de los factores físicos y químicos que influyen en el comportamiento de la especie tipo de este

género, *A. hydrophila*, y que podrían hacerse extensivas al resto de especies de *Aeromonas*. Bajas concentraciones de CO₂ no inhiben su crecimiento (Golden y col, 1989) lo cual hace posible su proliferación en alimentos envasados en atmósferas modificadas. Su crecimiento también se ve favorecido, indirectamente, por bajas concentraciones de O₂, al crecer más lentamente la flora alterante comúnmente presente en aquellos alimentos donde se aíslan *Aeromonas*, como miembros del género *Pseudomonas* (Berrang y col 1989). Por otra parte, hay una serie de agentes presentes en los alimentos que, por separado o combinados, son capaces de inhibir el desarrollo de *Aeromonas*: cloruro sódico, sorbato potásico, ácido ascórbico, nitrito sódico y humo líquido (Gram, 1991; Knochel, 1990; Palumbo y col, 1991; Stecchini y col, 1993). Los valores de actividad de agua en los cuales son capaces de crecer son similares a los de otras bacterias Gram negativas alterantes presentes en los alimentos (Santos, 1994). Por otra parte, en alimentos ligeramente salados *A. hydrophila* compete eficazmente con la especie *Pseudomonas fragi*, si bien en alimentos salados y refrigerados, esta última especie se encuentra condiciones más ventajosas que *A. hydrophila* (Ingham y Potter, 1988; Kirov y col, 1990). El pescado fresco mantenido a temperaturas de refrigeración constituye un entorno ideal para la proliferación de *Aeromonas*, a pesar de no verse frenado el crecimiento de los grupos microbianos competidores que intervienen en su alteración.

El objetivo principal del trabajo comprendido en este capítulo ha sido el estudio de la presencia e incidencia de microorganismos del género *Aeromonas* en distintas especies de pescado de agua dulce, así como la evolución de sus niveles durante su almacenamiento a refrigeración, en hielo picado, hasta el establecimiento de los primeros síntomas de alteración. También se ha pretendido identificar, a nivel de especie, las cepas aisladas en los distintos muestreos utilizando un esquema simple basado en pruebas fenotípicas. Como objetivo final, y previo al estudio de los factores de virulencia asociados al género *Aeromonas* (que serán objeto de estudio en el capítulo III), las cepas se sometieron a un proceso de caracterización bioquímica y fisiológica en un intento de estudiar "in vitro" sus potencialidades como microorganismos alterantes y como posibles agentes de intoxicaciones alimentarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras.

La investigación de *Aeromonas* se llevó a cabo en las muestras de trucha común, trucha arco iris y lucio: en los ejemplares recién capturados (piel, agallas e intestino), en los almacenados a refrigeración (piel y superficie de la cavidad abdominal -eviscerados- y piel y tejido muscular -no eviscerados-), así como en las muestras de agua del mismo origen que el pescado (véase capítulo I).

Recuento y aislamiento de *Aeromonas*.

Para el recuento y aislamiento de miembros de este grupo microbiano, se procedió a la siembra directa de 0.1 ml de las distintas diluciones de las muestras de pescado y agua en la superficie del medio Agar Almidón Ampicilina (Starch Ampicillin Agar -SA-, Palumbo y col -1985-). Las placas se incubaron invertidas a 30°C durante 24 horas. A continuación, se procedió al recuento de colonias características: amarillas, de 2 a 3 mm de diámetro y que hidrolizaban el almidón. Esta última característica se apreciaba tras inundar las placas con solución de lugol de media fuerza. Finalmente, con el fin de someterlas a las pruebas de identificación, se recogieron un máximo de tres colonias características por placa, que fueron subcultivadas en Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid), en las cepas aisladas de trucha común, o en Caldo Nutritivo (NB, Oxoid), en el resto de las cepas, y purificadas en Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid). Las cepas puras se almacenaron a refrigeración en Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid) inclinado y a -70°C en glicerol al 40%.

Identificación de las cepas.

Se realizó siguiendo los esquemas de Popoff (1984), Abbot y col (1992) y Hänninen (1994).

Para la identificación a nivel de género se realizaron las siguientes pruebas:

1. Tinción por el método de Gram. Siguiendo la metodología descrita en Harrigan y McCance (1976), se examinó la coloración rosada (negativa) o azul púrpura (positiva) de las células bacterianas.
2. Actividad citocromo-c-oxidasa, descrita con detalle en el capítulo I (prueba de la oxidasa).
3. Actividad catalasa. A un cultivo de 24 h en Agar Triptona de Soja (Oxoid) se le añadieron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3%, manifestándose la actividad enzimática por la aparición inmediata de burbujas (Cowan, 1974).
4. Oxidación-Fermentación de la glucosa. Utilizando como medio base el medio OF de Hugh y Leifson (Difco), al que se le adicionaba glucosa (Sigma) al 1%, se sembraron, en

picadura, dos tubos por cepa, a uno de los cuales se le añadía un tapón de parafina estéril de 10 mm de altura con el fin de obtener condiciones anaerobias. Se incubaron a 30°C y se procedió a su lectura a las 24 h (Cowan, 1974). Aquellas cepas que crecían en el medio y provocaban un viraje en el indicador hacia el color amarillo en ambos tubos fueron calificadas como anaerobias facultativas.

5. Movilidad. Se empleó el medio de movilidad GI (Difco), sembrando en picadura a partir de colonias presentes en la superficie de un medio sólido e incubando los tubos a 30°C durante 24 h (Cowan, 1974). Fueron consideradas como positivas aquellas cepas en las que el crecimiento se extendía alrededor de la zona de picadura (a modo de enturbiamiento del medio).
6. Licuefacción de la gelatina. Para la realización de esta prueba se usaron tubos de gelatina nutritiva (Difco) incubados a 37°C durante 48 horas. Antes de su lectura fueron mantenidos a 4°C por un corto espacio de tiempo con el fin de solidificar la gelatina no hidrolizada. Tras este periodo, se observaba si la gelatina permanecía en estado líquido; si así era, las cepas habían sido capaces de licuar la gelatina (Cowan, 1974).
7. Hidrólisis del ADN. Siembra en la superficie del medio Agar DNAsa (Oxoid) de un asa de un cultivo de 24 horas e incubación a 30°C durante 24 h. Para observar los halos de hidrólisis se inundaron las placas con HCl al 25%, que precipitaba el ADN no hidrolizado (Cowan, 1974).
8. Tolerancia al NaCl. Para ello se utilizó Caldo Nutritivo (Oxoid) al que se le añadió NaCl (Panreac) hasta alcanzar una concentración final del 6% (p/v). La incubación se realizó a 30°C, efectuándose las lecturas a las 24 y 48 h. Si los tubos mostraban turbidez al llevar a cabo las lecturas, eran considerados como positivos (Prieto y col, 1992a).
9. Resistencia al agente vibriostático O-129. En la superficie de una placa de Agar Mueller-Hinton (Oxoid) se extendió un asa de un cultivo líquido de 24 h. A continuación, se colocó un disco de O-129 de 150µg (Oxoid) y se incubó 24h a 30°C. Aquellas cepas que mostraron un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco eran sensibles a dicho compuesto (Cowan, 1974).
10. Producción de ácido a partir de meso-inositol. Al medio base Caldo Púrpura (Difco) se le añadió una solución, esterilizada por filtración, de meso-inositol (Sigma), hasta una concentración final del 1% (p/v). Tras la inoculación de un asa de cultivo, a partir de una suspensión en solución salina al 0.85% (p/v) de una colonia problema, se incubó a 30°C, realizando lecturas a las 12, 24 y 48 h. Las cepas capaces de producir ácido a partir del meso-inositol viraban el color del indicador hacia amarillo (Harrigan y McCance, 1976).

Las cepas Gram negativas, oxidasa y catalasa positivas, anaerobias facultativas, móviles, que hidrolizaban la gelatina y el ADN, que no eran capaces de crecer a una concentración del 6% de NaCl ni producían ácido a partir de inositol y que eran resistentes al agente vibriostático O-129, se consideraron pertenecientes al género *Aeromonas*.

Para la identificación a nivel de especie se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

1. Hidrólisis de la esculina. Siembra en la superficie de un medio sólido al que se le adicionó esculina (Sigma) al 0,1% y cloruro férrico (Merck) al 0,05%, siguiendo las indicaciones del manual de Cowan (1974). La reacción positiva se manifestaba, tras 24 horas de incubación a 30°C, por la aparición de un halo de ennegrecimiento alrededor de la zona de crecimiento.
2. Producción de gas a partir de la D-glucosa. Se utilizó Caldo Nutritivo (Oxoid), al que se le incorporó D-glucosa (Sigma) al 0.5%, distribuido en tubos de ensayo que contenían campanas de Durham invertidas, donde se acumulaba el gas producido, tras la incubación a 30°C/24h. La aparición de burbujas de gas en el interior de las campanas era registrado como reacción positiva (Cowan, 1974).
3. Producción de H₂S a partir de L-cisteína. Se inocularon tubos de Caldo Nutritivo (Oxoid) suplementados con L-cisteína (Sigma) al 0.01% que se incubaron a 30°C durante 24 horas, visualizándose la producción de H₂S por la aparición de ennegrecimiento en las tiras de papel saturadas de acetato de plomo (Difco) y colocadas en la parte superior del tubo (Cowan, 1974).
4. Producción de indol a partir de triptófano. Se sembraron tubos del medio *A. hydrophila* (AH -Kaper y col, 1979-), incubándolos 72 h a 30°C. La presencia de indol se manifestaba por la aparición de un color rojo teja en la superficie del medio, tras la adición de unas gotas del reactivo de Kovac (Cowan, 1974).
5. Test del rojo de metilo. Después de inocular e incubar a 30°C durante 5 días tubos que contenían 5 ml de Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP, Oxoid) se añadían unas gotas de solución alcohólica de rojo de metilo (Cowan, 1974). Los tubos en los que se mantenía un disco de color rojo en la superficie del cultivo fueron considerados positivos.
6. Producción de acetoína a partir de la glucosa o prueba de Voges-Proskauer. Tras la lectura de la prueba del rojo de metilo, los tubos se alcalinizaban con 0,2 ml de una solución acuosa al 4% de KOH (Panreac) y se revelaban adicionando 0,6 ml de una solución de -naftol (Sigma) al 5% en etanol absoluto (Panreac). Los tubos en los que se desarrollaba un color rojizo antes de 60 minutos se consideraron positivos (Cowan, 1974).
7. Descarboxilación de L-lisina y L-ornitina e hidrólisis de la L-arginina. Se utilizó el Caldo Base de Moeller (Difco), suplementado con el aminoácido correspondiente al 1%. Tras la inoculación (del mismo modo que en la producción de ácido a partir de meso-inositol), los tubos se incubaron a 30°C, en condiciones anaerobias, realizándose lecturas a las 12, 24 y 48 horas. Durante la realización de la prueba, y como controles, se inocularon e incubaron, en las mismas condiciones, tubos con el medio base al que no se le adicionaba aminoácido alguno (Cowan, 1974). La aparición de color púrpura era registrado como resultado positivo.

8. Producción de ácido a partir de distintos azúcares. Soluciones de D-manitol, salicina, L-arabinosa, sacarosa y D-sorbitol, esterilizadas por filtración, eran añadidas, hasta una concentración del 1%, al Caldo Púrpura (Difco). Tras la inoculación de las cepas (del mismo modo que en la producción de ácido a partir de meso-inositol) e incubación a 30°C, se realizaron lecturas periódicas a las 12, 24 y 48 horas. La interpretación de los resultados se llevó a cabo siguiendo los criterios empleados en lo referente a la producción de ácido a partir de meso-inositol (Harrigan y McCance, 1976).
9. Crecimiento en presencia de ácido urocánico. Siguiendo la metodología empleada por Hänninen (1994) se utilizó un medio base que no contenía agar, y al que se le añadió una solución de ácido urocánico (Sigma) a una concentración final de 2 g/l. Tras la inoculación e incubación a 30°C durante 48 horas (del mismo modo que en la producción de ácido a partir de meso-inositol), la presencia de turbidez y la aparición de un color azul brillante indicaba que las cepas eran capaces de crecer en presencia de ácido urocánico.
10. Fenómeno suicida. Se inocularon tubos de Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid), cuyo contenido en glucosa es del 0.5%, incubándolos a 30°C. A las 24 se sembraba un asa de cultivo en la superficie de Agar Nutritivo (NB, Oxoid). Se consideraban cepas suicidas aquéllas que no eran capaces de crecer en el medio sólido tras 48 horas de incubación a 30°C (Namdari y Cabelli, 1989).

Actividades proteolítica y lipolítica de las cepas:

El estudio de la aptitud proteolítica y lipolítica de las cepas identificadas como *Aeromonas* se llevó a cabo utilizando como substrato los siguientes compuestos:

1. Elastina. Para llevarlo a cabo, se empleó el medio descrito por Williams y col (1988) sembrando las cepas problema en la superficie del mismo, e incubando 48 horas a 30°C. La aparición de halos de aclaramiento alrededor de la colonia, tras inundar la placa con ácido tricloroacético (Panreac) al 35%, era debida a la hidrólisis de la elastina.
2. Caseína. El medio empleado para el estudio de la acción proteolítica de las *Aeromonas* sobre la caseína es el resultado de la mezcla, a partes iguales, de Agar Nutritivo (Oxoid) a doble concentración y leche descremada (Oxoid) al 10%, esterilizada a 0.75 atmósferas de sobrepresión durante 10 minutos. La incubación se llevó a cabo a 30°C, realizándose una lectura a las 24 horas y otra a las 48 horas, para aquellas cepas que no manifestaron actividad proteolítica a las 24 horas. La hidrólisis de la caseína se manifestaba por la presencia de un halo de aclaramiento alrededor de la zona de crecimiento (Cowan, 1974).
3. Tween 80. Se sembraron placas del Medio de Sierra (Cowan, 1974). Tras 24 horas de incubación a 30°C, aquellas cepas que presentaban áreas de precipitación a su alrededor fueron consideradas como positivas (Cowan, 1974).
4. Tributirina. Las cepas problema se sembraron en la superficie de placas de Agar Tributirina (Oxoid) y se incubaron 24 horas a 30°C. La aparición de un área de aclaramiento alrededor de la zona de inoculación del microorganismo es interpretada como actividad lipolítica (Gray y Stewart, 1980).

5. Yema de huevo. Con este sustrato se pretendían estudiar las actividades fosfolipasa (acción sobre la lecitina) y proteolítica (también conocida como actividad "yema de huevo") que corresponden, respectivamente, a la aparición, alrededor de la zona de crecimiento y tras incubar 48 horas a 30°C, de una zona de precipitación y una zona de aclaramiento. Con este fin se utilizó un medio sólido (Agar Nutritivo -Oxoid-) al que, una vez esterilizado y atemperado, se le añadía Yema de Huevo (Oxoid) a una concentración final del 10% (v/v).

Propiedades fenotípicas relacionadas con la virulencia: también se estudió la posesión, por parte de las cepas, de algunas propiedades relacionadas con la virulencia, tales como la capacidad de crecer a 37°C en Caldo Nutritivo (Oxoid) y la actividad -hemolítica. Esta última se realizó en placas de Agar Base Columbia (Oxoid) suplementado con sangre de oveja (Oxoid) al 5%, siendo positivas aquellas cepas que presentaban un halo de aclaramiento alrededor de la zona de siembra como resultado de la lisis total de los eritrocitos presentes en el medio (Santos, 1994). Otras pruebas relacionadas con virulencia (prueba del Voges Proskauer y descarboxilación de la L-lisina) han sido descritas con anterioridad.

RESULTADOS

En la tabla II.2 se pueden apreciar las medias y las desviaciones típicas de los recuentos iniciales de presuntas *Aeromonas* en las muestras tomadas de las tres especies de pescado estudiadas, así como del agua de sus respectivos lugares de procedencia. Los recuentos en piel de trucha arco iris estuvieron, en todos los ejemplares muestreados, por debajo del límite de detección que, en dichos análisis, fue de 2.3 log ufc/cm².

Tabla II.2. Recuentos iniciales de presuntas *Aeromonas*.

Muestras	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
Piel	^a 2.53±0.63 ⁽¹⁾	^a <2.30	^a 1.94±0.64
Agallas	^a 3.30±0.77 ⁽²⁾	^b 2.50±0.86	^a 3.95±0.64
Intestino	^a 5.19±0.95 ⁽²⁾	^b 2.72±1.19	^a 5.07±0.98
Agua	^a 2.24±0.44 ⁽³⁾	^a 1.77±0.69	^a 2.37±0.50

⁽¹⁾ log ufc/cm²; ⁽²⁾ log ufc/g; ⁽³⁾ log ufc/ml. ^{a,b}, resultados en la misma fila con distinta letra indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$).

En las figuras II.1, II.2 y II.3 se muestra la evolución de los recuentos medios de presuntas *Aeromonas* (colonias características en SA) en las distintas muestras estudiadas (piel, superficie interna de la cavidad abdominal y músculo) a lo largo del almacenamiento a refrigeración de trucha común (figura II.1), trucha arco iris (figura II.2) y lucio (figura II.3). Los resultados se expresan como log ufc/cm² (superficies) ó g (masa muscular). El límite mínimo de detección (l.m.d.) fue, para las muestras tomadas de trucha común y trucha arco iris, de 2.3 log ufc/cm², en piel y cavidad abdominal, y de 2.0 log ufc/g en las muestras de músculo. En las muestras de piel y superficie de la cavidad abdominal tomadas de lucio, al sembrarse directamente del agua de aclarado (sin diluir), este umbral mínimo se redujo hasta 1.3 log ufc/cm². En las muestras tomadas de los ejemplares de lucio, los niveles de presuntas *Aeromonas* se situaron por debajo del límite de detección de la técnica en piel (hasta el día 12) y en músculo (todas las muestras).

Figura II.1. Evolución de los recuentos de presuntas Aeromonas en muestras de trucha común.

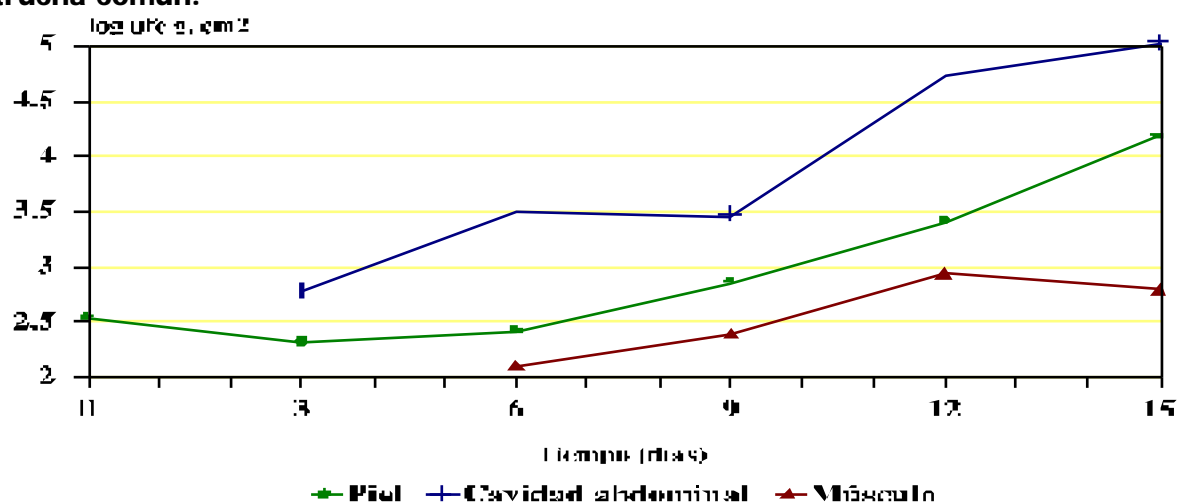


Figura II.2. Evolución de los recuentos de presuntas Aeromonas en trucha arco iris.

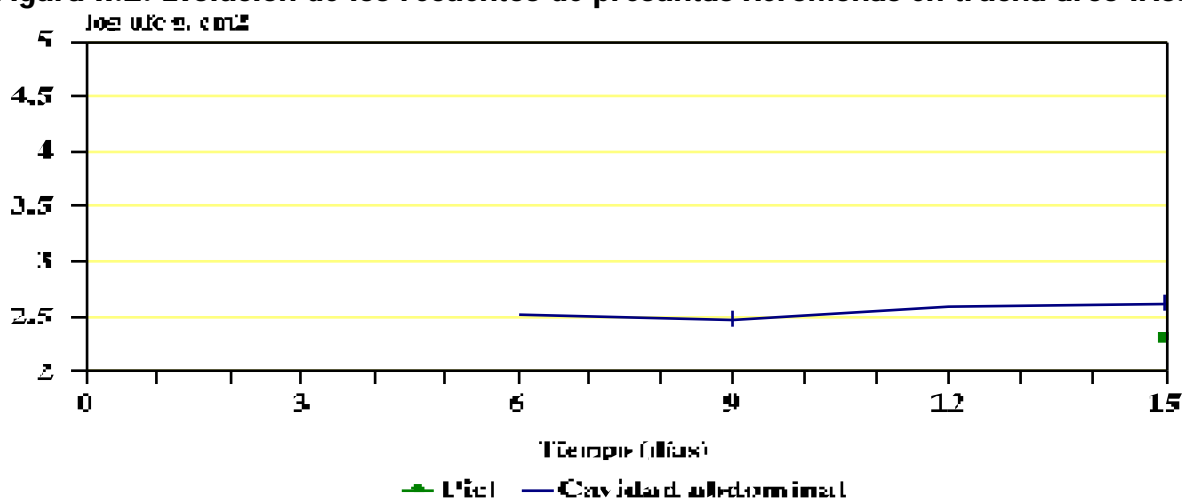
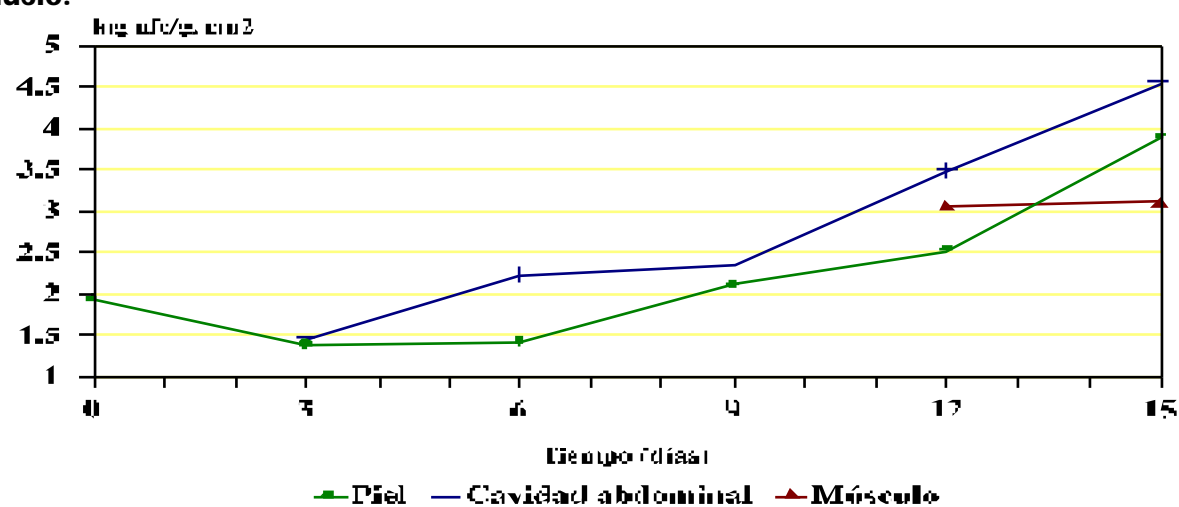


Figura II.3. Evolución de los recuentos de presuntas Aeromonas en muestras de lucio.



De los distintos lotes de pescado se aislaron un total de 243 cepas de presuntas *Aeromonas*, de las cuales 171 se identificaron como *Aeromonas* móviles. El número de cepas aisladas de cada especie de pescado, el de cepas confirmadas, así como los porcentajes de cepas confirmadas con respecto al número total de cepas aisladas como presuntas *Aeromonas*, se detallan en la tabla II.3.

Tabla II.3. Número de cepas de *Aeromonas* aisladas en cada especie de pescado.

	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio	Total
<i>Aeromonas</i> confirmadas/presuntas	68/73	34/84	69/86	171/243
<i>Aeromonas</i> aisladas				
Porcentaje	94%	40%	80%	70%

La utilización del esquema de Abbot y col (1992) nos permitió identificar 151 cepas de *Aeromonas* a nivel de especie (88% del total de *Aeromonas* móviles confirmadas). En la figura II.4 se presenta la distribución porcentual de las distintas especies a que se adscribieron las cepas de *Aeromonas*. La distribución de las especies en función del origen (especie de pescado) se presenta en las figuras II.5 a II.7.

Figura II.4. Distribución porcentual y número de cepas de las especies de *Aeromonas* aisladas en este trabajo.

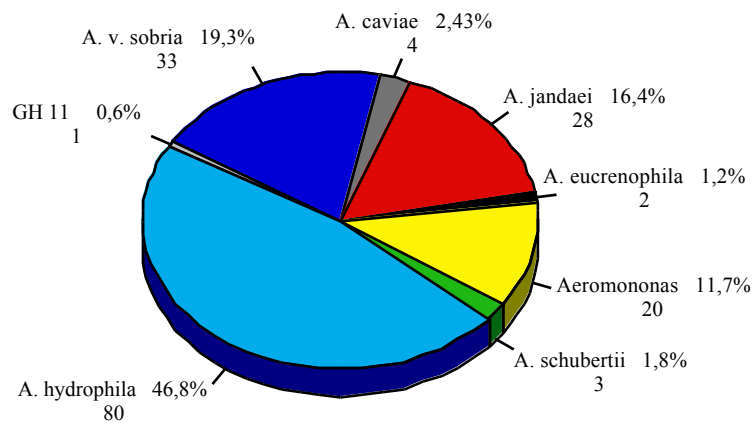


Figura II.5. Distribución porcentual y número de cepas de las especies de *Aeromonas* aisladas en trucha común.

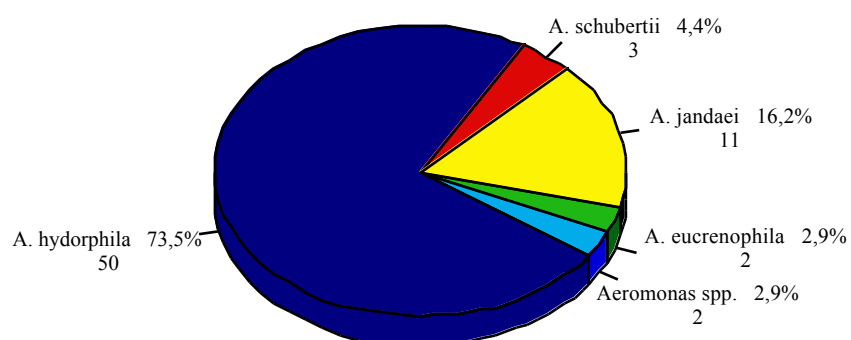


Figura II.6. Distribución porcentual y número de cepas de las especies de *Aeromonas* aisladas en trucha arco iris.

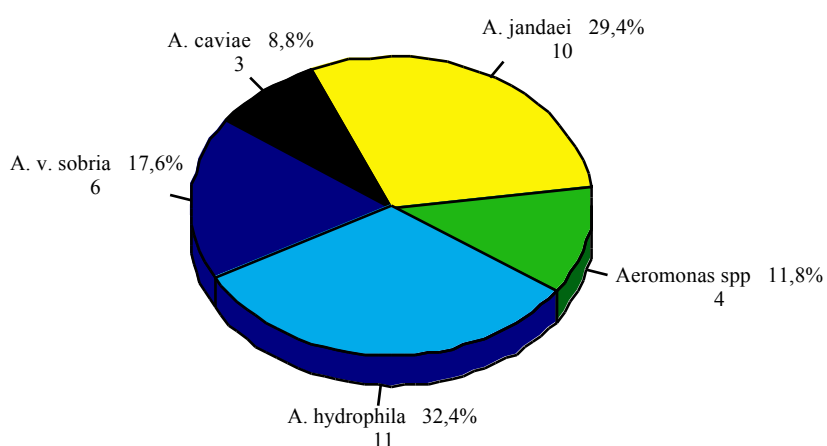
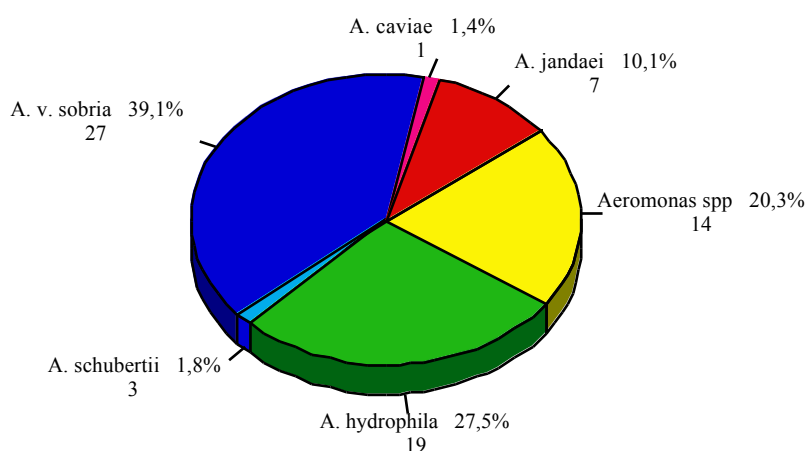


Figura II.7. Distribución porcentual y número de cepas de las especies de *Aeromonas* aisladas en lucio.



Las distintas especies de *Aeromonas*, así como los grupos de hibridación a los que se adscribieron, se distribuyeron en función de la especie de pescado tal y como se presenta en la tabla II.4. Por lo que respecta a la subdivisión del grupo *A. hydrophila* en los grupos de hibridación, ésta se realizó teniendo en cuenta que las cepas pertenecientes al GH 3 eran las únicas capaces de producir ácido a partir de sorbitol, y que solamente las cepas del grupo 1 no crecían en el medio que contenía ácido urocánico.

Tabla II.4. Distribución de las especies de *Aeromonas* y sus grupos de hibridación en función de su origen.

Especie	Grupo hibridación	Especie de pescado		
		Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
<i>A. hydrophila</i>	1	7 ⁽¹⁾	2	17
<i>A. hydrophila</i>	2	23	5	2
<i>A. hydrophila</i>	3	20	4	
<i>A. eucrenophila</i>	6	2		
<i>A. caviae</i>	4, 5a		3	1
<i>A. jandaei</i>	9	11	10	7
<i>A. veronii sobria</i>	8		6	27
No adscrita	11			1
<i>A. schubertii</i>	12	3		
<i>Aeromonas</i> spp		2	4	14

⁽¹⁾ número de cepas.

En la tablas II.5, II.6 y II.7 se muestra la distribución de las especies de *Aeromonas* identificadas entre las muestras y para cada tipo de pescado.

Tabla II.5. Distribución de especies de *Aeromonas* en las muestras de trucha común.

Especie	Muestras de pescado					
	Agua	Piel	Agallas	Intestino	Cavidad abdominal	Músculo
<i>A. hydrophila</i>	6 ⁽¹⁾	10	4	9	11	10
<i>A. eucrenophila</i>	1			1		
<i>A. jandaei</i>	2	3		3	3	
<i>A. schubertii</i>	1	2				
<i>Aeromonas</i> spp	1	1				

⁽¹⁾ número de cepas.

Tabla II.6. Distribución de especies de *Aeromonas* en las muestras de trucha arco iris.

Especie	Muestras de pescado					
	Agua	Piel	Agallas	Intestino	Cavidad abdominal	Músculo
<i>A. hydrophila</i>	8 ⁽¹⁾	1	1		1	
<i>A. caviae</i>	3					
<i>A. jandaei</i>	2	1	4	3		
<i>A. veronii sobria</i>			2	3	1	
<i>Aeromonas</i> spp	4					

⁽¹⁾ número de cepas.

Tabla II.7. Distribución de especies de *Aeromonas* por cada tipo de muestra en lucio.

Especie	Muestras de pescado					
	Agua	Piel	Agallas	Intestino	Cavidad abdominal	Músculo
<i>A. hydrophila</i>	1 ⁽¹⁾	5	1	2	9	1
<i>A. caviae</i>						1
<i>A. jandaei</i>		2		1	4	
<i>A. veronii sobria</i>	2	6	3	2	9	5
GH 11		1				
<i>Aeromonas</i> spp		4	2	1	5	2

⁽¹⁾ número de cepas.

En la tabla II.8, se muestra la evolución de las distintas especies de *Aeromonas* a lo largo del almacenamiento a refrigeración en las muestras de piel, superficie de la cavidad abdominal y tejido muscular obtenidas en los lotes de lucio.

Tabla II.8. Evolución de las especies de *Aeromonas* en las muestras de lucio a lo largo del almacenamiento a refrigeración.

Especie	Muestra	Días de almacenamiento					
		0	3	6	9	12	15
<i>A. hydrophila</i>	Piel			1 ⁽¹⁾	3	1	
	Cav. abdominal		1	1	1	2	4
	Músculo						1
<i>A. jandaei</i>	Piel	1		1			
	Cav. abdominal		1	1	2		
	Músculo						
<i>A. veronii sobria</i>	Piel	1	1			2	2
	Cav. abdominal		4	2	1	2	
	Músculo					3	2
GH 11	Piel				1		
	Cav. abdominal						
	Músculo						
<i>A. caviae</i>	Piel						
	Cav. abdominal						
	Músculo					1	
<i>Aeromonas</i> spp.	Piel	2	1				1
	Cav. abdominal			1	2	1	1
	Músculo						2

⁽¹⁾ número de cepas.

Los patrones bioquímicos (correspondientes a las pruebas de mayor valor taxonómico) de las cepas de *Aeromonas* adscritas a especie se presentan en la tabla II.9. Dentro del grupo de cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie es interesante reseñar que aquéllas aisladas en los lotes de trucha común (dos cepas) y de lucio (14 cepas) poseen unas características bastante similares al patrón mostrado por *A. schubertii* que se puede ver en la tabla II.9, con la excepción de la producción de gas a partir de glucosa y producción de indol (características típicas de dicha especie), siendo todas las cepas positivas para estas dos pruebas. Por lo que respecta a las cuatro cepas aisladas de trucha arco iris, clasificadas únicamente a nivel de género, no se adscribieron a especie al producir un ligero viraje del color del indicador al estudiar la producción de ácido a partir de meso-inositol, si bien presentaron características muy similares a *A. veronii sobria*.

Tabla II.9. Perfiles bioquímicos de las distintas especies de *Aeromonas* aisladas.

	Especie ‡						
	AH	AE	AC	AJ	AVS	ND	ASch
Grupo de hibridación	1,2 y 3	6	4, 5a	9	8	11	12
Número de cepas	(80)	(2)	(4)	(28)	(33)	(1)	(3)
Hidrólisis de la esculina	100*	100	100	0	0	0	0
Gas de glucosa	100	100	0	65	78	0	0
Producción de H ₂ S	100	100	0	100	100	100	100
Voges-Proskauer	97	0	50	93	93	0	100
Rojo de Metilo	35	100	50	72	75	0	100
Ácido a partir de:							
- D-manitol	100	100	100	100	100	100	0
- Salicina	90	100	50	0	18	0	100
- L-arabinosa	75	100	50	18	21	0	0
- Sacarosa	NR ⁺	NR	NR	0	100	NR	NR
Descarboxilación de:							
L-Lisina	100	0	25	25	72	0	0
L-Ornitina	0	0	0	0	0	100	0
Hidrólisis de L-Arginina	100	100	100	100	100	0	100
Producción de indol	70	100	50	54	50	0	0
Fenómeno suicida	0	0	50	0	0	0	0

‡, AH (*A. hydrophila*), AE (*A. eucrenophila*); AC (*A. caviae*); AJ (*A. jandaei*), AVS (*A. veronii sobria*), ND (especie no definida), ASch (*A. schubertii*); *, porcentaje de cepas positivas en la prueba; ⁺ NR, prueba no realizada.

Por lo que respecta a la capacidad hidrolítica de las distintas especies sobre diversos sustratos, todas las cepas analizadas fueron capaces de hidrolizar ADN y gelatina. En la tabla II.10 se detalla la frecuencia de presentación de las actividades proteolítica y lipolítica, sobre el resto de sustratos analizados, en las distintas especies de *Aeromonas*. Entre las cepas de *A. caviae* se presentó una relación inversa entre la actividad proteolítica sobre la caseína y la existencia del “fenómeno suicida”, de tal forma que la cepa que exhibía esta última propiedad, tras 24 horas de incubación, era incapaz de hidrolizar la caseína, mientras que lo hizo débilmente aquélla que mostró “actividad suicida” tras 48 horas de incubación. Las cepas pertenecientes a esta especie que no manifestaron dicha actividad, hidrolizaban la caseína con la misma intensidad que las cepas más proteolíticas del género.

En la tabla II.11 se muestra la frecuencia de presentación, en las distintas especies de *Aeromonas*, de los marcadores fenotipos que distintos autores han relacionado tradicionalmente con la virulencia. De las 20 cepas de *Aeromonas* que no pudieron ser identificadas a nivel de especie, dos manifestaron actividad -hemolítica, mientras el resto tenían las mismas características que las cepas adscritas a *A. schubertii*.

Tabla II.10. Actividades proteolítica y lipolítica de las distintas especies de Aeromonas.

	Especies‡						
	AH	AE	AC	AJ	AVS	GH 11	ASch
	(80) ⁽¹⁾	(2)	(4)	(28)	(33)	(1)	(3)
Elastina	95 *	100	25	60	78	100	100
Caseína	100	100	75	90	100	100	100
Tween 80	100	100	75	94	100	100	100
Lecitina	95	100	100	100	100	100	100
Yema de huevo	95	100	100	100	100	0	100
Tributirina	98	100	100	100	100	100	100

‡, AH (*A. hydrophila*), AE (*A. eucrenophila*); AC (*A. caviae*); AJ (*A. jandaei*), AVS (*A. veronii sobria*), ND (especie no definida), Asch (*A. schubertii*); *, porcentaje de cepas positivas en la prueba; ⁽¹⁾ número de cepas;

Tabla II.11. Marcadores fenotípicos de virulencia en las distintas especies de Aeromonas.

	Especies‡						
	AH	AE	AC	AJ	AVS	GH 11	ASch
	(80) ⁽²⁾	(2)	(4)	(28)	(33)	(1)	(3)
-hemólisis	75*	100	25	0	9	0	0
Voges-Proskauer	97	0	50	93	93	0	100
LDC ⁽¹⁾	100	0	25	25	72	0	0
Crecimiento a 37°C	60	100	0	20	15	0	0

‡, AH (*A. hydrophila*), AE (*A. eucrenophila*); AC (*A. caviae*); AJ (*A. jandaei*), AVS (*A. veronii sobria*), ND (especie no definida), Asch (*A. schubertii*); *, porcentaje de cepas positivas en la prueba; ⁽¹⁾ LDC, descarboxilación de la L-lisina; ⁽²⁾ número de cepas estudiadas de cada especie.

DISCUSIÓN

En ejemplares recién capturados, los recuentos de colonias típicas de *Aeromonas*, en Agar Almidón Ampicilina, en las muestras de piel de las tres especies de peces de agua dulce estudiados no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), pero los recuentos en muestras de agallas y en las de intestino, difieren substancialmente unos de otros (Tabla II.2). Una explicación a este hecho puede ser el propio origen del pescado; de esta manera, los peces de vida libre estudiados, trucha común y lucio, presentan unos patrones microbianos distintos al de la trucha arco iris, cultivada por el hombre, hecho ya observado por Sugita y col (1994). Los niveles de *Aeromonas* en las distintas muestras, de todos modos, son cercanos a los valores observados por varios autores en vísceras y muestras de agua (Hazen y col, 1978; Huang y Leung, 1993; Kaper y col, 1981; Leung y col, 1992a; Nishikawa y Kishi, 1988; Schubert, 1991), pero ligeramente inferiores a los encontrados por Leung y col (1992a) en piel de pez gato. Por lo que se refiere a las muestras de agua analizadas, las diferencias observadas entre los distintos lotes guardan paralelismo con los recuentos en agallas e intestino, aunque no se observaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$). Araujo y col (1991), por su parte, encontraron niveles de *Aeromonas* ligeramente superiores (cercanos a 10^3 ufc/ml) a los observados por nosotros.

Los bajos recuentos de *Aeromonas* en el intestino de los ejemplares de trucha arco iris recién capturados, en relación a las otras dos especies de pescado, pueden deberse al uso de compuestos antimicrobianos y antibióticos, añadidos al agua y al pienso de la dieta con el fin de controlar la aparición de procesos infecciosos que pudieran diezmar las poblaciones de peces cultivados en piscifactorías (Austin, 1985). Los distintos niveles en las muestras de agallas, pueden estar en relación con la diferente calidad microbiológica del agua de los estanques. Así, a mayores niveles de *Aeromonas* en el agua, mayores recuentos en las muestras de agallas (Tabla II.2).

Se puede observar, en las figuras II.1 y II.3, una diferencia, de algo más de dos unidades logarítmicas/cm², entre los recuentos iniciales y los recuentos en el día 15 de almacenamiento en las muestras de piel y superficie de la cavidad abdominal. Resultados similares obtuvieron Palumbo y col (1989) en trucha común, y Huang y Leung (1993) en pez gato. Este aumento de las poblaciones de *Aeromonas* durante la conservación del pescado puede ser debido al anteriormente mencionado carácter psicrotrofo de este género microbiano. Por otra parte, dicha evolución poblacional es paralela en ambas muestras durante todo el almacenamiento (a partir del día tres -figuras II.1 y II.3-), y guarda relación con la evolución de los recuentos de microorganismos viables (ver capítulo I). Le Chevallier y col (1982) encontraron correlación entre los niveles de *Aeromonas* y los de microorganismos viables.

Por lo que respecta a la presencia de *Aeromonas* en músculo, no se detectó su presencia hasta los días seis y doce del almacenamiento en trucha común (figura II.1) y lucio (figura II.3), respectivamente. Como ya se ha comentado en el capítulo I, el final de la vida útil de los ejemplares no eviscerados se estableció entre los días 9 y 10, y entre los 11 y 14 días en los peces no eviscerados. Teniendo esto en cuenta, representantes del género *Aeromonas* se aíslan en la masa muscular del lucio cuando los signos de alteración han

comenzado a ser evidentes (día nueve), siendo dichos ejemplares, por lo tanto, rechazados para el consumo desde ese mismo instante; por ello, el no aislamiento de *Aeromonas* del músculo de lucio sin eviscerar (a diferencia de los ejemplares de trucha común) podría ser interpretado como indicador de frescura.

También se aprecia una fase de latencia en la evolución de los recuentos de *Aeromonas* de piel (figuras II.1 y II.3), similar a la que se observa en los recuentos de flora aerobia mesófila, mientras que en la superficie de la cavidad abdominal no se presenta. La explicación de este fenómeno puede residir en el contacto directo de la piel con el hielo, que confiere a esta zona del pescado una temperatura cercana a la de fusión del hielo, la cual puede afectar al crecimiento microbiano (lo enlentece). Además, el agua procedente de la fusión del hielo puede dar lugar a un efecto de lavado y arrastre de los microorganismos que contribuiría al estancamiento de los recuentos de presuntas *Aeromonas*.

Las colonias características de *Aeromonas* en la piel de trucha arco iris no son detectables hasta el último día de almacenamiento, mientras que los recuentos en la superficie de la cavidad abdominal están ligeramente por encima del umbral mínimo de detección a partir del sexto día (figura II.2). No se detectaron colonias sospechosas en la profundidad de la masa muscular de los ejemplares de esta especie. La importancia, pues, de este grupo microbiano en trucha arco iris parece escasa en comparación con las otras dos especies estudiadas.

Nishikawa y Kishi (1988), aislaron *Aeromonas* en todas las muestras de pescado que analizaron. Por su parte, Gobat y Jemmi (1993) y Knochel y Jeppesen (1990) encontraron, respectivamente, que el 94% y el 75% de las muestras de pescado que analizaron eran positivas a la presencia de *Aeromonas*. Gobat y Jemmi (1993), por su parte, las aislaron, únicamente, en un 22% de las muestras de pescado, en proporciones similares al resto de muestras de alimentos (pollo y carne) que analizaron. Como acabamos de ver, en nuestro trabajo se han aislado cepas de este género en todas y cada una de las muestras tomadas de trucha común y lucio, mientras que en trucha arco iris no lo fueron en muestras de piel, en ejemplares recién capturados, ni en músculo, durante todo el almacenamiento (tabla II.6 y figura II.2). Puede que este hecho esté relacionado con los recuentos bajos de este grupo microbiano en las muestras de agua de los estanques de cría.

Si bien algunos autores recomiendan el uso de agua de peptona alcalina (APW) al favorecer el aislamiento de *Aeromonas*, (Kay y col, 1985; Majeed y col 1989; Von Graevenitz y Bucher, 1983), o bien el enriquecimiento en frío (Myers y col, 1982), Kaper y col (1981) lo desestiman porque favorece el crecimiento de microorganismos competidores. En este sentido, Gobat y Jemmi (1995) observaron una mejor tasa de aislamiento de *Aeromonas*, a partir de alimentos preinoculados, cuando se llevaba a cabo un enriquecimiento en APW (frente a siembra directa en medios selectivos) pero, sin embargo, apreciaron que la eficacia selectiva del medio sólido de siembra disminuía ostensiblemente cuando se realizaban dichos enriquecimientos. Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, y que el pescado fresco es un alimento en el que la presencia de *Aeromonas* es habitual, no nos pareció necesario el uso de enriquecimiento.

En general, los medios que contienen ampicilina son los más indicados para el aislamiento de *Aeromonas* (Arcos y col 1988; Havelaar y Vonk, 1988), si bien hay que

exceptuar a la especie *A. trota*, sensible a este antibiótico. El Agar Almidón Ampicilina (SA), incubado a 30°C durante 24 h, se ha empleado en este estudio al ser especialmente recomendado para el aislamiento de *A. hydrophila* en alimentos (Callister y Agger, 1987; Kirov y col, 1990; Knochel y Jeppesen, 1990; Palumbo y col, 1985). De todos modos, hay que tener en cuenta que Palumbo y col (1985) agrupan bajo el epígrafe *A. hydrophila*, no sólo a los representantes de esta especie, sino a todas las *Aeromonas* mesófilas. El medio SA ha sido recomendado por su capacidad para recuperar la mayoría de *Aeromonas* presentes en el alimento y, principalmente, por su carácter altamente selectivo (elevado número de cepas que, una vez aisladas, eran confirmadas como *Aeromonas*). Asimismo, este medio permite un recuento rápido de estos microorganismos en presencia de niveles altos de flora competidora (Palumbo y col, 1985). En cuanto a la temperatura ideal de incubación, cabe decir que, en los estudios llevados a cabo por Knochel (1989a) se observó que, si esta temperatura era menor de 30°C, disminuía el porcentaje de *Aeromonas* confirmadas, al verse favorecido el crecimiento de flora competidora. Por otra parte, Arcos y col (1988), consideran que la incubación durante un periodo máximo de 24 h incrementa su selectividad. En diversos trabajos, en los que se aislaban *Aeromonas* en diversos alimentos preinoculados, los niveles de recogida en SA fueron del orden del 68 al 122%, en los estudios de Palumbo y col (1985), y entre el 86 y el 89% en los de Poffé y Op de Beeck (1991). No se empleó en nuestro trabajo ningún medio clásico de los descritos para el aislamiento de *Aeromonas* presentes en muestras clínicas porque éstos no conseguían niveles de recogida aceptables cuando se utilizaban en alimentos, al ser dificultosa la distinción de las *Aeromonas* de la flora acompañante (Palumbo y col, 1985).

Como se muestra en la tabla II.3 el número de cepas confirmadas como pertenecientes al género *Aeromonas*, en relación a las cepas aisladas, es alto en los muestreos realizados en trucha común (94%) y en lucio (80%), semejantes a los obtenidos por Knochel (1989a), del orden del 85%, mientras que en las truchas arco iris es considerablemente menor, cercano al 40%. Esta diferencia puede deberse a la aparición, en ciertos microorganismos habitualmente aislados en hábitats acuáticos capaces de hidrolizar el almidón y de dar lugar a colonias típicas de *Aeromonas* (amarillas, de 1 a 2 mm de diámetro), de resistencia a la ampicilina presente en el medio SA. El desarrollo de resistencias puede estar relacionado con la adición de antibióticos al pienso de la dieta (Austin, 1985; Austin y Austin, 1992). Las cepas aisladas como presuntas *Aeromonas* que fueron desechadas como tales, lo fueron por su sensibilidad al agente vibriostático O-129, e identificadas presuntivamente como *Vibrio* spp. sin llegar a profundizar en su estudio. Por el contrario, en el estudio de Palumbo y col (1985) ninguna presunta *Aeromonas* fue identificada como perteneciente al género *Vibrio* (sensibles al O-129). En ese mismo trabajo se afirmaba que las cepas de *Vibrio* capaces de crecer a 4°C son amilasa negativas, si bien algunas cepas caracterizadas como amilasa positivas son capaces de crecer a esa temperatura (Baumann y col, 1984). Por su parte, Callister y Agger (1987) encontraron cepas de *Vibrio* amilasa positivas en el medio SA, no adscribiendo a dicho género ninguna de las cepas amilasa negativas. Se puede considerar que, en líneas generales, el medio SA ha sido adecuado para el aislamiento de miembros de este género en pescado de agua dulce. En comparación con otros medios de cultivo, el SA es el que logra un mayor porcentaje de recogida de cepas de la especie *A. hydrophila* (Pin y col, 1994).

Como puede verse en la figura II.4, un total de 151 cepas (88% del total) pudieron identificarse a nivel de especie, y adscribirse al grupo de hibridación correspondiente, siguiendo los esquemas descritos por Abbot y col (1992). Estos mismos autores (Abbot y col,

1992) proponen que, a partir de una identificación basada en caracteres fenotípicos, se puede llegar a una identificación a nivel de grupo de hibridación. Con la excepción de *A. trola*, se han aislado cepas pertenecientes a todas las especies de *Aeromonas* de interés sanitario (Janda, 1991). Como se observa en dicha figura (II.4), la especie mayoritariamente presente en pescado de agua dulce es *A. hydrophila*, con cerca del 50% del total de cepas aisladas, porcentaje muy similar al encontrado por Nishikawa y Kishi (1988), pero menor que los obtenidos por Hudson y De Lacy en 1991 (78%), Palumbo y col en 1989 (68%) y Fricker y Tompsett en 1989 (60%). En las muestras de trucha común (figura II.5), la mayoría de las cepas fueron identificadas como *A. hydrophila*, mientras que en trucha arco iris y en lucio (figuras II.6 y II.7) las diferencias, en cuanto a presencia relativa de las distintas especies de *Aeromonas*, son menores. A continuación de *A. hydrophila*, en importancia relativa en cuanto a su porcentaje de aislamiento (figura II.4), aparecen las especies *A. jandaei* y *A. veronii sobria* que, anteriormente, se identificaban como *A. sobria*. Estas especies son comúnmente encontradas en muestras de pescado y están muy asociadas con procesos gastrointestinales humanos. No se ha encontrado ninguna cepa perteneciente a la especie *A. sobria* (grupo de hibridación GH7).

Es destacable el hecho de que no se aislaron cepas de la especie *A. caviae* (especie “clásica” de *Aeromonas* móviles, junto a *A. hydrophila* y *A. sobria*, y comúnmente encontrada en ambientes acuáticos) en las muestras de trucha común (figura II.5) y las correspondientes de agua, en contraste con los trabajos de otros autores (Hudson y De Lacy, 1991). Este no aislamiento puede ser debido a dos hechos. En primer lugar, cabe decir que, tanto en aguas continentales como marítimas, la presencia de esta especie es directamente proporcional a la cantidad de materia orgánica; por ello, cabe suponer que, en aquellas áreas fluviales donde se obtuvieron las muestras de pescado (con poca contaminación orgánica al ser zonas de montaña y, tal y como las define Schubert (1991), “biológicamente limpias”), se ve favorecida la presencia de otras especies, tales como *A. hydrophila*, y dificultada la de *A. caviae* (Araujo y col, 1991; Pathak y col, 1988; Schubert, 1991). En segundo lugar, podría estar relacionado con el hecho de que para el subcultivo de cepas aisladas de dichas muestras, se utilizó Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid) en vez de un medio libre de glucosa, como Caldo Nutritivo (NB, Oxoid), que fue posteriormente empleado con las muestras de trucha arco iris y lucio. De esta manera, cuatro cepas, que fueron aisladas y subcultivadas en Caldo Triptona de Soja (Oxoid) e incubadas a 30°C durante 24 horas no mostraron crecimiento en medio sólido, tras ser sembradas a partir de dichos caldos, y a pesar de que los tubos mostraron una turbidez manifiesta. Namdari y Cabelli (1989), observaron un fenómeno que ellos calificaron como comportamiento “suicida”, que consistía en la pérdida de viabilidad, en 24 horas, de las células de la especie *A. caviae* cuando crecían en medios que contenían glucosa incubados a 30°C o a 37°C debido a la producción de determinados ácidos orgánicos que producían daños en la membrana celular. Por otra parte, la especie *A. caviae* apenas está presente en las muestras de trucha arco iris y de lucio analizadas; esto parece apoyar la hipótesis de que, efectivamente, los lugares de procedencia de los distintos ejemplares de pescado no presentan elevados niveles de contaminación microbiana.

Por lo que se refiere a las otras especies de *Aeromonas* identificadas (*A. eucrenophila* -trucha común-, *A. schubertii* -trucha común- y GH 11-trucha arco iris-), fueron aisladas en especies distintas de peces de agua dulce (figuras II.5 y II.6). De este hecho, y de su escaso número, no se puede extraer una conclusión definitiva en cuanto a la existencia de unas

condiciones medioambientales determinadas que favorezcan la presencia de una u otra especie de *Aeromonas*. Estas especies son aisladas en alimentos, únicamente, de manera ocasional.

Como se ve en las tablas II.5 y II.6, prácticamente todas las especies de *Aeromonas* encontradas en pescado también lo fueron en las muestras de agua que acompañaban a cada tipo de pescado, confirmando de nuevo lo postulado por Shewan (1971), es decir, que la flora del pescado refleja aquélla del ambiente en el que han sido obtenidos. En el caso particular de las cepas aisladas a partir del agua donde se capturaron los ejemplares de lucio (tabla II.7), cabe decir que pertenecen a las especies mayoritarias en las muestras tomadas de los lucios. En estas mismas tablas (II.5 y II.6) se puede apreciar que el origen de las *Aeromonas* presentes en la piel podría ser el agua en que se desarrolla el pescado, ya que casi todas las especies aisladas de piel también lo son a partir del agua; del mismo modo, las cepas aisladas de la superficie de la cavidad abdominal procederían tanto de los microorganismos liberados a partir del intestino durante el eviscerado, como de aquéllas que, inicialmente presentes en la piel, llegan a la cavidad abdominal como consecuencia del efecto de arrastre y lavado del agua de fusión del hielo sobre la piel. De hecho, todas las especies aisladas de la superficie de la cavidad abdominal, también lo fueron de muestras de piel y/o intestino.

En lo que se refiere al origen de las cepas aisladas de muestras de tejido muscular, mayoritariamente *A. hydrophila* y *A. veronii sobria*, hay que tener en cuenta que, en los primeros estadios del almacenamiento, a partir de este tejido no se recuperan microorganismos (Capítulo I); en los peces sanos existen una serie de barreras fisiológicas (p.e. integridad de la piel, sistema inmune, etc...) que impiden el paso y asentamiento de microorganismos en su seno, pero que desaparecen al morir el pez y comenzar el almacenamiento (Shewan 1971). A partir de este momento, los microorganismos procedentes de piel, agallas e intestino llegan por distintas vías (p.e. lisis de la piel, del peritoneo y/o a través de los vasos sanguíneos). Las cepas del género *Aeromonas* que alcanzan el tejido muscular (a las que hemos hecho referencia anteriormente) tienen dos características: la primera es que son psicotrofas y sus niveles han aumentado durante el almacenamiento a refrigeración; la segunda es que pertenecen a las especies más proteolíticas del género, tal y como puede verse en la tabla II.10. Asimismo cabe recordar que, en el momento en que aparecen estos microorganismos en el músculo de lucio, éste ya presenta signos de alteración.

La especie *A. hydrophila* fue aislada de, prácticamente, todas las muestras analizadas. En muestras de intestino en trucha arco iris, Sugita y col (1994) aislan mayoritariamente la especie *A. hydrophila*, en contra de los resultados obtenidos por nosotros, en los que esta especie no se obtuvo en dichas muestras (tabla II.6). Este mismo autor, a partir de otros peces de agua dulce (carpa común, tilapia y pez gato), aisló representantes de las especies *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii sobria* y *A. jandaei*, que, con la excepción de *A. sobria* (GH 7), fueron igualmente obtenidas por nosotros.

En la tabla II.8 se refleja el aislamiento de las distintas especies de *Aeromonas* a partir de muestras de lucio, y a lo largo del almacenamiento a refrigeración de los distintos lotes. En ella se observa que las cepas que tradicionalmente eran identificadas como *A. sobria* (*A. veronii sobria* y *A. jandaei*) están presentes en las muestras de piel a lo largo de dicho almacenamiento, mientras las de *A. hydrophila* sólo lo están hasta el momento de empezar a instaurarse los primeros signos de alteración; las cepas no identificadas a nivel de especie sólo

aparecen en piel al principio del almacenamiento y cuando los ejemplares estaban ya alterados. En las muestras de cavidad abdominal la mayor parte de las cepas aisladas en los primeros estadios del almacenamiento pertenecen al complejo *A. sobria* (*A. veronii sobria* y *A. jandaei*), decreciendo su número a lo largo del mismo y aumentando el de las cepas pertenecientes a la especie *A. hydrophila* a partir del establecimiento de la alteración. En el tejido muscular se aprecia que las cepas de *Aeromonas* se aislaron a partir del momento en que se comenzaron a apreciar signos de alteración. Estas cepas se identificaron como *A. veronii sobria*. Las cepas de *A. hydrophila* y de *Aeromonas* spp. se aislaron de músculo, únicamente, cuando los ejemplares estaban completamente alterados (día 15 de almacenamiento).

La identificación de las cepas a nivel de género se ha basado en la utilización de diez pruebas bioquímicas. Austin y Lee (1992) recomiendan el uso de un mínimo de seis pruebas para la diferenciación de las cepas de *Aeromonas* de las pertenecientes a otros géneros de la familia *Vibrionaceae*, así como de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* con los que se pudiera confundir. Por otro lado, la identificación a nivel de especie y, por extensión, de grupo de hibridación (GH), se ha llevado a cabo con ayuda de los esquemas descritos por Abbot y col (1992), utilizando un número reducido de tests bioquímicos de uso rutinario en laboratorios de análisis de alimentos (hemos empleado 16 pruebas, frente a las 19-24 de Abbot y col, 1992). Otros autores, como Sugita y col (1994) son contrarios a esta metodología, a la que consideran laboriosa y que requiere mucha preparación por parte del investigador. Kuijper y col (1989), por su parte, ha observado que cepas identificadas como *A. hydrophila* por este sistema pertenecen, en realidad, al grupo de hibridación 8 (*A. veronii sobria*). Janda (1991) opina, por otro lado, que este tipo de metodología simplifica mucho la identificación y propone seguir con la identificación fenotípica de las especies principales. Añade, incluso, que un esquema con 10 ó 15 pruebas puede ser suficiente para distinguir las cepas de *Aeromonas* importantes en medicina humana.

Por lo que se refiere a nuestro trabajo, se han conseguido identificar, a nivel de especie, un 88% de las cepas previamente adscritas al género *Aeromonas*. Sirimaco-Neves y col (1990) identificaron un 76% de las cepas utilizando, asimismo, un esquema simple. De todos modos, para completar la identificación a este nivel, haciéndola más precisa, sería necesario llevar a cabo estudios de hibridación de ácidos nucleicos, que requerirían, además de un equipamiento adecuado, cierta especialización y entrenamiento, de tal manera que no se pueden llevar a cabo en todos laboratorios donde se desarrollan análisis microbiológicos de rutina. Por ello, y teniendo en cuenta el porcentaje de microorganismos identificados (cerca del 90% del total), así como el hecho de que las cepas identificadas pertenecen a grupos de hibridación comúnmente aislados en alimentos y en muestras clínicas, estos esquemas, basados en identificación fenotípica, son ideales en laboratorios donde se realizan análisis microbiológicos de alimentos. En nuestro estudio no se han empleado métodos rápidos de identificación miniaturizados, tales como las galerías API, ni medios de cultivo para la realización de tests múltiples, como el medio AH diseñado por Kaper y col (1979) para la identificación rápida de *A. hydrophila*, al ser confusos los resultados obtenidos y estar referidos solamente a las "especies clásicas" de *Aeromonas* (Janda, 1991; Ogden y col, 1994; Toranzo y col, 1986)

Como puede apreciarse en la tabla II.9, para la diferenciación entre las cepas de *Aeromonas* identificadas a nivel de especie, aisladas de muestras de pescados de agua dulce, sería necesaria la utilización de los siguientes tests bioquímicos:

1. Hidrólisis de la esculina para distinguir *A. hydrophila*, *A. eucrenophila* y *A. caviae* del resto de especies del género; esta prueba ya fue propuesta por Popoff y Veron en 1976 con este fin.
2. La descarboxilación de la L-lisina, así como la producción de diacetilo a partir de la glucosa, es una prueba útil para la diferenciación de *A. hydrophila* y *A. eucrenophila* (Abbot y col, 1992)
3. Producción de gas a partir de la glucosa y de H₂S a partir de cisteína, para distinguir *A. hydrophila* de *A. caviae*, tal y como recomendaban Popoff y Veron (1976).
4. Formación de ácido a partir de D-manitol para distinguir *A. schubertii* del resto de especies, siguiendo las indicaciones de Hickmann-Brenner y col (1988). Las cepas que eran manitol negativas y producían gas a partir de la glucosa no se consideraron como pertenecientes a esta especie y se agruparon con el resto de cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie.
5. Descarboxilación de la L-ornitina, para diferenciar la cepa del grupo de hibridación 11 del resto, así como la incapacidad de dar positivo en la prueba del Voges-Proskauer para distinguirla de *A. veronii veronii* (Abbot y col, 1992).
6. Para la distinción entre las cepas del grupo "*A. sobria*", compuesto por las especies *A. sobria*, *A. jandaei* y *A. veronii sobria*, se utilizaron los siguientes criterios: las cepas incapaces de producir ácido a partir de la sacarosa fueron identificadas como *A. jandaei*; el hecho de que el resto de cepas de este grupo fueran capaces de hidrolizar la arginina y de que las cepas que conforman el grupo de hibridación 7 (que contiene la cepa tipo de *A. sobria*) son rara vez aisladas en alimentos y en muestras fecales (Kjuiper y col, 1989), hizo que las identificáramos como pertenecientes a la especie *A. veronii sobria* a pesar de que sólo un bajo porcentaje de las mismas fermentaron la salicina (característica típica de *A. veronii sobria*).
7. Otra serie de pruebas, como la del rojo de metilo, producción de ácido a partir de la arabinosa y la producción de indol, han ayudado a clarificar la posición taxonómica de algunas de las cepas pertenecientes al género *Aeromonas*.

Recientemente se ha descrito una nueva especie móvil de *Aeromonas* (Esteve y col, 1995b), *A. encheleia* (aislada a partir de anguilas sanas cultivadas en una piscifactoría) cuyas características más significativas son su capacidad para hidrolizar la esculina y la actividad elastinolítica negativa. Teniendo en cuenta ambas características, un 5% de las cepas identificadas como *A. hydrophila* podían ser adscritas a esta especie de nueva descripción, pero estas cepas fueron asimismo incapaces de producir ácido a partir de la salicina (*A. encheleia* sí fermenta este azúcar), por lo que no modificamos su adscripción y las asignamos, definitivamente, a *A. hydrophila*. Asimismo, también podría haberse confundido con algunas de las cepas identificadas como *A. caviae*, pero éstas eran incapaces de producir gas a partir de la glucosa, a diferencia de la cepa tipo de *A. encheleia*, por lo que su identificación permaneció como estaba.

Tradicionalmente, la diferenciación fenotípica entre los grupos de hibridación 1, 2 y 3 es dificultosa (Kämpfer y Altwegg, 1992). En el presente trabajo, la diferenciación entre las mismas se ha llevado a cabo empleando el esquema de Hänninen (1994), basándonos en el empleo de sorbitol y ácido urocánico. Así, las cepas del GH 1 fueron las únicas incapaces de utilizar el ácido urocánico, mientras que las cepas del GH 3 eran las únicas capaces de producir ácido a partir del D-sorbitol. Hemos encontrado representantes de los tres grupos de

hibridación en todas las muestras analizadas de pescado de agua dulce, a diferencia de otros autores (Hänninen y col, 1994), excepto en el caso del GH 3 en lucio (tabla III.4). Kirov y col (1994) y Hänninen y col (1994) coinciden en que la mayoría de las cepas del GH 1 han sido aisladas de muestras clínicas, mientras que las GH 2 y 3 se encuentran con mucha mayor frecuencia en alimentos, agua y otras muestras ambientales, y son consideradas como poco importantes desde el punto de vista de la salud pública. Asimismo, las cepas del GH 1 aisladas de muestras clínicas presentan una mayor virulencia que las aisladas de muestras ambientales y son calificadas por Kjuiper y col (1989) como *A. hydrophila* "sensu stricto". Las cepas de estos tres grupos de hibridación también difieren en su temperatura máxima de crecimiento, siendo más alta en el caso del GH 1 (Hänninen, 1994). Este extremo no ha podido ser comprobado en nuestro trabajo.

Por lo que se refiere a la exhibición del fenómeno "suicida" por parte de algunos microorganismos cabe destacar que esta propiedad no fue común a todas las cepas adscritas a la especie *A. caviae*. Esta prueba, por tanto, serviría para confirmar que una cepa problema pertenece a esta especie, pero el hecho de que no manifieste dicha actividad no la excluiría de esta identificación.

La frecuente actividad lipolítica y proteolítica exhibida por las distintas especies de *Aeromonas*, tal y como se muestra en la tabla II.10, ha sido relacionada con la capacidad que tienen estos microorganismos de producir alteración en los alimentos (Gram, 1991; Knochel, 1990). Asimismo, Cahill (1990), Daily y col (1981), Janda y col (1985) y Wadström y Ljungh (1988), entre otros, han propuesto la existencia de una relación entre estas actividades exoenzimáticas y la virulencia de *Aeromonas* en el hombre. Todas las especies mostraron una marcada capacidad proteasa y lipasa (más del 90% en la mayor parte de los casos), apreciándose una actividad proteolítica menos frecuente en las especies *A. caviae* y *A. jandaei*, especialmente en lo que se refiere a la degradación de la elastina. También Hänninen (1994) observó una tasa baja de actividad elastolítica entre estas especies de *Aeromonas*. Por su parte, Janda y col (1985) obtuvieron valores de actividad elastinolítica cercanos a los observados por nosotros en las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii sobria* y *A. jandaei*. Por lo que respecta a la relación inversa observada en las tres de las cuatro cepas de *A. caviae* entre la actividad proteolítica sobre la caseína y la manifestación del fenómeno suicida ya había sido anteriormente observada en nuestro laboratorio (Santos, 1994).

Desde principios de los años sesenta ha habido un creciente interés por determinar si existe algún tipo de relación entre algunas propiedades fenotípicas y la presencia de factores de virulencia asociados a cepas de este género (Kirov y col, 1990). De esta manera, se han ido estudiando distintas pruebas bioquímicas, de las cuales la descarboxilación de la lisina, la prueba del Voges-Proskauer y la actividad elastinolítica han mostrado relación directa con los resultados obtenidos al realizar las pruebas biológicas "in vivo" e "in vitro" comúnmente empleadas para la demostración de propiedades de virulencia; a este respecto se han obtenido resultados variables en distintos trabajos (Abeyta y col, 1986; Callister y Agger, 1987; Cumberbatch y col, 1979; Daily y col, 1981; Kaper y col, 1981; Kirov y col, 1986; Le Chevalier y col, 1982; Seidler y col, 1980). A estas pruebas bioquímicas se las ha definido como "marcadores fenotípicos de virulencia". Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en el transcurso de nuestro estudio, la presencia de actividad lisina descarboxilasa y positividad en la prueba del Voges Proskauer es mayoritaria en las especies *A. hydrophila* y

A. veronii sobria, mientras que es nula en las cepas de *A. eucrenophila* (característica de esta especie) y del GH 11. En las otras especies, la actividad lisina descarboxilasa se da en menos de un 25% de las cepas, y no tiene relación con los porcentajes de positividad en la prueba del Voges Proskauer (tabla II.11)

La capacidad de las cepas de *Aeromonas* de crecer a 37°C también ha sido estudiada. Esta temperatura, a la que no crecen algunas cepas aisladas a partir de muestras ambientales, podría ser indicativa de la capacidad de colonizar e invadir hospedadores homeotermos, como el hombre, que pueda permitir la producción de exotoxinas “in vivo”. Un porcentaje relativamente bajo de las cepas estudiadas, positivas para los marcadores de virulencia a los que anteriormente hemos hecho referencia, han sido capaces de crecer a esta temperatura y pertenecen a las especies *A. hydrophila* (un 60% de ellas crecen a 37°C, tabla II.11), y *A. veronii sobria* (15%) y *A. jandaei* (20%).

La mejor aproximación al marcador fenotípico de virulencia ideal es la manifestación de actividad α -hemolítica, por parte de estos microorganismos, en medio sólido que contenga sangre de alguna especie de mamífero (Abeyta y col, 1986; Gracey y col, 1982b; Kirov, 1993). De hecho, esta propiedad es un marcador de virulencia “per se”. Distintos autores han postulado, asimismo, que la mayoría de las cepas que exhiben actividades citotóxica y enterotoxigénica son capaces de lisar eritrocitos presentes en un medio sólido (Abeyta y col, 1986; Monfort y Baleux, 1990). Callister y Agger (1987), por su parte, encontraron que todas las cepas hemolíticas tenían efectos citotóxicos sobre cultivos celulares. Por el contrario, Nishikawa y Kishi (1988) opinan que la hemólisis sólo sirve para definir especies y no para distinguir entre cepas virulentas y avirulentas. En nuestro estudio, la mayor parte de las cepas identificadas como *A. hydrophila* eran α -hemolíticas (tabla II.11), lo cual está en concordancia con los resultados de Janda (1985). Por el contrario, un porcentaje bajo de *A. veronii sobria* (9%), la mayor parte de las cuales eran fermentadoras de la salicina, exhibían esta propiedad. Una cepa de la especie *A. caviae* (de las cuatro estudiadas) mostró esta propiedad, contrariamente a lo esperado, ya que la actividad hemolítica está principalmente relacionada con las especies *A. hydrophila* y *A. veronii sobria*, mientras que, tan sólo un bajo porcentaje de las cepas de *A. caviae* son capaces de manifestarla (Araujo y col, 1991; Callister y Agger, 1987; Monfort y Baleux, 1990; Nishikawa y Kishi, 1988). Sirimaco-Neves y col (1990) aislaron cepas de *A. caviae* de río que no eran hemolíticas, mientras que el 75% de las cepas (muy por encima de nuestros resultados) de la especie *A. veronii sobria* sí lo fueron. Parece ser que la manifestación de la actividad α -hemolítica de la especie *A. caviae* está muy relacionada con la presencia de hierro en el medio (Karunakaran y Devi, 1994).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, referentes a los marcadores fenotípicos de virulencia estudiados, tan sólo un pequeño número de representantes de las especies *A. hydrophila* y *A. veronii sobria* podrían ser considerados, “a priori”, como potencialmente patógenos (Kirov, 1993). En este sentido, Esteve y col (1995a) observaron que cepas de *A. hydrophila* y *A. jandaei* eran más activas que *A. caviae* y *A. sobria*, entre otras, con respecto a sus actividades enzimáticas, hemolíticas y citopáticas. Con el fin de confirmar su carácter virulento se han realizado otros estudios encaminados a la determinación de la producción de factores de virulencia tales como citotoxinas y enterotoxinas, aspecto que será tratado en el capítulo III.

CAPÍTULO III:

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A *Aeromonas*

INTRODUCCIÓN

A pesar de haberse visto reconocida recientemente la participación del género *Aeromonas* en procesos patológicos de localización gastrointestinal como consecuencia del consumo de alimentos contaminados (Altwegg y col, 1991), el mecanismo, o mecanismos, por los cuales algunos de los miembros de este grupo microbiano son capaces de desencadenar procesos diarreicos en seres humanos sigue siendo motivo de estudio y controversia.

Gracey y col (1982a) y Schubert (1991) describen tres patrones sintomáticos de gastroenteritis asociada a *Aeromonas*:

1. Parecido al cólera: diarrea de agua de arroz.
2. Diarrea con mucus hemorrágico.
3. Gastroenteritis con diarrea prolongada.

De aquí se puede desprender que en el desarrollo del cuadro clínico o bien participan varios factores de virulencia, que se combinan entre sí de distinta manera dando lugar a distintos patrones sintomáticos, o bien diferentes mecanismos de patogenicidad están involucrados en cada una de las distintas manifestaciones de la enfermedad anteriormente descritas.

Un aspecto relativo a la virulencia de *Aeromonas* es aquél que se refiere a la vía de entrada y modo de establecimiento de la enfermedad. Kirov (1993), por un lado, postula dos mecanismos bien diferenciados:

1. Ingestión de las células bacterianas, multiplicación en la mucosa intestinal y exhibición de distintos factores de virulencia.
2. Ingestión de la toxina preformada en el alimento.

De todos modos, en la mayoría de los casos de gastroenteritis debida a *Aeromonas* hay evidencia de infección, no de intoxicación (Knochel, 1989b). Beuchat (1991), asimismo, considera poco probable la intoxicación como mecanismo de patogenicidad.

Por su parte, Wadström y Ljungh (1988) se refieren únicamente a la primera de las afirmaciones de Kirov (1993) y propone el siguiente modelo de patogénesis tras la ingestión de las bacterias patógenas pertenecientes al género *Aeromonas*:

1. Colonización con ayuda de las fimbrias.
2. Acción de ácidos siálicos específicos.
3. Degradación de la capa de mucus de las vellosidades intestinales por las proteasas.
4. Producción y liberación de enterotoxinas (termolábil y semejante a la del cólera) en cepas adaptadas a animales de sangre caliente.

En 1975, Sanyal y colaboradores demostraron que en un modelo animal, el asa ileal ligada de conejo, inoculado con distintas cepas de *Aeromonas* de origen clínico se producía acúmulo de fluidos. Desde entonces, el interés mostrado por distintos grupos de

investigadores en el estudio de los mecanismos de virulencia asociados a *Aeromonas* ha sido creciente. Desafortunadamente no se ha encontrado un modelo animal ideal para el estudio de la patogenicidad de este grupo microbiano (Kirov y col, 1990; Nishikawa y Kishi 1988). Nishikawa y Kishi (1988) se hacen eco de que incluso las pruebas realizadas con voluntarios humanos han resultado negativas.

Entre los posibles mecanismos de patogenicidad asociados al género *Aeromonas* que han sido propuestos y estudiados por distintos autores a lo largo de los años y, finalmente, agrupados por Janda (1991), destacan los que aparecen en la tabla III.1, que varían de unas cepas a otras, y que se dividen en tres grandes grupos:

Tabla III.1. Factores de virulencia asociados a *Aeromonas*.

	Denominación	Otras denominaciones	Peso molecular
Asociados a productos extracelulares	Hemolisina		65Kd
	Hemolisina	Aerolisina, Enterotoxina citotóxica, Toxina de Asao	49-54 Kd
	Enterotoxina citotónica	Toxina semejante a la del cólera	15 Kd
	Proteasa termolábil	Serinproteasa	68 Kd
	Proteasa termoestable -amilasa Quitinasa Sideróforos	Metaloproteasa	35-38 Kd 49 Kd
Asociados a la célula	Invasinas Resistencia a sueros Plásmidos Adhesinas		
Factores estructurales	Pilis Capas-S Lipopolisacáridos Proteínas externas de membrana		

La mayor parte de las investigaciones que se han llevado a cabo hasta la fecha se han centrado en el primer grupo, es decir, en aquellos factores de virulencia asociados a productos extracelulares, análogamente a lo realizado con otros microorganismos patógenos Gram negativos cuya virulencia está relacionada con su actividad extracelular. Janda (1991) los considera como determinantes en el desencadenamiento de la enfermedad. A continuación, nos referiremos brevemente a aquellos factores de virulencia objeto de nuestro estudio.

Las proteasas producidas por *Aeromonas* han sido relacionadas, principalmente, con la patogenicidad de este género microbiano sobre animales poiquilotermos (Thune y col, 1982). También se las ha relacionado con procesos infecciosos extraintestinales en humanos (Ljungh y Wadström, 1982-1983). En otros microorganismos Gram negativos, las proteasas contenidas en sus productos extracelulares juegan un papel muy importante en su patogenicidad y virulencia a nivel gastrointestinal (Janda, 1991). Se ha propuesto que las proteasas producidas por *Aeromonas* participan en la virulencia a este mismo nivel al:

1. Provocar daño tisular directo (Leung y Stevenson, 1988; Wadström y Ljungh, 1988).
2. Favorecer el acúmulo de líquidos en el tracto gastrointestinal (Wadström y Ljungh, 1988).
3. Activar mecanismos enterotoxigénicos mediante la actuación sobre otras proteínas extracelulares secretadas al mismo tiempo (Leung y Stevenson, 1988).

Distintos autores (Leung y Stevenson, 1988; Rivero y col, 1990, 1991) hacen referencia a dos tipos de proteasas: una termoestable (metaloproteasa), y otra termolábil (serinproteasa), que difieren en su peso molecular (35-38 Kd y 68 Kd respectivamente), con actividad inespecífica sobre distintos sustratos proteicos (Leung y Stevenson, 1988) y producidas ambas por la mayoría de las cepas de *Aeromonas* (Janda, 1991). Ljungh y Wadström (1982-1983) y Thune y col (1982), por su parte, difieren de lo anteriormente expuesto en lo referente a los pesos moleculares de ambas enzimas: el de la metaloproteasa es de 22 Kd, mientras el de la serinproteasa es de 42-43 Kd. También se ha postulado la existencia de una tercera proteasa, con actividad elastinolítica, a la que se ha relacionado con la virulencia, y que Cumberbatch y col (1979) identifican con el factor de redondeamiento celular termoestable. En animales poiquilotermos se la ha asociado con el desencadenamiento de enfermedad (Esteve y col, 1995c). Finalmente, Ljungh y Wadström (1982-1983) describen dos endopeptidasas, una termoestable (24 Kd) y otra termolábil (34,8 Kd). Janda (1991), por su parte, afirma que las cepas de *A. hydrophila* son capaces de producir cuatro o cinco proteasas diferentes.

El aspecto que mayor controversia produce entre los distintos investigadores es el referente a la existencia y naturaleza de moléculas que provocan acúmulo de fluidos en modelos animales (tales como el asa ileal ligada de conejo -AIL- y la prueba de los ratones lactantes -TRL-, que para Dean y col -1972- son ensayos equivalentes) y que inducen efectos característicos de compuestos enterotoxigénicos en cultivos celulares. Entre los factores que presumiblemente tienen este efecto se encuentran las hemolisinas, una enterotoxina citotóxica o citolítica (provoca rotura o lisis de las células) y una enterotoxina citotónica (no provoca rotura de las células, sino que aumenta los niveles intracelulares de AMPc -Gammel, 1984-). Las principales dificultades en su estudio se deben a la interferencia existente entre los distintos componentes de los productos extracelulares. Al ser inoculados “en crudo” en los modelos biológicos a los que anteriormente hemos hecho referencia, se hace imposible distinguir, en principio, si la acumulación de fluidos se ha debido a alguno de esos componentes o a varios. Estos problemas se obvian en el momento en el que se trabaja bien con moléculas purificadas, bien con sueros frente a algunas de ellas o bien tratando los productos extracelulares con calor. Por ejemplo, Seidler y col (1980) observaron que el porcentaje de cepas enterotoxigénicas en la línea Y-1, tras tratamiento a 56°C durante 10 minutos, disminuía considerablemente con respecto a los productos extracelulares (EPC) “en

crudo". La molécula enterotoxigénica era termoestable en algunos casos, y termolábil en otros. Champsaur y col (1982) apreciaron que, a 56°C durante diez minutos, desaparecían las actividades citotóxica, proteolítica y hemolítica relacionadas, como anteriormente se ha citado, con la actividad enterotoxigénica.

Las hemolisinas son moléculas que poseen actividad biológica en distintos modelos experimentales. Se distinguen, en principio, dos hemolisinas: la *α* y la *β*. La hemolisina *α* es una toxina termolábil, de 65 Kd de peso molecular, producida a temperaturas menores de 37°C (Ljungh y Wadström, 1982-83). La hemolisina *β*, por su parte, también es una molécula destruida por tratamiento térmico (56°C, 10 minutos) del orden de 50 Kd de peso molecular y estable frente a la acción de las proteasas (Asao y col, 1984; Bernheimer y Avigad, 1974; Ljungh y Wadström, 1982-83). Por lo que respecta a la actividad de estas moléculas, hay resultados contradictorios entre los distintos grupos de investigadores. Así, Ljungh y Wadström (1982-1983) y Wadström y Ljungh (1988), afirman que el efecto de ambas hemolisinas sobre los modelos anteriormente citados (AIL y TRL) consiste en una pequeña acumulación de fluido sanguinolento aunque no se observan los típicos efectos enterotoxigénicos (acumulación de fluidos). Otros autores (Asao y col, 1986; Burke y col, 1981b; Kirov y col, 1993; Stelma y col, 1986), han observado que las hemolisinas provocan acúmulo de líquidos en AIL y TRL, mostrando un efecto equivalente al de una enterotoxina citotóxica o citolítica. Asimismo y por lo que se refiere a otras acciones tóxicas de estas moléculas, cabe decir que tienen un efecto citotóxico sobre distintas líneas de cultivos celulares, como la línea VERO (Asao y col, 1984; Barer y col, 1986; Burke y col, 1981a), produciendo redondeamiento y/o vacuolización de las células (Wadström y Ljungh, 1988). Parece evidente, pues, que las hemolisinas, principalmente la hemolisina *α*, constituyen uno de los factores que, con mayor frecuencia, participan en la virulencia de *Aeromonas*, si bien no es el único, tal y como apuntan Brenden y Janda (1987) y Ljungh y Wadström (1982-1983). Stelma y col (1986), por otro lado, afirman que la hemolisina *β* provoca cambios significativos en la permeabilidad intestinal, siendo un mecanismo de patogenicidad más común que la enterotoxina citotóxica termoestable. Distintos autores han propuesto recientemente la existencia de hemolisinas específicas de especie en *Aeromonas* (Brenden y Janda, 1987), así como la producción, por distintas cepas de una misma especie, de hemolisinas con diferente grado de afinidad por eritrocitos de distintas especies (Nzeako y col, 1991).

Gemmel (1984) enumera tres tipos de enterotoxinas distintas producidas por microorganismos Gram negativos: una enterotoxina citotóxica termoestable, otra citotóxica termolábil, así como una molécula enterotoxigénica con efectos citotóxicos e igualmente termolábil. En el género *Aeromonas*, los efectos enterotoxigénicos de carácter citotóxico, tal y como postulan distintos autores (Ljungh y col, 1981; Asao y col, 1986; Stelma y col, 1986) pueden ser inducidos por la hemolisina *α*.

Wadström y Ljungh (1988), se hacen eco de dos tipos de enterotoxinas citotóxicas no relacionadas antigénicamente, una de las cuales reacciona con el suero antitoxina del cólera. La existencia, puesta en entredicho por Johnson y Lior (1981), de esta enterotoxina llamada también "Toxina semejante a la del cólera" había sido propuesta anteriormente por Honda y col (1985), pero ha sido estudiada, principalmente, por Potomski y col (1987), que la

describen como un conjunto de moléculas de distintos pesos moleculares (27, 29 y 43 Kd), que acumulan fluidos en AIL y TRL y que no tienen efectos hemolíticos ni enterotoxigénicos típicos en cultivos celulares. La frecuencia de producción de esta enterotoxina en las distintas especies de *Aeromonas*, según estos mismos autores, es la siguiente: un 20% de *A. hydrophila*, un 26% de *A. sobria* y un 24% de *A. caviae*. Chopra y Houston (1989) purificaron y caracterizaron parcialmente una enterotoxina citotónica, de 44 Kd de peso molecular, producida por *A. hydrophila* que tampoco poseía actividades hemolítica ni citotóxica. Afirmaron, asimismo, que su mecanismo de acción podría ser similar al de las enterotoxinas termolábiles de *E. coli* y *V. cholerae*.

Pero la enterotoxina citotónica que ha sido estudiada y caracterizada con mayor interés es la descrita por Ljungh y Wadström (1982-83), y a la que han hecho referencia la mayoría de los autores (Burke y col, 1981b; Chakraborty y col, 1984; Gemmel, 1984). Esta enterotoxina es una molécula de 15 Kd de peso molecular, estable durante calentamiento a temperaturas de 56°C, que incrementa los niveles intracitoplasmáticos de AMPc y provoca acumulación de fluidos en AIL, pero no siempre en TRL, sensible frente a proteasas y que tiene efectos semejantes a los inducidos por la toxina del cólera y por la enterotoxina termolábil de *E. coli* sobre las líneas celulares Y-1 y CHO, pero que no está relacionada antigénicamente con estas toxinas (Gemmel, 1984).

Asimismo, Wadström y Ljungh (1988) postulan la existencia de una tercera enterotoxina semejante a la del cólera, pero de naturaleza termoestable.

Se han realizado diversos estudios (Eley y col, 1993; Kirov y Bodribo, 1993; Majeed y McRae, 1991) con el fin de establecer si existe alguna influencia, por parte de la temperatura de incubación, sobre la producción de factores de virulencia en las cepas de *Aeromonas*. Así se ha estudiado la producción de toxinas tanto en medios de cultivos líquidos, como en homogeneizados de alimentos previamente esterilizados a los que se les inoculaban *Aeromonas*. En dichos trabajos, y en general, se observó que a temperaturas de refrigeración se producían toxinas, las cuales, en caso de almacenamiento prolongado del alimento, podrían suponer un riesgo para la salud. También se ha investigado la producción de toxinas extracelulares a 37°C (p.e. Mateos y col, 1993), con el fin de mimetizar su capacidad infectiva “in vitro” y poder extrapolar los resultados a una infección “in vivo”, y a 28°C, temperatura óptima de crecimiento de *Aeromonas* (Palumbo y col, 1987).

Wadström y Ljungh (1988) opinan que, de modo similar a lo que ocurre con *E. coli*, solamente las cepas pertenecientes al género *Aeromonas* con combinaciones específicas de factores de virulencia son capaces de colonizar el intestino grueso o delgado y causar enfermedad. Por ello, la capacidad de producir tan sólo una de las exotoxinas a las que hemos hecho referencia anteriormente no garantizaría el desarrollo de la enfermedad. En este mismo sentido, Stelma y col (1986), afirman que la evidencia de producción de exotoxinas no siempre predice la capacidad de *Aeromonas* de causar enfermedad humana; están involucrados otros factores desconocidos que permiten el crecimiento de *Aeromonas* patógenas en el intestino. Además de los factores de virulencia que aparecen en la tabla III.1, diversos autores, como Champsaur y col (1982) y Ljungh y Wadström (1982-83), han hecho referencia a la presencia, asociada a *Aeromonas*, de otros, como leucocidinas, factores dermonecróticos, fosfolipasas y factores de redondeamiento celular. También se ha sugerido

que la presencia de otro microorganismo patógeno puede estimular la virulencia de *Aeromonas*.

A lo largo de estos años también se ha venido estudiando la relación entre virulencia y especie de *Aeromonas*, habiéndose encontrado que esta correspondencia es mayor en las especies *A. hydrophila* y *A. veronii sobria* (*A. sobria*). La cepas pertenecientes a la especie *A. hydrophila* han sido las más estudiadas en relación con la producción de factores de virulencia. *A. veronii sobria* (anteriormente identificada como *A. sobria*) también ha sido reconocida como una especie capaz de exhibir propiedades de virulencia y, de hecho, muestra una mayor capacidad invasiva que *A. hydrophila* (Kirov, 1993). Según Kirov (1993), la primera (*A. veronii sobria*) está más relacionada con gastroenteritis agudas, mientras que la segunda (*A. hydrophila*) lo está con gastroenteritis crónicas. Por lo que respecta a *A. caviae*, los trabajos en los que se hace referencia a la producción de factores de virulencia obtienen resultados de positividad muy por debajo de las otras dos especies (Majeed y col, 1989), pero se ha descrito la presencia de una enterotoxina citotónica semejante a la del cólera en los productos extracelulares de cepas de esta especie (Potomski y col, 1987), así como capacidad invasiva sobre cultivos celulares (Shaw y col, 1995). Asimismo se sospecha que el mecanismo por el cual *A. caviae* causa diarrea es análogo al de *Plesiomonas shigelloides* (Janda y col, 1985). Finalmente, y por lo que se refiere a las variaciones en la virulencia dentro de las cepas adscritas a cada especie, Janda (1991) afirma que estas diferencias no se pueden adscribir a un solo factor extracelular o asociado a la célula.

Por lo que respecta a la importancia sanitaria de la presencia de *Aeromonas* en los alimentos, Fricker y Tompsett (1989) opinan que el hecho de que se aislen cepas de *Aeromonas* con propiedades citotóxicas a partir de los mismos implica que éstos son fuentes potenciales de infección alimentaria “sensu lato”. En esta misma línea, Majeed y McRae (1991), sugieren que los alimentos de origen animal juegan un papel significativo en la epidemiología de gastroenteritis asociada a *Aeromonas*. Rahim y col (1984) afirman que cepas de *Aeromonas* enterotoxigénicas aisladas de alimentos pueden ser responsables de brotes de diarreas. Varios autores han aislado a partir de distintos alimentos, entre los cuales se encuentra el pescado, cepas de *Aeromonas* capaces de exhibir las distintas propiedades de virulencia que anteriormente hemos enumerado (Boulanger y col, 1977; Eley y col, 1993; Knochel, 1989b; Kirov, 1993; Majeed y McRae, 1991; Olivier y col, 1981). Otros autores (Mateos y col, 1993), por el contrario, dudan de que la mera presencia de *A. hydrophila* en agua de bebida o alimentos, pueda suponer un riesgo serio para la salud.

El objetivo principal de este capítulo ha sido el estudio de los factores de virulencia asociados a distintas cepas de *Aeromonas* que se obtienen como resultado de su actividad metabólica y posterior liberación al medio en el que se encuentran (proteasas, hemolisinas, citotoxinas y enterotoxinas) y que son conocidos como productos extracelulares. Para ello se han seleccionado una serie de cepas aisladas de pescado de agua dulce (capítulo II), así como distintas temperaturas de incubación con el fin de evaluar su influencia sobre la producción de dichas propiedades de virulencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de *Aeromonas*.

En el estudio de los factores de virulencia asociados al género *Aeromonas* se emplearon las diecisiete cepas de origen piscícola, identificadas y caracterizadas del modo descrito en el capítulo II, y una de origen clínico, que se detallan en la tabla III.2.

Tabla III.2. Cepas incluidas en el estudio de los factores de virulencia.

Cepa	Especie	Tipo de pescado	Muestra
16	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	intestino
21	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	⁽²⁾ cav. abdominal 3 ⁽¹⁾
29	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	cav. abdominal 9
77	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	⁽³⁾ tej. muscular 9
92	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	tej. muscular 12
154	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	piel 3
156	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	tej. muscular 6
157	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	piel 9
167	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	cav. abdominal 3
169	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	cav. abdominal 6
176	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	piel 9
181	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	piel 9
186	<i>A. hydrophila</i>	Trucha común	cav. abdominal 15
271	<i>A. hydrophila</i>	Trucha arco iris	piel 15
510	<i>A. veronii sobria</i>	Lucio	cav. abdominal 6
579	<i>A. veronii sobria</i>	Lucio	cav. abdominal 6
546	<i>A. veronii sobria</i>	Lucio	cav. abdominal 3
⁽⁴⁾ HL2	<i>A. hydrophila</i>		heces

⁽¹⁾ día de almacenamiento en que fueron aisladas; ⁽²⁾ cav., cavidad; ⁽³⁾ tej., tejido; muscular; ⁽⁴⁾ cepa suministrada por el equipo del Hospital Clínico de Ponferrada (León).

Estas cepas tenían las siguientes características en común: producción de áreas de aclaramiento (hemólisis) en medio sólido suplementado al 5% con sangre de oveja (excepto la cepa 579, que solamente producía zonas de hemólisis); crecimiento a 37°C en 24 h (excepto la 546); producción de Lisina-descarboxilasa y reacción del Voges-Proskauer positiva.

Obtención de productos extracelulares.

Para la obtención de los productos extracelulares (PEC) se empleó la técnica descrita por Inamura y col (1984) que conlleva su recogida en discos de celofán depositados sobre placas de medio de cultivo sólido según se describe a continuación:

1. Los discos de celofán (British Cellophan Company, film type 400P), previamente esterilizados en autoclave, fueron colocados asépticamente sobre la superficie de placas de TSA (Oxoid).
2. A continuación, se depositaron 150 µl de un cultivo de 18 horas de la cepa de *Aeromonas* correspondiente, sobre la superficie del disco de celofán, que fueron repartidos homogéneamente con ayuda de un asa acodada de vidrio.
3. Las placas así sembradas se incubaron, en posición invertida, en las distintas condiciones de tiempo y temperatura que aparecen en la tabla III.3.
4. Tras el periodo de incubación correspondiente, las membranas de celofán se retiraron asépticamente y se colocaron en la cara interna de la tapa de la placa de Petri.
5. Acto seguido, a cada membrana se le añadía 1 ml de agua destilada estéril, enfriada hasta 0°C, en la cual se suspendían las células y los productos extracelulares mediante rascado de la superficie con una varilla de vidrio.
6. Posteriormente, esta mezcla era centrifugada a 14000 rpm durante 15 min a 4°C con el fin de obtener un sobrenadante libre de células microbianas.
7. Estos sobrenadantes (PEC) se recogieron asépticamente y almacenaron en alícuotas de 400 µl a -20°C, con el fin de realizar las determinaciones que se señalan a continuación.

Tabla III.3. Condiciones de obtención de los productos extracelulares.

Cepas	Temperatura incubación	Tiempo incubación
21, 29, 154, 167, 510, HL2 ⁽¹⁾	4°C	10 d
Todas	28°C	24 h
29, 154, 510, HL2	37°C	24 h

⁽¹⁾ para algunos ensayos electroforéticos también se obtuvieron los PEC a 4°C de las cepas 92,156,157,181 y 579.

Determinación del contenido en proteína de los productos extracelulares.

Se empleó la técnica de Bradford (1976) haciendo uso del Reactivo Concentrado para el Análisis de Proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH) y siguiendo las instrucciones del fabricante; para la elaboración de la curva patrón se utilizó albúmina de suero bovino (Sigma). Cada determinación fue hecha por duplicado y los resultados se expresaron en µg/ml.

Análisis electroforético de las proteínas de los productos extracelulares.

Preparación de los PEC para su análisis electroforético:

1. Con el fin de cargar la misma cantidad de proteína total en cada una de las calles de los geles, se tomaron 200 µl de cada PEC “crudo”, a cada uno de los cuales se añadieron 800 µl de acetona.
2. La mezcla se mantuvo en un congelador (-20°C) durante 10 min (pudiendo alargarse este periodo hasta un máximo de una hora) para facilitar la precipitación de las proteínas.
3. Para la obtención de un precipitado firme, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm, durante 5 ó 10 min, a 4°C.
4. Una vez desechado el sobrenadante, los precipitados se dispusieron en un evaporador a vacío para favorecer la eliminación de los restos de acetona.
5. Finalmente, a cada muestra se le añadió la cantidad necesaria del tampón de carga correspondiente, para obtener una concentración de proteína de 300 µg/ml.

En la elaboración de los geles de poliacrilamida, en la preparación de los tampones de carga y en la tinción de los mismos se procedió siguiendo la metodología expuesta por Hames y Rickwood (1990). Como marcadores de Peso Molecular se emplearon los siguientes: 94, 67, 43, 30, 20 y 14 Kd (Pharmacia). El cálculo de los pesos moleculares se hizo según Bernheimer y Avigad (1974).

Sistemas empleados para la separación de las proteínas mediante electroforesis:

1. Geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (1970): el tampón de carga contenía -mercaptoetanol; asimismo las muestras se hirvieron durante 5 min con el fin de desnaturalizar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas.
2. Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes: el tampón de carga no contenía -mercaptoetanol (Laemmli, 1970). Las muestras eran calentadas únicamente durante cinco segundos a 80°C antes de ser cargadas en los geles.

Los marcadores de peso molecular, en todos los casos, se trataron del mismo modo que las muestras de PEC analizadas por SDS-PAGE. Por tanto, el cálculo de los pesos moleculares de las bandas de proteínas obtenidas en los geles de poliacrilamida no desnaturalizantes es aproximado.

La separación electroforética fue llevada a cabo en el Mini-Protean II Dual Slab Gel (Bio-Rad), aplicando 150 V durante 2 horas mediante el uso de la fuente de alimentación Bio-Rad mod. 1000/500.

Para visualizar las bandas de proteínas se utilizó la tinción de plata, de acuerdo con la metodología descrita por Hames y Rickwood (1990).

Determinación de la actividad proteolítica de los productos extracelulares “en crudo”.

Se empleó un sustrato de naturaleza proteica, azocaseína (Sigma), siguiendo el protocolo descrito por Inamura y col (1984), si bien adoptando algunas modificaciones.

1. En primer lugar se preparó una solución de azocaseína (5 mg/ml) en tampón Tris 0.2 M, pH 8 (pH recomendado por Rivero y col, 1990). Esta solución se repartió en viales en cantidades de 0.25 ml, a los que se añadieron 0.2 ml de agua destilada y 50 µl de PEC “crudo”.
2. La mezcla fue incubada durante 20 min a 37°C, periodo tras el cual, y con el objeto de detener la reacción y precipitar la proteína no hidrolizada, se agregaron 1.75 ml de ácido tricloroacético al 5% por cada vial.
3. Posteriormente se procedió a la centrifugación (3000 rpm, durante 5 min y a 4°C) y recogida de sobrenadantes.
4. Finalmente, a cada ml de sobrenadante se le adicionó 1 ml de una solución de NaOH 0.5 M y se procedió a la lectura de la absorbancia a 440nm en un espectrofotómetro Kontron Uvikon mod. 810.

En todos los casos, una unidad de actividad proteolítica se definió como un aumento de la absorbancia o densidad óptica en 0.1 unidades a la mencionada longitud de onda.

Pruebas de inhibición de la actividad proteolítica.

Se realizaron, únicamente, con los extractos que fueron obtenidos a 28°C y utilizando la técnica de Inamura y col (1984) descrita anteriormente; en este caso se procedió a la sustitución del agua destilada a añadir a la solución de azocaseína y PEC “crudo” por una solución de inhibidor enzimático, ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA, BDH), empleado a dos concentraciones finales distintas: 4 mM y 20 mM.

Determinación de la actividad proteolítica específica (APE).

Con los datos de contenido proteico y actividad proteolítica, se hallaron los distintos valores de actividades específicas, es decir, el cociente entre la actividad proteolítica y la cantidad de proteína presente en cada PEC “crudo”. Se expresaron como unidades de actividad proteolítica por mg de proteína.

Detección y caracterización de la actividad proteolítica en geles de actividad o geles sustrato (Substrate-PAGE).

En la elaboración de estos geles de resolución se siguió el mismo procedimiento descrito para la preparación de los geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (véase antes) incorporándoles, además, caseína (Sigma) a una concentración final del 0.1% (Bertolini y Rohovec, 1992).

1. Una vez cargadas las muestras, se aplicaron 150V durante 90 minutos.
2. Transcurrido este periodo, los geles se incubaron durante una hora en una solución al 2.5% de Triton X-100 (Sigma), con el fin de eliminar el dodecil-sulfato de sodio (SDS, Sigma) presente en el gel.
3. Finalmente, los geles se introdujeron en una solución 0.1 M de tampón Glicina-NaOH pH 8.3 durante una hora a 37°C. Durante este periodo, las proteasas presentes en las distintas muestras hidrolizaron la caseína.
4. Para visualizar el efecto caseinolítico los geles se tiñeron de acuerdo con la metodología descrita por Hames y Rickwood (1990), empleando Coomassie blue G-250 (Sigma) disuelto

en ácido perclórico al 3.5%. La actividad proteolítica se advertía por la aparición de zonas de aclaramiento, es decir, áreas no teñidas por el colorante. La determinación del peso molecular se hizo según Bernheimer y Avigad (1974).

Titulación de la actividad hemolítica.

Se emplearon eritrocitos de cuatro especies de mamíferos con el fin de determinar cual era la especie más susceptible a la acción de las hemolisinas presentes en los productos extracelulares. Los eritrocitos utilizados fueron de conejo y de sangre humana (grupo O) en los análisis llevados a cabo con todos los PEC, y de oveja y de asno únicamente con los PEC obtenidos a 28°C. En todos los casos se partió de una suspensión al 2% de eritrocitos en tampón fosfato salino pH 7 (PBS, "Dulbecco A" tablets, Oxoid).

1. En una placa de microtítulo en la que se habían realizado diluciones de factor dos de los distintos PEC (a partir de una solución estandarizada de 300 µg de proteína/ml) en PBS (Oxoid) pH 7 (Inamura y col, 1984; Nzeako y col, 1991), se añadieron 100 µl de la suspensión de eritrocitos, obteniendo un volumen final en cada pocillo de 200 µl.
2. Como control positivo (50% de hemólisis) se emplearon 50 µl de una solución al 0.025% de SDS (Sigma), al que se le añadían 50 µl de PBS pH 7 (Oxoid) y 100 µl de la suspensión de eritrocitos. Como control negativo (ausencia de lisis) se utilizaron 100 µl de PBS pH 7 (Oxoid) y 100 µl de la suspensión de eritrocitos.
3. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas, periodo tras el cual se efectuaron, visualmente, las lecturas. Los resultados se expresaron como el inverso de la dilución más alta de PEC que producía un 50% de hemólisis.

Actividad hemolítica: análisis cuantitativo.

Se empleó la técnica descrita por Kodama y col en 1984 (con las modificaciones que se citan a continuación) con los PEC obtenidos a 28°C.

1. Se repartieron 1.9 ml de la suspensión de eritrocitos al 2% (de conejo y humanos - grupo O-) en tubos a los que posteriormente se añadieron 100 µl de cada PEC (una vez estandarizados a una concentración proteica de 300 µg /ml). Como control positivo se emplearon 2 ml de una solución de SDS al 0.1% y como control negativo 100 µl de PBS pH 7 (Oxoid) que fueron adicionados, también, a los tubos que contenían 1.9 ml de suspensión al 2% de eritrocitos.
2. Tras una incubación a 37°C durante 2 horas, se procedió a la centrifugación de los tubos a 3000 rpm, durante 5 min a 4°C.
3. Finalmente se efectuó la lectura de la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm en un espectrofotómetro Kontron Uvikon mod. 810, tomando como blanco el sobrenadante del control negativo.

La actividad hemolítica de cada PEC se expresó como el cociente entre su densidad óptica y la densidad óptica del control positivo.

Titulación de la actividad citotóxica sobre cultivo celular.

Se emplearon tres líneas celulares de distinto origen:

RTG-2 (de gónadas de trucha común -de naturaleza fibroblástica-) y **EPC** (de epiteloma papiloso de carpa -naturaleza epitelial-). Únicamente para el ensayo de los productos extracelulares resultantes de las incubaciones a 28°C.

VERO (de naturaleza fibroblástica). Los PEC que se analizaron fueron los de las cepas 21, 29, 154, 167, 510 y HL2, obtenidos a 4°C y a 28°C, y los obtenidos a 37°C.

Con las tres líneas celulares se procedió de la misma manera, una vez preparadas las monocapas en placas de 96 pocillos que contenían 100 µl de medio esencial de crecimiento celular ajustado a pH 7.2 (MEM, Gibco), suplementado con un 5% de suero fetal bovino inactivado, un 1% de una solución de aminoácidos no esenciales (Gibco) y antibióticos.

1. Se realizaron diluciones de factor 2 de los PEC (partiendo de una concentración proteica inicial de 300 µg/ml) de modo análogo al realizado en los ensayos de titulación de la actividad hemolítica.
2. A continuación, las placas se incubaron 18 horas, a 18°C en las líneas de origen piscícola, y a 37°C (en un incubador con CO₂ al 5%) en la línea Vero.
3. La visualización, a través de un microscopio invertido Diaphot-TMD (Nikon) de la desintegración y/o degeneración de la monocapa, la aparición de soluciones de continuidad en la misma, así como el redondeamiento y desprendimiento celular fueron interpretados como efectos citotóxicos (Esteve y col, 1995a).

Los resultados se expresaron como el inverso de la dilución más alta de PEC capaz de inducir efectos citopáticos en la monocapa.

Detección de la presencia de enterotoxina mediante la utilización de ratones lactantes.

En este ensayo se emplearon los productos extracelulares “crudos” obtenidos a distintas temperaturas de incubación, correspondientes a las cepas 21, 29, 154, 167, 510 y HL2. Se siguió la metodología descrita por Abeyta y col (1986) que, en esencia, se describe a continuación.

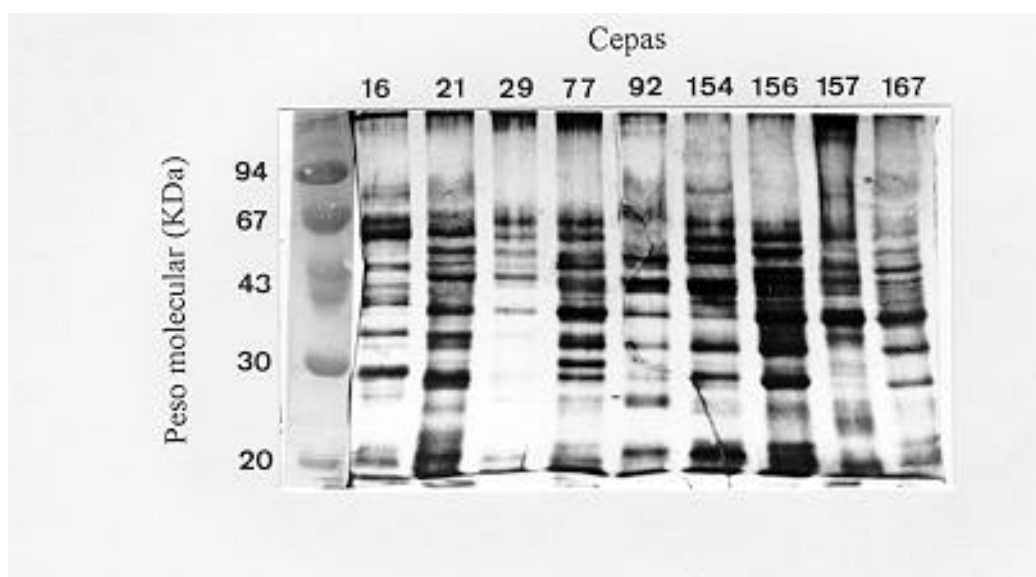
1. A ratones lactantes (3-5 días) se les administró, intragástricamente, 100 µl de PEC (teñido con violeta de etilo -Raymond Lab- al 0.1% p/v), manteniéndolos a 28°C durante tres horas en una estufa a 26°C y 70% de humedad relativa.
2. Posteriormente se sacrificaban, por inhalación de cloroformo, y se extraía el intestino, que era pesado y comparado con el peso del resto del cuerpo.
3. Paralelamente, también se observaba la aparición de colorante azul en papel de filtro dispuesto debajo de cada uno de los animales, indicador de diarrea de acuerdo con lo descrito por Burke y col (1981b).

Cada PEC era administrado a tres ratones. Para evaluar la actividad enterotoxigénica de cada PEC se calculaba la media de los valores obtenidos al dividir el peso del intestino por el peso del resto del cuerpo de cada uno de los ratones. En la puntuación global, también se tuvo en cuenta la presencia de colorante azul en el papel de filtro (Burke y col, 1981b)

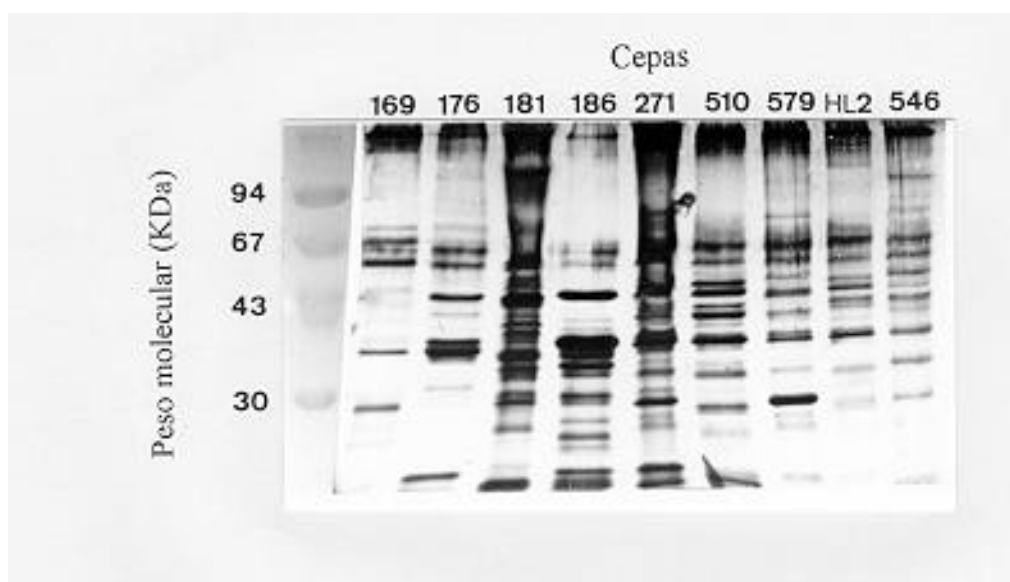
RESULTADOS

En las fotografías siguientes se presentan los perfiles proteicos de los PEC obtenidos a 28°C (fotografías 1, 2 y 3a) y a 4°C (fotografía 3b) empleando geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE -Laemmli, 1970-). Los de los PEC encontrados en los geles no desnaturalizantes se muestran en las fotografías 4, 5 y 6a (para los obtenidos a 28°C) y en la fotografía 6b (4°C).

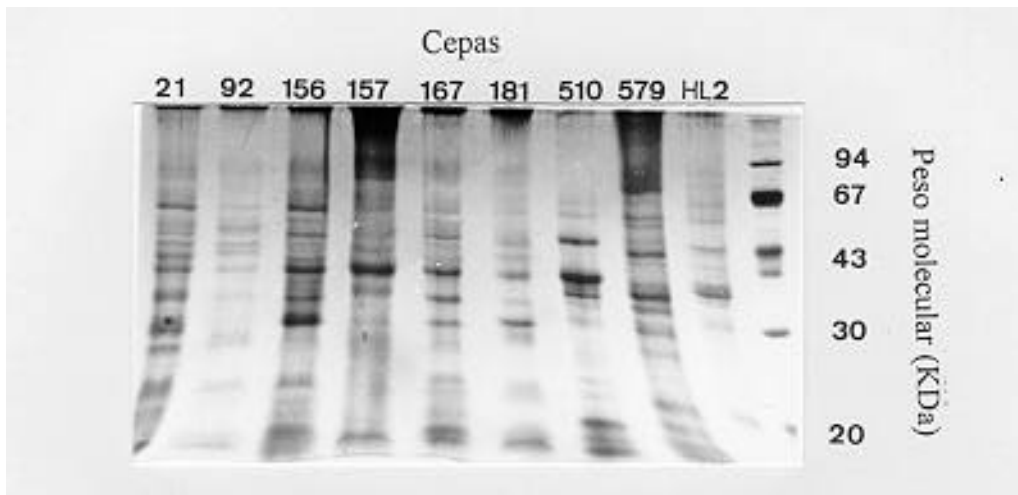
Fotografía 1. Perfiles proteicos, en SDS-PAGE, de PEC obtenidos a 28°C.



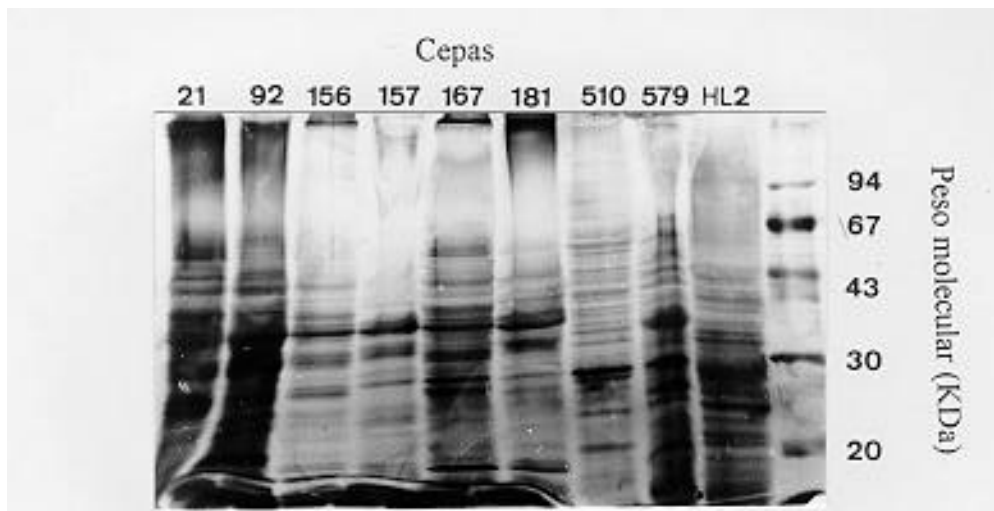
Fotografía 2. Perfiles proteicos, en SDS-PAGE, de PEC obtenidos a 28°C.



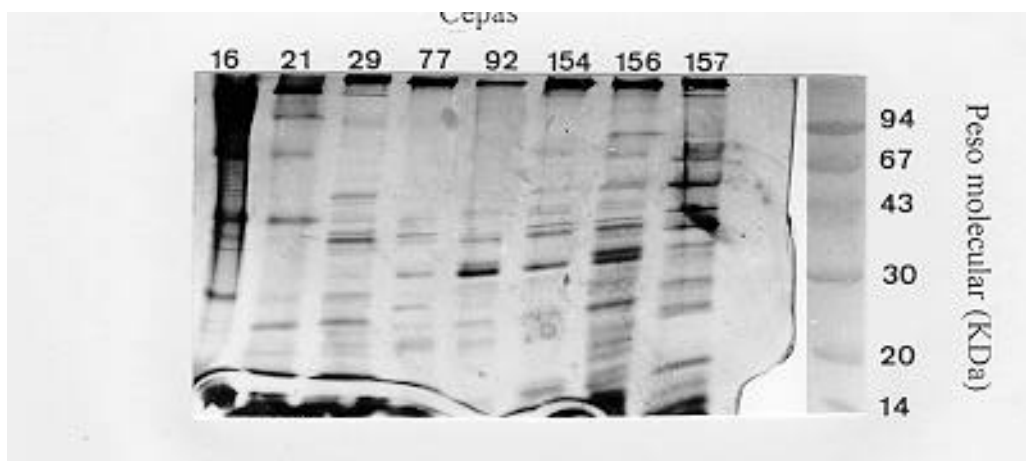
Fotografía 3a. Perfiles proteicos, en SDS-PAGE, de PEC obtenidos a 28°C.



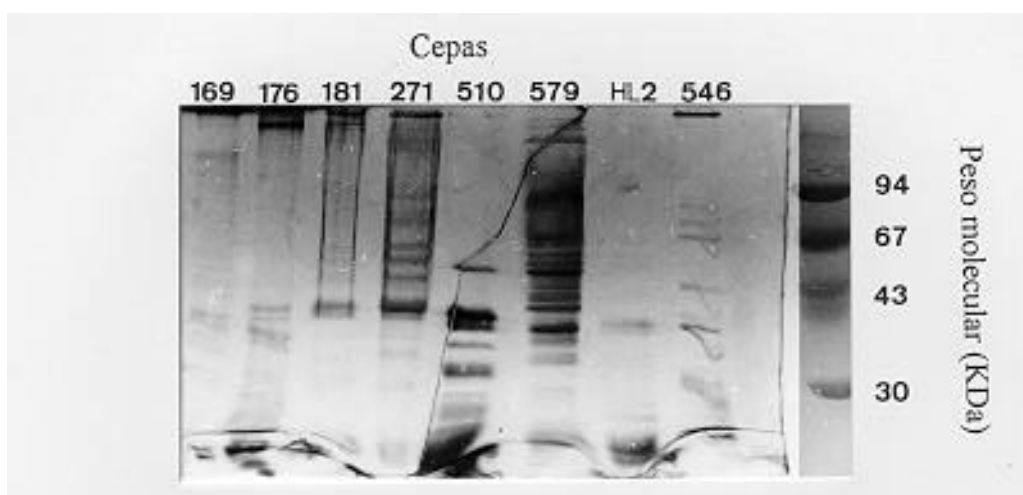
Fotografía 3b. Perfiles proteicos, en SDS-PAGE, de PEC obtenidos a 4°C.



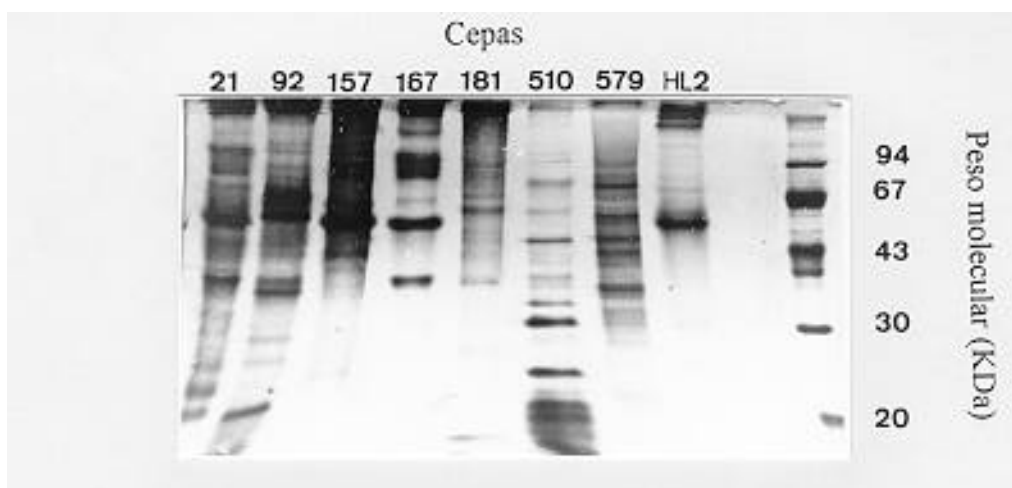
Fotografía 4. Perfiles proteicos, en geles no desnaturizantes, de PEC obtenidos a 28°C.



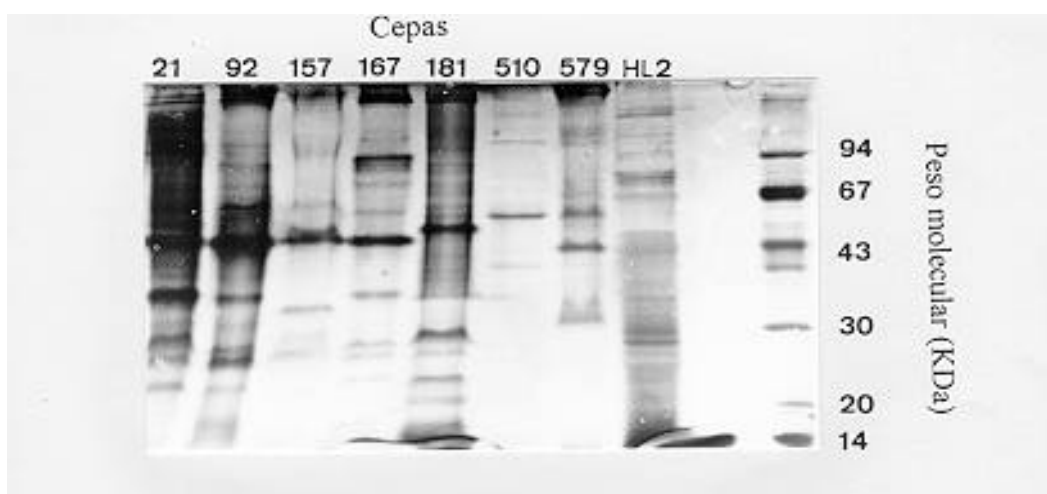
Fotografía 5. Perfiles proteicos, en geles no desnaturalizantes, de PEC obtenidos a 28°C.



Fotografía 6a. Perfiles proteicos, en geles no desnaturalizantes, de PEC obtenidos a 28°C.



Fotografía 6b. Perfiles proteicos, en geles no desnaturalizantes, de PEC obtenidos a 4°C.



En la tabla III.4 puede verse la actividad proteolítica que, sobre la azocaseína y durante 20 min, ejercían los PEC “crudos” obtenidos a distintas temperaturas.

Tabla III.4. Actividad proteolítica de los PEC obtenidos a distintas temperaturas.

Cepa	Temperatura de obtención		
	4°C	28°C	37°C
16	(1)	2.97	
21	4.38*	4.38	
29	5.26	3.81	0.69
77		4.98	
92		4.81	
154	3.11	2.00	0.17
156		4.25	
157		6.18	
167	3.62	4.40	
169		3.08	
176		5.17	
181		5.28	
186		5.17	
271		4.55	
510	0.86	5.88	5
579		2.35	
546		3.54	
HL2	2.56	5.43	5.5

*unidades de actividad proteolítica (UP)/ml; ⁽¹⁾ ausencia de anotación, ensayos no realizados.

En cuanto a los porcentajes de inhibición de la actividad proteolítica, debida al uso de EDTA a dos concentraciones diferentes, cabe decir que con ambas concentraciones del compuesto quelante empleado (4 mM y 20 mM) se consigue una similar inhibición de la actividad de los PEC sobre la azocaseína, es decir, del orden de un 34 ± 12 %. En la tabla III.5 aparecen desglosadas las actividades proteolíticas de los PEC obtenidos a 28°C conseguidas con cada una de las concentraciones de EDTA empleadas, así como los respectivos porcentajes de reducción de actividad proteolítica. Por su parte, las actividades proteolíticas específicas (AE, actividad proteolítica de un PEC por mg de proteína que contiene) de los PEC obtenidos a 4°C, 28°C y 37°C se muestran en la tabla III.6.

Tabla III.5. Estudios de inhibición de la actividad proteolítica.

Cepa	Actividad proteolítica		
	Ausencia de EDTA	EDTA 4 mM	EDTA 20 mM
16	2.97 ⁽¹⁾	1.84 ⁽¹⁾ (38*)	2.47 (17)
21	4.38	3.40 (23)	2.68 (39)
29	3.81	2.60 (32)	2.50 (35)
77	4.98	3.26 (35)	3.15 (37)
92	4.81	3.14 (35)	2.88 (40)
154	2.00	1.59 (20)	1.49 (25)
156	4.25	3.26 (24)	2.67 (37)
157	6.18	3.25 (48)	3.07 (50)
167	4.40	2.69 (39)	3.21 (27)
169	3.08	2.69 (13)	2.99 (3)
176	5.17	3.47 (33)	3.30 (36)
181	5.28	3.01 (43)	2.81 (47)
186	5.17	2.60 (50)	2.38 (54)
271	4.55	2.69 (41)	2.76 (40)
510	5.88	4.09 (31)	4.87 (17)
579	2.35	1.18 (50)	1.13 (52)
546	5.43	3.14 (12)	3.00 (15)
HL2	3.54	3.44 (37)	3.69 (32)

⁽¹⁾ unidades de actividad proteolítica (UP)/ml; * porcentaje de reducción de la actividad proteolítica de cada PEC con respecto a la actividad en las muestras no tratadas con EDTA.

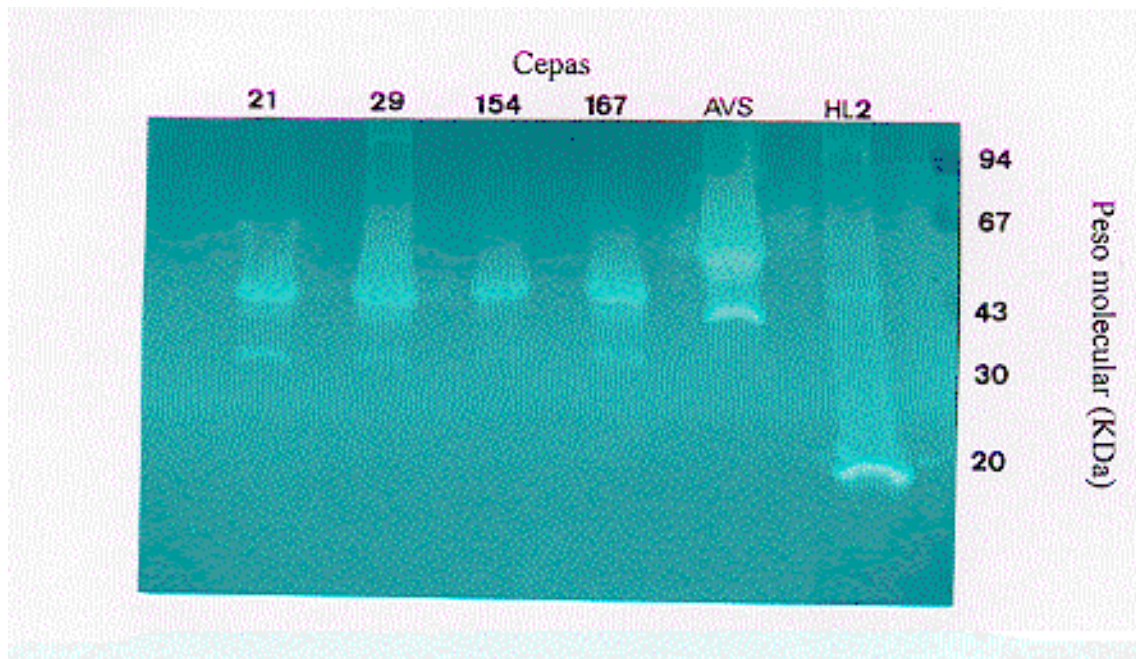
Tabla III.6. Actividades proteolíticas específicas de los PEC obtenidos a distintas temperaturas.

Cepa	Temperatura de obtención		
	4°C	28°C	37°C
16	⁽¹⁾	3.10	
21	11.39*	8.16	
29	8.67	7.74	1.46
77		7.80	
92		10.54	
154	6.13	3.7	0.09
156		9.02	
157		17.50	
167	7.83	5.20	
169		9.20	
176		10.76	
181		13.50	
186		12.27	
271		16.54	
510	15.35	5.72	6.69
579		7.85	
546		8.06	
HL2	2.42	5.65	4.00

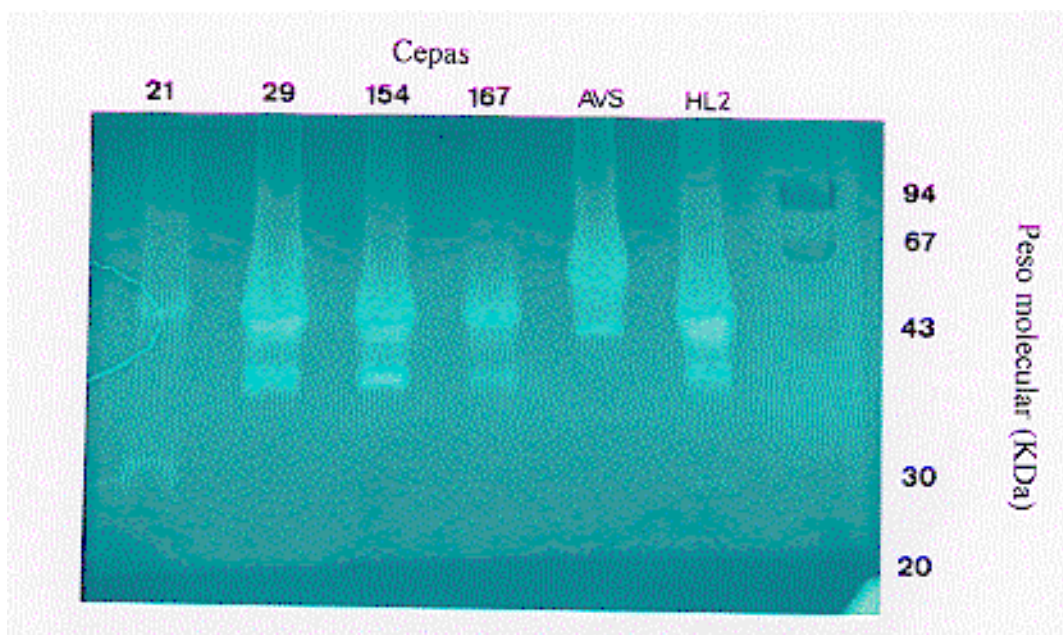
⁽¹⁾ no anotación, ensayos no realizados; * unidades de actividad proteolítica (UP)/mg de proteína.

Las fotografías 7 a 9 se realizaron a partir los geles correspondientes a la visualización y determinación de la actividad caseinolítica de los PEC obtenidos a 4°C (fotografía 7), a 28°C (fotografía 8) y a 37°C (fotografía 9). En las fotografías 10 y 11 se presenta la actividad caseinolítica de los PEC obtenidos de las 4 cepas que se estudiaron a las tres temperaturas de incubación (4, 28 y 37°C).

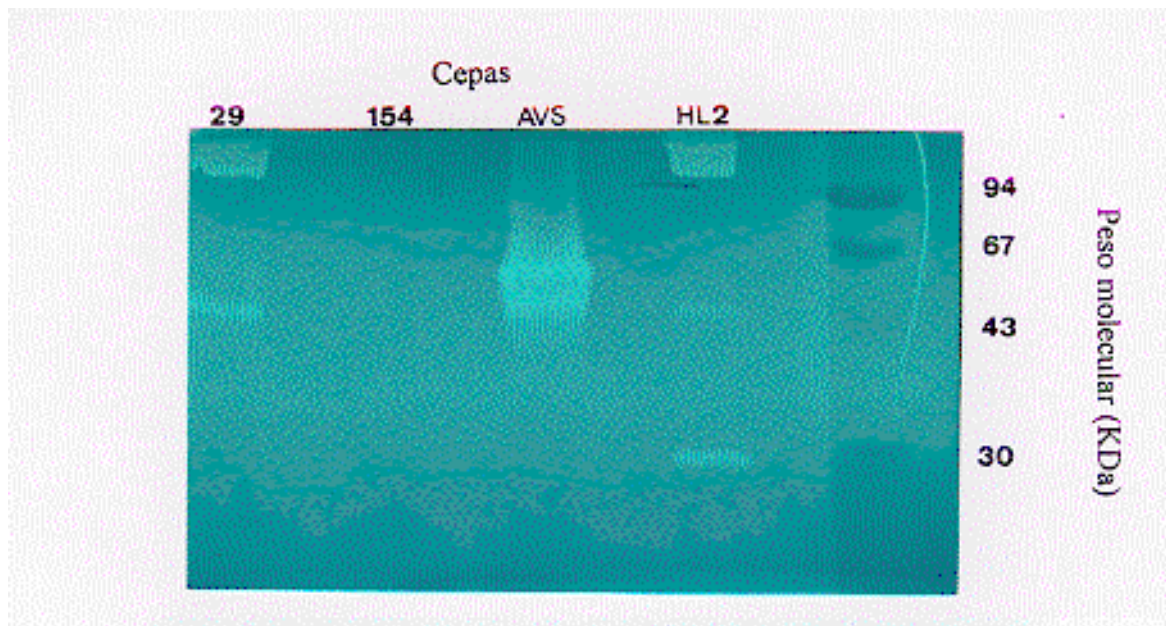
Fotografía 7. Bandas electroforéticas con actividad proteasa, obtenidas en geles sustrato, presentes en los productos extracelulares de Aeromonas a 4°C.



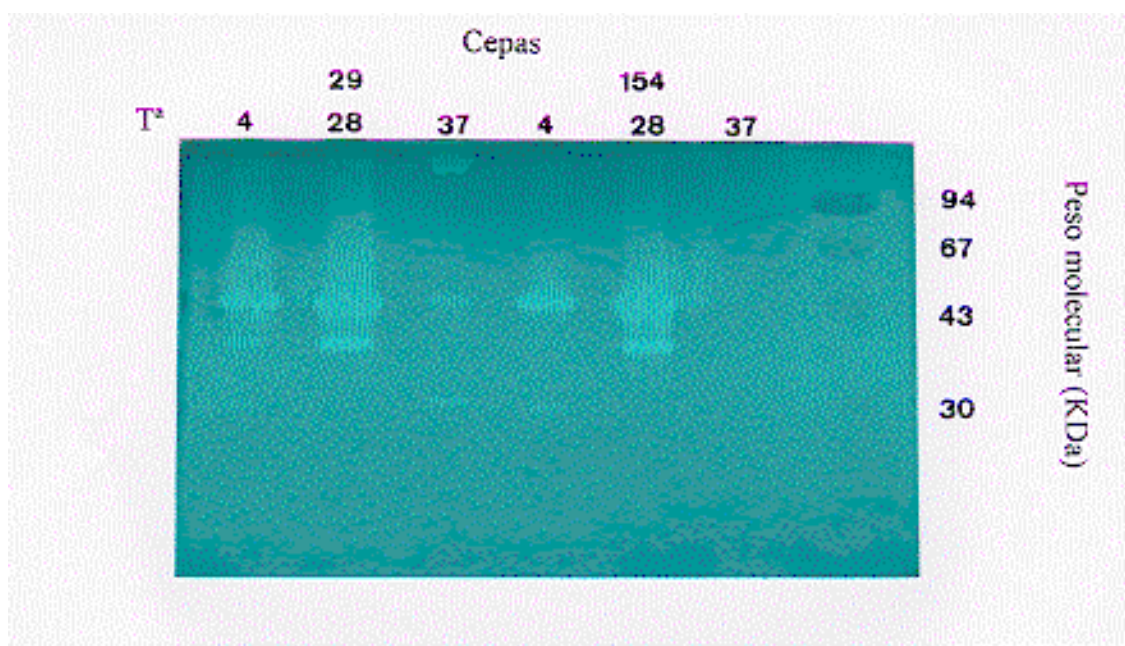
Fotografía 8. Bandas electroforéticas con actividad proteasa, obtenidas en geles sustrato, presentes en los productos extracelulares de Aeromonas a 28°C.



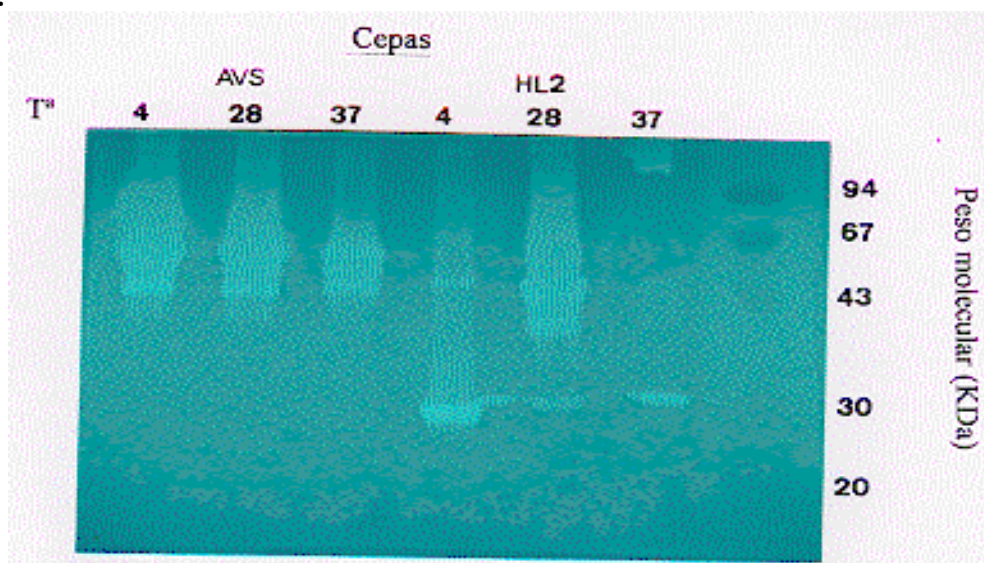
Fotografía 9. Bandas electroforéticas con actividad proteasa, obtenidas en geles sustrato, presentes en los productos extracelulares de *Aeromonas* a 37°C.



Fotografía 10. Bandas electroforéticas con actividad proteasa, obtenidas en geles sustrato, presentes en los productos extracelulares de las cepas 29 y 154, a 4, 28 y 37°C.



Fotografía 11. Bandas electroforéticas con actividad proteasa, obtenidas en geles sustrato, presentes en los productos extracelulares de las cepas 510 y HL2, a 4, 28 y 37°C.



En la tabla III.7 se muestra la actividad hemolítica (titulación) de los PEC obtenidos a 28°C sobre eritrocitos de distintas especies de animales mamíferos.

Tabla III.7. Titulación de la actividad hemolítica de PEC obtenidos a 28°C.

Cepa	Especies de mamíferos			
	Hombre	Conejo	Asno	Oveja
16	8 ⁽¹⁾	16	4	
21	2	8	4	
29	64	128	16	16
77				
92		32	4	
154	128	128	32	16
156	2	8	2	
157				
167		16	4	
169		32	16	2
176		2		
181				2
186		2		
271		4		
510	4			
579				
546	8	4	4	
HL2				

⁽¹⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir 50% de hemólisis.

En la tabla III.8 aparecen los títulos de actividad hemolítica de los PEC obtenidos a tres temperaturas distintas.

Tabla III.8. Titulación de la actividad hemolítica de los PEC obtenidos a 4, 28 y 37°C.

Cepas	Sangre Humana del Grupo O			Sangre de conejo		
	4°C	28°C	37°C	4°C	28°C	37°C
21	16	2	NR	16 ⁽¹⁾	8	NR ⁽²⁾
29	4	64	16		128	8
154	32	128	4	32	128	8
167	16		NR	32	16	NR
510	32	4		16		
HL2	16			32		

⁽¹⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir 50% de hemólisis; ⁽²⁾ NR, test no realizado.

En la tabla III.9 podemos apreciar la comparación de los resultados de la titulación y los del ensayo cuantitativo de la actividad hemolítica de los PEC obtenidos a 28°C.

Tabla III.9. Comparación de titulación y ensayo cuantitativo de la actividad hemolítica para productos extracelulares de Aeromonas.

Cepa	Eritrocitos de especie humana		Eritrocitos de conejo	
	Titulación	Cuantitativo*	Titulación	Cuantitativo*
16	8 ⁽¹⁾	0.88	16	1.20
21	2		8	1.10
29	64	1.39	128	1.24
77				
92			32	1.24
154	128	2.36	128	1.24
156	2		8	0.90
157				
167			16	1.01
169			32	1.23
176			2	
181				0.38
186			2	
271			4	0.57
510	4			
579				
546	8	1.06	4	0.95
HL2				

⁽¹⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir 50% de hemólisis; * cociente entre la absorbancia obtenida a partir de cada PEC y la absorbancia dada por la solución de SDS al 1% empleada como control positivo (0.651).

La actividad citotóxica de los productos extracelulares, obtenidos a 28°C, sobre las monocapas de los cultivos celulares aparece reflejada en la tabla III.10.

Tabla III.10. Actividad citotóxica de los PEC de Aeromonas sobre cultivos celulares.

Cepa	Línea celular		
	Vero	EPC	RTG-2
16	*	16	NR
21	16 ⁽¹⁾	8	NR
29	16	32	NR
77		16	16
92		16	
154	512	64	
156		16	
157		32	
167	128	8	
169		16	
176		32	128
181		8	
186		8	
271		16	
510	8	128	128
579		4	
546		8	64
³ HL2	64	32	16

⁽¹⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir efectos citopáticos en la monocapa (la cantidad de proteína mínima capaz de producir efectos citopáticos se obtiene al dividir 30 µg -cantidad de proteína presente en 100 µl de PEC- por los títulos citotóxicos que aparecen en esta tabla); *ausencia de anotación, ensayo no realizado.

La comparación de la actividad citotóxica (expresada como el inverso del título más alto que produce efectos citotóxicos) de los PEC obtenidos a distintas temperaturas sobre monocapas de la línea Vero se muestra en la tabla III.11.

Tabla III.11. Actividad citotóxica de los PEC de Aeromonas a distintas temperaturas.

Cepa	Temperatura de obtención de los PEC		
	4°C	28°C	37°C
21	32 ⁽¹⁾	16	NR *
29	32	16	128
154	256	512	16
167	128	128	NR
510	64	8	8
HL2	16	64	4

⁽¹⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir efectos citopáticos en la monocapa; * NR, no realizado.

En las tablas III.12 a III.14 aparecen agrupados, para cada cepa y temperatura, cuatro de los factores de virulencia estudiados: actividad proteolítica, actividad proteolítica específica, actividad hemolítica sobre eritrocitos de conejo y actividad citotóxica sobre monocapas de la línea celular Vero.

Tabla III.12. Agrupación de factores de virulencia para los PEC obtenidos a 28°C.

Cepa	Actividad proteolítica	Act. proteolítica específica	Actividad hemolítica (conejo)	Actividad citotóxica (Vero)
16	2.97 ⁽¹⁾	3.10 ⁽²⁾	16 ⁽³⁾	NR ⁽⁵⁾
21	4.38	7.38	8	16 ⁽⁴⁾
29	3.81	7.44	128	16
77	4.98	7.80		NR
92	4.81	10.54	32	NR
154	2.00	2.75	128	512
156	4.25	9.02	8	NR
157	6.18	17.50		NR
167	4.40	8.60	16	128
169	3.08	9.20	32	NR
176	5.17	10.76	2	NR
181	5.28	13.50		NR
186	5.17	12.27	2	NR
271	4.55	16.54	4	NR
510	5.88	11.11		8
579	2.35	7.85		NR
546	3.54	8.06	4	NR
HL2	5.43	9.31		64

⁽¹⁾ unidades de actividad proteolítica (UP)/ml; ⁽²⁾ unidades de actividad proteolítica (UP)/mg de proteína; ⁽³⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir un 50% de hemólisis; ⁽⁴⁾ inverso de la dilución más alta de PEC capaz de producir efectos citopáticos en la monocapa; ⁽⁵⁾ NR, no realizado.

Tabla III.13. Agrupación de factores de virulencia para los PEC obtenidos a 4°C.

Cepa	Actividad proteolítica	Act. proteolítica específica	Actividad hemolítica (conejo)	Actividad citotóxica (Vero)
21	4.38	11.39	16	32
29	5.26	8.67		32
154	3.11	6.13	32	256
167	3.62	7.83	32	128
510	0.86	15.35	32	64
HL2	2.56	2.42	4	16

Unidades empleadas como en la tabla III.12.

Tabla III.14. Agrupación de factores de virulencia para los PEC obtenidos a 37°C.

Cepa	Actividad proteolítica	Act. proteolítica específica	Actividad hemolítica (conejo)	Actividad citotóxica (Vero)
29	0.69	1.46	8	128
154	0.17	0.09	8	16
510	5.00	6.69		8
HL2	5.00	4.00		4

Unidades empleadas como en la tabla III.12.

La detección de la capacidad de acumular fluidos en el intestino de ratones lactantes se muestra en la tabla III.15.

Tabla III.15. Actividad enterotoxigénica determinada sobre ratones lactantes.

Cepa	Temperatura de obtención de los PEC		
	4°C	28°C	37°C
21	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁻ (¹)	NR (⁴)
29	Ent ⁻ (⁵)	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁻ (¹)
154	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁺ (²) (2 ⁽³⁾ -0.076*-)	Ent ⁻ (⁵)
167	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁻ (⁵)	NR
510	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁻ (⁵)
HL2	Ent ⁺ (²) (2 ⁽³⁾ -0.81*-)	Ent ⁻ (¹)	Ent ⁻ (¹)

(¹) Ent⁻, ausencia de actividad enterotoxigénica; (²) Ent⁺, enterotoxigénico según Burke y col (1981b); (³) puntuación de acuerdo con el esquema de Burke y col (1981b); (⁴) NR, no realizado; (⁵) el cociente peso intestino/peso resto del cuerpo era superior a 0.07 en dos de los tres ratones; * dos de los tres ratones utilizados tuvieron diarrea con colorante azul.

En la tabla III.16 se pueden observar, para cada temperatura de obtención del PEC, los porcentajes de cepas que mostraban los factores de virulencia estudiados.

Tabla III.16. Porcentajes de positividad de las cepas de Aeromonas en cada una de las propiedades de virulencia estudiadas.

Temperatura de obtención PEC	4°C	28°C	37°C
Número de cepas	6	6	4
Proteolíticas (AE>3)	83	100	50
Hemolíticas (título>2)	100	74	50
Hemolíticas (título>16)	83	42	25
Citotóxicas (título>2)	100	100	100
Citotóxicas (título>16)	100	83	50
Enterotoxigénicas (>0.07*)	33	33	50
Enterotoxigénicas (>0.08+)	17	17	0

*; este valor en dos de cada tres ratones utilizados. +, según el esquema de Burke y col (1981b).

DISCUSIÓN

La técnica de obtención de los PEC en un medio de cultivo sólido en cuya superficie se depositaba una lámina de celofán ha mostrado excelentes resultados en otros trabajos (Nzeako y col, 1991) al obtenerse productos extracelulares muy concentrados y no tener necesidad de emplear membranas de diálisis, lo cual podría suponer el consumo mucho tiempo y problemas de contaminación. Lorian (1989) afirma que, en el estudio de los factores de virulencia asociados a microorganismos, los resultados difieren según se empleen medios líquidos o sólidos, siendo estos últimos los que representan mejor las condiciones “in vivo”. En este sentido, Nzeako y col (1991) encontraron que los productos extracelulares de algunas cepas no mostraban actividad hemolítica cuando se obtenían a partir de caldo (suplementado con sangre), pero sí lo hacían cuando se empleaba la técnica de la membrana de celofán y placas de Agar Sangre. Por lo que respecta al uso de medios sólidos suplementados con substratos proteicos, los resultados son variables en cuanto a la influencia de aquéllos en la composición de los PEC producidos. Así McIntosh (comunicación personal) observa que el uso de medios sólidos suplementados no supone un marcado incremento en la actividad proteolítica específica, aunque sí en la actividad citotóxica. Santos y col (1996) aprecian, por su parte, que la producción de proteasas se ve influida por adición de compuestos proteicos al medio sólido. Con el objeto de reducir los factores de variación en la capacidad de las distintas cepas de producir factores de virulencia, en nuestro trabajo únicamente se ha empleado un medio mínimo sin suplementar.

En las fotografías 1 y 2 podemos apreciar los perfiles electroforéticos de las proteínas (obtenidos en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE) contenidas en los PEC obtenidos a 28°C, de varias cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii sobria*. Se puede observar que todas las cepas poseen una serie de bandas comunes (de 20, 40, 48 y 55 Kdaltons -Kd-), que podrían ser consideradas como características de género. Las bandas de 28 y 52 Kd son comunes a todas las cepas estudiadas con excepción de las de *A. hydrophila* de origen ambiental números 16 y 29 (no presentan las de 52 Kd y 28 Kd) y la de *A. hydrophila* de origen clínico HL2 (carecen de la de 28 Kd). En estos geles no se observaron bandas características y únicas de las cepas de *A. veronii sobria* (es decir, que no se aprecien en las cepas de *A. hydrophila*). De todas maneras, sí que se puede ver que los perfiles de dos de las tres cepas (510 y 579) pertenecientes a esta especie son semejantes entre sí (con excepción de una banda de 35 Kd, más gruesa en la primera), y distintos de los de la tercera (546).

Las fotografías 3a y 3b corresponden a la comparación de los perfiles proteicos, en geles desnaturizantes (SDS-PAGE), de los productos extracelulares de varias cepas (*A. hydrophila* y *A. veronii sobria*) obtenidos a 28°C y 4°C, respectivamente. A primera vista podemos apreciar que los perfiles proteicos a distintas temperaturas son ligeramente diferentes. Un gran número de bandas de alto peso molecular presentes en los geles de los PEC obtenidos a 28°C se pierden en los obtenidos a 4°C. La mayor actividad proteolítica específica mostrada a 4°C (tabla III.6) puede ayudar a explicar este hecho, ya que dicha actividad enzimática podría contribuir a la degradación de las proteínas de alto peso molecular y su conversión en proteínas de bajo peso molecular. En general, los perfiles

proteicos de los PEC obtenidos a 4°C se asemejan bastante entre sí, siendo mayor la diversidad en los perfiles de los PEC de esas mismas cepas obtenidos a 28°C.

Al comparar ambas fotografías (3a y 3b) se observa que la banda característica de 55Kd en los PEC obtenidos a 28°C (fotografía 3) no aparece en los perfiles de algunas de las cepas de *A. hydrophila* de origen ambiental y clínico (156, 157, 181 y HL2) que habían crecido a 4°C. Esta proteína bien podría no elaborarse a esta temperatura o bien podría haberse degradado debido a la acción de alguna de las proteasas producidas a esta temperatura. Esto mismo ocurre con la banda de 48 Kd, que no aparece a 4°C en las cepas *A. hydrophila* 156, 157, 167, 181 y HL2. Por lo que respecta a la banda de 40 Kd, ésta tan sólo desaparece en las cepas 510 (*A. veronii sobria*) y HL2 (*A. hydrophila* de origen clínico). Con excepción de las cepas 157 y HL2 (*A. hydrophila* de origen ambiental y de origen clínico, respectivamente), los PEC obtenidos a ambas temperaturas presentan la banda de 28 Kd.

En los geles desnaturalizantes correspondientes a 4°C (fotografía 3b) se observa, en general, que los perfiles proteicos de las cepas de *A. veronii sobria* son bastante similares entre sí, aunque en la cepa 579 algunas de las bandas comunes son sensiblemente más gruesas. Las ligeras diferencias apreciadas entre las dos cepas de *A. veronii sobria* consisten en que la cepa 579 posee una banda de 21 Kd, ausente en la 510, mientras que en esta última se observa una banda de 22 Kd que no aparece en la cepa 579.

En los geles representados por las fotografías 4 y 5, en los que se emplearon condiciones no desnaturalizantes, también se observan bandas comunes entre los PEC de las distintas cepas. Así, todas las cepas, a excepción de la de *A. hydrophila* de origen ambiental (156), y de las cepas de *A. veronii sobria* (510 y 546) presentan una banda de 38 Kd de peso molecular. Por otro lado, todas las cepas, con excepción de la HL2 (*A. hydrophila* de origen clínico) muestran una banda de 48 Kd. Esta última cepa posee una banda gruesa de 20Kd.

Las cepas de *A. hydrophila* de origen ambiental números 154 y 167 (las cepas que presentan un mayor número de propiedades de virulencia -tablas III.12 y III.15-) muestran unos perfiles muy parecidos entre sí, con bandas comunes de 28, 35 y 40 Kd.

Por su parte, las tres cepas de *A. veronii sobria* (510, 546 y 579) comparten una banda de 35 Kd. En el perfil proteico correspondiente a la cepa 510 se observan bandas gruesas de bajo peso molecular (fotografía 5), al igual que ocurría en los geles desnaturalizantes (fotografía 2).

Al considerar la influencia de la temperatura de obtención de los PEC (28°C frente a 4°C) en los perfiles presentados en los geles no desnaturalizantes (fotografías 6a y 6b respectivamente), el primer efecto observado -y contrario al manifestado en los geles desnaturalizantes (fotografías 3a y 3b)- es la escasa pérdida de bandas características de alto peso molecular en los PEC obtenidos a 4°C. De hecho, los patrones correspondientes a las cepas de *A. hydrophila* ambientales a 4°C (fotografía 6b) apenas se modifican con respecto a los de 28°C (fotografía 6a). Así, las cepas 21, 92, 157 y 167 mantienen las bandas de 38 y 48 Kd. Por lo que respecta a la cepa 181, también se mantienen las bandas de 40 y 50 Kd, así como una de 28 Kd, que también se puede ver en las otras cepas de *A. hydrophila* de origen ambiental.

La cepa de *A. hydrophila* de origen clínico (HL2) presenta perfiles proteicos visiblemente diferentes a ambas temperaturas. La banda gruesa de 48-50 Kd presente a 28°C (fotografía 6a) desaparece a 4°C, apareciendo, por el contrario, un gran número de bandas de

bajo peso molecular, posiblemente procedentes de la degradación de la proteína de 48-50 Kd (fotografía 6b).

Las cepas pertenecientes a la especie *A. veronii sobria* (510 y 579) también presentan un perfil proteico sensiblemente distinto a ambas temperaturas de obtención de los PEC (fotografías 6a y 6b). Así, mientras algunas bandas presentes a 28°C se mantienen a 4°C, la mayor parte de las que se observan correspondientes a la primera temperatura no se detectan a 4°C. Las bandas que sí permanecen son las de 33-35 y 46 Kd (cepa 571), la de 43 Kd (cepa 510) y la de 58 Kd (en ambos casos).

Como se puede apreciar en la tabla III.4, la actividad proteolítica “en crudo” de las distintas especies de *Aeromonas* a 28°C está comprendida entre 2 UP (unidades de actividad proteolítica) y 6.18 UP. Las cepas que presentan una mayor actividad proteasa a 28 y 37°C son la cepa *A. hydrophila* de origen clínico (HL2) y la 510 (aislada de lucio e identificada como *A. veronii sobria*), que presentan valores superiores a 5 UP (tabla III.4). Los productos extracelulares de las cepas de *A. hydrophila* de origen acuático obtenidos a 37°C no manifiestan, prácticamente, actividad proteolítica, en concordancia con los resultados obtenidos por Mateos y col (1993).

La adición de EDTA a las muestras supuso una disminución de la actividad proteasa “en crudo” de todas las muestras (tabla III.5) que fue del mismo orden con las dos concentraciones de PEC. Para la mayoría de las cepas (83%) esta reducción variaba entre un 20 y un 50% de la actividad proteolítica total de los PEC obtenidos a 28°C. El EDTA es un quelante de cationes divalentes presentes en el sitio activo de las metaloproteasas haciéndolas no funcionales. De este modo, y teniendo en cuenta que la metaloproteasa producida por un gran número de cepas pertenecientes al género *Aeromonas* es termoestable (Leung y Stevenson, 1988; Rivero y col, 1990), la presencia de esta proteasa podría suponer un riesgo para la salud (en caso de ser producida en grandes cantidades en el alimento) incluso aunque los alimentos fuesen a ser sometidos a tratamiento térmico.

Una mejor aproximación para la comparación de las actividades proteolíticas de las distintas cepas se obtiene a partir de la actividad específica (AE, actividad proteolítica por mg de proteína), por un lado, y del estudio de los geles de actividad, por otro.

En las AE de los PEC obtenidos a 28°C (tabla III.6) los valores van desde III.1 (*A. hydrophila* aislada de trucha común) hasta 17.5 (*A. hydrophila* del mismo origen), pero la mayor parte se encuentran comprendidos entre 8 y 12. En este caso, las cepas 510 (*A. veronii sobria*) y HL2 (*A. hydrophila* de origen clínico), muestran valores relativamente bajos, cercanos a 5.5. Las AE de los PEC obtenidos a 4°C son, generalmente, más altas que en los obtenidos a 28°C y, en éstos, mayores que en los de 37°C (tabla III.6). Es de destacar que la cepa 510 (*A. veronii sobria*) tenga un valor de AE a 4°C tan elevado con respecto al resto de las cepas. La cepa 154, por su parte, presenta una actividad proteolítica residual a 37°C. Este descenso de la AE a elevadas temperaturas puede estar relacionado con el carácter psicrotrofo (las bajas temperaturas son características de su hábitat natural) de las cepas aisladas de pescado almacenado a refrigeración, de modo que no estén bien adaptadas a temperaturas del orden de 37°C, pero sí a temperaturas de refrigeración. Teniendo en cuenta estos datos y la probable participación de las proteasas en la virulencia global de *Aeromonas* (Leung y

Stevenson, 1988; Wadström y Ljungh, 1988), el mayor poder infectivo radicaría en la cepa de origen clínico (HL2) y en la cepa adscrita a *A. veronii sobria* (510).

Si observamos los geles de actividad proteolítica de PEC obtenidos a distintas temperaturas (fotografías 7 a 9) podemos apreciar concordancia entre los valores de las AE (tabla III.6) y la intensidad de las bandas de proteolisis. En los patrones de actividad proteolítica de los PEC obtenidos a 28°C (fotografía 8), todas las cepas pertenecientes a la especie *A. hydrophila* mostraron una banda de aclaramiento de 48 Kd aproximadamente, así como otra de 38 Kd en cuatro de estas cepas, que coinciden con las bandas gruesas a las que hicimos referencia anteriormente al analizar los geles de poliacrilamida SDS no desnaturalizantes (fotografías 5 y 6a). La cepa de *A. veronii sobria* (calle 5, fotografía 8) produjo dos proteasas, una de 43 y otra de 58 Kd.

A 4°C (fotografía 7) los perfiles de proteasas son básicamente los mismos que a 28°C salvo los de las cepas en las calles 1 y 6 (*A. hydrophila* de origen ambiental y clínico respectivamente). La cepa de origen clínico (HL2) presentaba una zona de aclaramiento de 28 Kd, no presente a 28°C, mientras que la banda de 38 Kd era de menor intensidad que la obtenida a 28°C; una posible explicación a este fenómeno podría residir en el hecho de que la proteasa de 28 Kd pudiera proceder de la degradación parcial de proteasa de 38 Kd.

A 37°C (fotografía 9), como cabría esperar, no se aprecia actividad proteolítica en la calle correspondiente a la cepa 154 (*A. hydrophila* de origen ambiental). Por otro lado, la cepa de origen clínico (HL2, calle 4), así como una *A. hydrophila* de origen ambiental (29, calle 1) presentan una banda de actividad por encima de 93 Kd. La cepa de la especie *A. veronii sobria* (510, calle 3, fotografía 11) presenta los mismos perfiles que a 28 y 4°C.

Mateos y col (1993) aprecian, en geles sustrato, cinco patrones distintos de producción de proteasas, por parte de cepas de *A. hydrophila* de origen ambiental y clínico. Nosotros observamos un solo patrón de producción de proteasas por parte de *A. veronii sobria*, y tres diferentes por parte de las cepas de *A. hydrophila* sin tener en cuenta su origen. Finalmente cabe decir que la técnica electroforética empleada para visualizar las actividades caseinolíticas no proporciona una estimación adecuada del peso molecular tal y como apuntan Bertolini y Rohovec (1992), por lo que no se pueden establecer comparaciones definitivas con otros estudios en los que se trabajó con proteasas purificadas (Leung y Stevenson, 1988; Rivero y col, 1990).

Knochel (1989b) y Nzeako y col (1991) observaron que algunas cepas con actividad hemolítica en medio sólido suplementado con sangre de distintos orígenes no mostraban dicha actividad en los ensayos de titulación de sus PEC correspondientes. En los casos en que los que estos últimos eran positivos, la hemólisis en medio sólido siempre era del tipo α (áreas de aclaramiento alrededor de la zona de crecimiento). En nuestro trabajo hemos comprobado este efecto. En un principio, y para el estudio de los PEC, partimos de cepas que producían áreas de α -hemólisis en medio sólido conteniendo eritrocitos de oveja pero, posteriormente, no todos los productos extracelulares fueron capaces de exhibir dicha actividad en los ensayos de titulación, ni siquiera empleando eritrocitos más sensibles a la actividad de la α -hemolisina de *Aeromonas* tales como los de conejo. Con el fin de comprobar qué tipo de eritrocitos eran más susceptibles a la hemolisina o hemolisinas contenidas en los PEC, se estudiaron los obtenidos a partir de cuatro especies de mamíferos (tabla III.7). Tal y como se esperaba, en concordancia con los trabajos de Nzeako y col (1991), Daily y col (1981) y Kozaki y col

(1987), los eritrocitos de conejo fueron los más sensibles a dicha actividad hemolítica. Los menos sensibles resultaron ser los de oveja.

Algunos autores, como Kirov y col (1994), consideran que las hemolisinas de *Aeromonas* son factores de virulencia cuando alcanzan títulos hemolíticos iguales o mayores a 16. Si tenemos en cuenta únicamente los eritrocitos de conejo y los PEC a 28°C (tabla III.7), solamente un 33% de las cepas estudiadas cumplían este requisito, mostrando títulos entre 16 y 128, similares a los observados por Olivier y col (1981) y Paniagua y col (1990). Las cepas 29 y 154 (*A. hydrophila* de origen ambiental) manifestaron a 28°C los títulos hemolíticos más altos (128), similares a los obtenidos por Mateos y col (1993).

En cuanto a la comparación de la actividad hemolítica de los PEC obtenidos a distintas temperaturas (tabla III.8), cabe decir que todas las muestras, a excepción de la 510 a 37°C y la HL2 a 28 y 37°C, manifestaron dicha actividad sobre, al menos, uno de los dos tipos de eritrocitos empleados, hecho que es contrario a lo observado por Mateos y col (1993). Éstos, estudiando PEC obtenidos a 37°C de cepas de origen ambiental, no apreciaron actividad hemolítica sobre eritrocitos de oveja. Tal vez, esta ausencia de actividad hemolítica fue debida a la baja sensibilidad de estos eritrocitos a la acción de las hemolisinas producidas por *Aeromonas*. A 4°C todas las cepas estudiadas por nosotros, excepto la cepa 29, dieron títulos iguales o superiores a 16; a 37°C únicamente lo hizo la cepa 29 sobre eritrocitos humanos (tabla III.8). De estos resultados se desprende que la multiplicación en alimentos almacenados a temperaturas de refrigeración puede llevar aparejada la producción de elevadas cantidades de esta exotoxina. Cumberbatch y col (1979), estudiando cepas ambientales de *Aeromonas*, observaron que el 57% de las cepas eran hemolíticas a 28°C, mientras que a 37°C lo fueron un 69% de las mismas, valores cercanos a los de Majeed y col (1989), cuando estudiaban cepas aisladas de canales de cordero almacenadas a refrigeración; en ambos trabajos los títulos hemolíticos fueron superiores a los encontrados por nosotros. En este mismo sentido, Olivier y col (1981), trabajando con cepas de *A. hydrophila* aisladas de pescado observaron que, a 10 y 30°C, un 80 y un 72% de las mismas fueron hemolíticas. Knochel (1989b), estudiando la producción de hemolisinas por parte de cepas de *Aeromonas* aisladas de trucha arco iris, a 10°C y a 37°C obtuvo valores de actividad hemolítica superiores a 128 en un 52 y un 5% de las cepas respectivamente, muy por encima de los valores observados en nuestro estudio, siendo *A. hydrophila* la especie más frecuentemente encontrada. Pin y col (1995) detectaron títulos hemolíticos sobre eritrocitos de conejo de entre 2 y 256 en cepas aisladas en distintos alimentos. Por lo que respecta a la actividad de la cepa clínica (*A. hydrophila*, HL2), ésta se comportó de manera distinta a lo observado por otros autores que trabajaron con cepas de ese mismo origen (Knochel, 1989b; Mateos y col, 1993; Pin y col, 1995), ya que su actividad hemolítica desaparecía a 28 y 37°C.

En la tabla III.9 aparecen los valores obtenidos en el análisis cuantitativo de la actividad hemolítica y la titulación de dicha actividad por parte de los PEC obtenidos a 28°C sobre eritrocitos de conejo y de humano. El hecho más destacable es que todas las cepas, con excepción de la cepa 546 (con eritrocitos de humano) y de la 21 (con eritrocitos de conejo), que mostraban valores asociados de actividad hemolítica por encima de 1 en el análisis cuantitativo, presentaban, asimismo, valores, en los ensayos de titulación, iguales o superiores

a 16. Por el contrario, los valores por debajo de uno se correspondían con títulos de hemólisis menores de 16.

En lo que se refiere al estudio de la citotoxicidad (tabla III.10), se emplearon tres líneas celulares distintas, dos de ellas obtenidas a partir de peces de agua dulce (EPC y RTG-2) y de fácil manejo en laboratorio, y otra, obtenida a partir del riñón del mono verde africano (VERO), especialmente recomendada para el estudio de propiedades de virulencia asociadas a *Aeromonas* (Barer y col, 1986). De los resultados obtenidos con las tres líneas celulares empleadas en el estudio de los PEC obtenidos a 28°C, se aprecia que la línea VERO, de naturaleza fibroblástica, es la más sensible a la actividad citotóxica de las distintas cepas de *Aeromonas*, obteniéndose títulos de hasta 512. De hecho, no se aprecia una buena correlación entre los valores obtenidos con las líneas de origen piscícola y la línea VERO. Esteve y col (1995c) observaron efectos citopáticos en las líneas EPC y RTG-2 al inocular PEC de *A. hydrophila* y *A. jandaei*. Las cantidades mínimas de proteína (en los PEC de *A. hydrophila* estudiados por nosotros) que daban lugar a efectos citopáticos sobre la línea PEC estuvieron entre 0.44 y 3.7 µg, por debajo de los obtenidos por Esteve y col (1995c) en este tipo de cultivo celular.

Por lo general, se observa la misma influencia de la temperatura de obtención de los PEC sobre los títulos de actividad citotóxica en la línea VERO (tabla III.11) que sobre los títulos de actividad hemolítica en eritrocitos de conejo (tabla III.8), con la excepción de la cepa 29 a 4°C (*A. hydrophila*), así como la 510 (*A. veronii sobria*) y la HL2 (*A. hydrophila*) a 28 y 37°C. A 28°C obtuvimos títulos similares a los observados por Mateos y col (1993) cuando trabajaban con cepas ambientales. Por otro lado, contrariamente a lo observado por otros autores, como Cumberbatch y col (1979) y Mateos y col (1993), pero en concordancia con Eley y col (1993) (cepas aisladas a partir de alimentos), la actividad citotóxica de los PEC obtenidos a 37°C en nuestro trabajo no se mantenía en los mismos niveles que a 28°C, sino que disminuía considerablemente en las cepas 154, 510 y HL2 y aumentaba, de manera notoria, en la cepa 29 (tabla III.11). Por lo que se refiere a la titulación de la actividad citotóxica de los PEC obtenidos a 4°C, sus niveles no se vieron reducidos en gran medida, en comparación con los de 28°C (tabla III.11), al contrario que en los estudios de Eley y col (1993), en los que solamente un 79% de las cepas citotoxigénicas a 28 y 37°C lo fueron a 4°C.

Todas las cepas estudiadas por nosotros en distintas condiciones de incubación mostraron actividad citotóxica sobre la línea celular VERO, tal y como puede apreciarse en la tabla III.11, pero solamente la mitad de los PEC obtenidos a 37°C dieron lugar a títulos citotóxicos apreciables (>16). Kirov y col (1993), empleando esta misma línea celular, obtuvieron que el 65,5 % de las cepas del conjunto *A. hydrophila* y *A. veronii sobria* eran citotóxicas a 37°C. También Paniagua y col (1990), estudiando los PEC producidos a 28°C por cepas de origen piscícola, observaron este tipo de actividad exotóxica (títulos 4 a 128) en un 95% de las cepas de la especie de *A. hydrophila*. Por su parte, Burke y col (1981b), Kaper y col (1981) y Le Chevalier y col (1982), empleando la línea Y-1, encontraron que el 92%, el 71% y el 80%, respectivamente, de las cepas de *A. hydrophila* (cuyos productos extracelulares habían sido obtenidos a 37°C) poseían actividad citotóxica sobre la línea Y-1. Empleando la línea HeLa, Fricker y Tompsett (1989) obtuvieron que el 61% de las cepas

aisladas de pescado eran citotóxicas. Todos estos datos apuntan a que la línea celular VERO parece ser la más sensible a la acción de las citotoxinas producidas por *Aeromonas*.

En las tablas III.12 a III.14 no se aprecia relación cuantitativa entre la actividad proteolítica específica de los PEC de las distintas cepas y la actividad hemolítica que desarrollan. De igual modo, tampoco se observan relaciones cuantitativas entre las actividades proteolítica específica y la citotóxica en la línea VERO, por lo que el efecto citotóxico no podría ser atribuido únicamente a las proteasas presentes en los PEC, aunque sí parece relacionarse la intensidad de la actividad citotóxica sobre la línea Vero con los títulos hemolíticos en eritrocitos de conejo. Por lo general, los títulos de actividad citotóxica iguales o menores a 8 se corresponden con ausencia de actividad hemolítica en los ensayos de titulación (tablas III.12 a III.14). De hecho, Cumberbatch y col (1979) sugirieron que la citotoxicidad y la actividad hemolítica eran dos expresiones distintas de la misma molécula o que estaban sujetas al mismo control genético. Otros autores, como Abeyta y col (1986), Daily y col (1981) también han observado esta relación. Palumbo y col (1989), en un estudio realizado con *A. hydrophila*, vió que un 98% de las cepas hemolíticas eran citotóxicas en cultivo celular. Chakraborty y col (1984), por el contrario, afirman que los determinantes de ambas actividades se encuentran en segmentos diferentes del genoma. Burke y col (1981b), sugiriendo que ambos efectos estaban producidos por distintas moléculas, ya observaron que, en algunos casos, la actividad citotóxica no sólo disminuía tras tratamiento térmico, sino también tras el tratamiento con enzimas proteolíticas, mientras que la actividad hemolítica, en este último caso, no se veía afectada en ningún modo. Por otro lado, Barer y col (1986), contrariamente a lo observado por nosotros, afirmaban que cepas de *Aeromonas* que exhibían títulos de citotoxicidad en línea VERO menores de 96 no eran capaces de mostrar actividad hemolítica.

En la mayor parte de las cepas de *A. hydrophila* aisladas de pescado (21, 154 y 167), las actividades hemolítica y citotóxica pudieran ser debidas, principalmente, a la actividad de una misma molécula (probablemente una hemolisina), independientemente de la temperatura de obtención de los PEC. Esto mismo se podría aplicar a las cepas 29 (*A. hydrophila* de origen ambiental) a 37°C, y HL2 (*A. hydrophila* de origen clínico) y 510 (*A. veronii sobria*) a 28°C. En las cepas 29, HL2 y 510 a 4°C, y HL2 y 510 a 37°C, la actividad citotóxica pudiera residir, únicamente, en moléculas distintas de hemolisinas, tales como algunas proteasas. Cumberbatch y col (1979) propusieron que algunas enzimas proteolíticas termoestables secretadas por *Aeromonas* podrían participar en la aparición de efectos citotóxicos. La cepa 29 a 28°C, por su parte, posee una actividad hemolítica muy alta en comparación con su actividad citotóxica. La hemolisina producida por esta cepa a 28°C, por tanto, pudiera no tener un efecto citotóxico muy marcado en cultivo celular y ser distinta de las hemolisinas producidas por otras cepas en distintas condiciones. Brenden y Janda (1987) han propuesto la existencia de hemolisinas específicas de cada especie de *Aeromonas*. En cuanto a la influencia de la temperatura sobre la producción de diferentes hemolisinas por parte de una cepa determinada de *Aeromonas*, en la bibliografía examinada no hemos encontrado estudios que traten acerca de este aspecto.

Tal y como han venido recomendado diversos autores (Burke y col, 1981b; Kirov y col, 1993) para el estudio de la capacidad enterotoxigénica de las cepas de *Aeromonas*, en este

trabajo hemos empleado la prueba de acumulación de fluidos en el intestino de ratones lactantes. La interpretación de los resultados es diferente según tengamos en cuenta el esquema propuesto por Burke y col (1981b), o bien el postulado por Kirov y col (1994). Así, empleando el primero de ellos, en el que se tienen en cuenta el índice resultante del cociente entre el peso del intestino y el del resto del cuerpo (>0.08) y la presencia de colorante azul (debido a diarrea, en el papel de filtro dispuesto en el suelo de las bandejas en que se incubaron), sólo las cepas 154 a 28°C y la HL2 a 4°C, adscritas a la especie *A. hydrophila*, pueden ser consideradas enterotoxigénicas (tabla III.15). Utilizando el esquema de Kirov y col (1994), en el cual se propone considerar enterotoxigénicos los PEC si dos de los tres ratones utilizados por cada PEC presentan valores superiores a 0.07 en el cociente entre el peso de intestino y el peso del resto del cuerpo, el número de cepas consideradas enterotoxigénicas se amplía hasta seis. Lee y Bryant (1984) encuentran que más de un 90% de las cepas de *A. hydrophila* y *A. sobria*, así como un 10% de las de *A. caviae* son enterotoxigénicas. Boulanger y col (1977), Olivier y col (1981) y Knochel (1989a), en sus trabajos con pescado, obtienen que, respectivamente, un 80%, un 72% y un 40% de las cepas de *A. hydrophila* y un 100% (en los dos primeros casos) y un 88% (Knochel, 1989a) de las de *A. sobria*, son enterotoxigénicas en la prueba de los ratones lactantes (TRL, >0.08) cuando son incubados a 30°C. A temperaturas de refrigeración, Knochel (1989b) observa que solamente un 30% de las cepas de *A. hydrophila* (y ninguna de *A. sobria*) provocaron acúmulo de fluidos en TRL. En todos los casos, estos valores fueron muy superiores a los obtenidos por nosotros, que son del orden del 17% a 4 y 28°C (tabla III.16).

Teniendo en cuenta el primero de los criterios (Burke y col, 1981b), el hecho de que la cepa 154 a 28°C sea, además de enterotoxigénica, la que induce los títulos hemolíticos y citotóxicos más altos nos hace pensar que la molécula inductora de los tres efectos es una α -hemolisina, tal y como han propuesto distintos autores (Stelma y col, 1986), que observan que este compuesto provoca acumulación de fluidos en otros modelos animales tales como el asa ileal ligada de conejo. Cumberbatch y col (1979) afirman que esta acumulación de líquidos, provocada por los productos extracelulares de algunas cepas de la especie *A. hydrophila*, no se debe a la presencia de una enterotoxina citotónica, sino a una enterotoxina citotóxica. En esta misma línea, Burke y col (1983b) y Gracey y col (1982b) relacionan la actividad hemolítica con la enterotoxigenicidad, mientras que Daily y col (1981) y Johnson y Lior (1981), paralelamente, relacionan esta última con la citotoxicidad en cepas de *Aeromonas*. Singh y Sanyal (1992) encontraron que las cepas α -hemolíticas de *Aeromonas* causaban una acumulación de fluidos en modelos animales mayor que las cepas β -hemolíticas o las no hemolíticas, con independencia de la especie a la que pertenecieran. En nuestro caso, para la mayoría de las cepas, el hecho de que mostrasen actividades citotóxica y hemolítica no parece estar relacionado con su actividad enterotoxigénica, con la excepción de las cepas 154 (títulos altos de citotoxicidad y hemólisis) y HL2 (cepa citotóxica y hemolítica). En este sentido, ninguna cepa no hemolítica fue capaz de mostrar actividad enterotoxigénica.

La importancia relativa de la cepa 154 como posible agente de infección alimentaria disminuye considerablemente al considerar que, a 37°C, los valores de los tres parámetros relacionados con la virulencia (proteasas, hemolisinas y citotoxinas) están muy por debajo de los obtenidos a 28°C (tablas III.13 y III.14). Esta cepa, por el contrario, podría ser calificada

como enterotoxigénica a 37°C si empleásemos el esquema de Kirov y col (1994). Kirov y col (1994) consideran que una cepa de *Aeromonas* que lleva asociados, al menos, dos factores de virulencia (citotoxina, título hemolítico superior a 16 y producción de enterotoxina - TRL>0.07-), es patógena. De las cepas estudiadas en nuestro trabajo, todas poseen, al menos, dos de estos tres factores de virulencia a 4 y 28°C siendo las actividades citotóxica y hemolítica las más constantes (tabla III.16). Vadivelu y col (1991) apreciaron que, entre las cepas de origen ambiental, las actividades hemolítica y citotóxica eran más comunes que la actividad enterotoxigénica, al contrario que lo mostrado por las cepas de origen entérico. Kirov y col (1993) observaron que el 54% de las cepas que estudiaron a 37°C poseían, al menos, dos de estas características, siendo, el 50%, enterotoxigénicas en TRL. Por el contrario, Kirov y col (1986) observaron que solamente un 15% de las cepas que investigaron poseían esta última característica. De las cepas cuyos PEC han sido estudiados a 37°C, únicamente la cepa 29 (*A. hydrophila*) presenta valores importantes de actividad citotóxica y hemolítica (128 y 16 respectivamente), a pesar de no mostrar actividad enterotoxigénica. Esta cepa puede ser considerada como potencialmente patógena, ya que posee dos de los tres criterios de virulencia a los que Kirov y col (1994) hacen referencia. De todos modos es posible que, en todas las cepas y análogamente a lo observado por otros autores, la expresión de los factores de virulencia que pudieran llevar asociados en el momento de su aislamiento se haya visto atenuada durante los sucesivos subcultivos a los que fueron sometidas antes de iniciarse el estudio de su virulencia. Singh y Sanyal (1992) apreciaron que, tras sucesivos pases en laboratorio o durante períodos cortos de almacenamiento, muchas cepas dejaban de tener actividades enterotoxigénica y hemolítica. Esta atenuación podría revertirse realizando varios pases en animales de laboratorio tal y como han propuesto Le Chevalier y col (1982) y Ljungh y Wadström (1982-83). Kirov y col (1994) apuntan, en este mismo sentido, que todas las cepas de *Aeromonas* expresan, potencialmente, factores de virulencia tras pasar por hospedadores susceptibles.

Varios autores (Eley y col, 1993; Kirov y Brodribb, 1993; Majeed y McRae, 1991) han sugerido que uno de los riesgos asociados a la presencia de *Aeromonas* en alimentos es debido a la multiplicación de estos microorganismos durante el almacenamiento a refrigeración (son microorganismos claramente psicrotrofos), especialmente por abusos de temperatura accidentales que se pueden producir en el transcurso del mismo, al poder llevar aparejada la producción de exotoxinas tales como hemolisinas, citotoxinas y enterotoxinas. Kirov y Brodribb (1993) y Majeed y col (1989) han realizado ensayos de producción de exotoxinas a temperaturas de refrigeración en medios de cultivo convencionales y en alimentos. En ambos estudios se comprobó la producción de estos factores por parte de *Aeromonas*, tanto en los medios de cultivo como en los alimentos pero, en el estudio de Majeed y McRae (1991), se obtenían niveles mayores de exotoxinas en los medios de cultivo tradicionales empleados. Knochel (1989b) opina que la hemolisina, como toxina preformada en los alimentos refrigerados, no es un problema en aquéllos que van a ser posteriormente cocinados (al ser proteínas termolábiles), pero es resistente a concentraciones bajas de ácidos, por lo que un tratamiento de escabechado sin aplicación de calor no la inactivaría. Este mismo autor afirma, en este sentido, que en las gastroenteritis debidas a *Aeromonas* hay evidencias de infección, y no de intoxicación. De todos modos hay que destacar que, en nuestro trabajo, las cepas de *Aeromonas* crecían bien y producían factores de virulencia a 4°C. Por lo que respecta a la cepa 154, un abuso en la temperatura de almacenamiento del pescado podría

suponer un riesgo potencial para la salud, caso de que el alimento no fuese a recibir un tratamiento térmico posterior, si tenemos en cuenta su capacidad de producción de un factor de acumulación de fluidos a 28°C.

Como ya pudimos apreciar anteriormente, el patrón de producción de factores de virulencia por la cepa de origen clínico (HL2) es muy diferente al de las cepas de origen ambiental. Diversos autores han observado este mismo fenómeno. Así, Krovacek y col (1994), comparando cepas de origen marino y de origen clínico, pudieron apreciar que las primeras tenían asociadas las mismas propiedades de virulencia (actividades citotóxica, hemolítica y enterotoxigénica) que las segundas, pero las expresaban en menor medida. Knochel (1989b), contrariamente a lo observado por nosotros, aprecia que las cepas de origen clínico expresan las propiedades de virulencia con dificultad a temperaturas de refrigeración. A pesar de que Ljungh y Wadström (1982-83) afirman que las cepas de origen clínico son más hemolíticas, en nuestro caso la cepa de origen clínico empleada presentó títulos hemolíticos por debajo de los de las cepas de origen ambiental.

La cepa perteneciente a la especie *A. veronii sobria* (510) se muestra con una mayor aptitud virulenta a temperaturas de refrigeración que las cepas de la especie *A. hydrophila*, si bien de los estudios de Kirov y Brodribb (1993) y Krovacek y col (1991) se desprende que esta última especie posee una mayor capacidad de producir más cantidad de exotoxinas a temperatura de refrigeración que el resto de las especies virulentas de este género microbiano.

CAPÍTULO IV:

SUCESIONES MICROBIANAS A LO LARGO DEL ALMACENAMIENTO A REFRIGERACIÓN

INTRODUCCIÓN

La alteración del pescado mantenido en condiciones de refrigeración es debida, principalmente, a la acción microbiana (Castell y Anderson, 1948; Herbert y col, 1971; Shewan y Hobbs, 1957). La composición cualitativa de la flora microbiana presente en el pescado fresco tras su captura, y la de las asociaciones microbianas que se suceden a lo largo de su almacenamiento, especialmente de aquellos microorganismos involucrados en su alteración (ya sea entero, eviscerado o fileteado), han sido objeto de estudio, por parte de distintos investigadores, durante los últimos 40 años (Castell y Anderson, 1948; Gram y col, 1987, 1990; Lerke y col, 1963, 1967; Shewan y col, 1960a, 1960b; Shewan, 1971). Algunos de los aspectos que más han contribuido al desarrollo de estas investigaciones han sido los avances realizados en los sistemas de identificación y clasificación de microorganismos, así como el estudio de la capacidad alterante de especies microbianas asociadas al medio acuático (Castell y Greenough, 1957; Gram y col, 1990; Jorgensen y Huss, 1989).

Shewan (1971) afirmó que, en general, la flora inicial del pescado recién capturado está influenciada por el ambiente que le rodea y, por tanto, por la contaminación microbiana del agua en la que se desarrolla. Un dato que puede apoyar esta afirmación es que, en otros alimentos de origen acuático, como el cangrejo (*Cancer magister*), la flora microbiana presente en el momento de su captura es muy similar a la descrita en el pescado del mismo origen (Lee y Pfeiffer, 1975). Es importante tener en cuenta que tanto las bacterias Gram positivas, como las Gram negativas, se encuentran presentes de modo natural en el pescado recién capturado, si bien sus porcentajes sobre la flora total son variables. Así, en general, se asume que en los peces procedentes de áreas templadas (tanto de origen marino como continental) las bacterias Gram negativas representan un elevado porcentaje de la flora inicial total (Acuff y col, 1984; Horsley, 1973; Laycock y Regier, 1970; Liston, 1960; Shewan, 1971), mientras que en los pescados obtenidos en zonas tropicales el balance entre ambos grupos es más favorable a las Gram positivas (León Fajardo y Marth, 1979; Okafor y Nzeako, 1985). Es importante señalar que, en algunas ocasiones, también se han aislado otros microorganismos, tales como levaduras, a partir de productos de la pesca (Acuff y col, 1984; Kobatake y col, 1992).

Entre las bacterias Gram negativas presentes de modo natural y aisladas, de manera regular, a partir del pescado recién capturado destacan, principalmente, cuatro grandes grupos (Horsley, 1973; Lee y Harrison, 1968; Liston, 1960; Shewan, 1971). En primer lugar se encuentran las bacterias aerobias móviles y no fermentadoras de azúcares, grupo en el que están englobados los géneros *Pseudomonas* (Palleroni, 1984), *Shewanella* (McDonell y Colwell, 1985) y *Alcaligenes* (Kerstens y De Ley, 1984) y que, como se comentará más adelante, están muy relacionados con la alteración del pescado fresco. En segundo lugar, hay que mencionar a las bacterias aerobias inmóviles, grupo al que pertenecen los géneros

Acinetobacter (Juni, 1984) y *Moraxella* (Bovre, 1984), microorganismos que, anteriormente, eran clasificados dentro del género *Achromobacter* (Laycock y Regier, 1970). La mayor parte de las cepas aerobias inmóviles y oxidasa positivas aisladas a partir de pescado, que han sido identificadas tradicionalmente como *Moraxella*, actualmente tienden a incluirse dentro de la especie *Psychrobacter immobilis* (Gennari y col, 1989; Juni y Heym, 1986). El tercer grupo microbiano de interés es el de las bacterias anaerobias facultativas y oxidasa positivas, el cual incluye al género *Vibrio*, fundamentalmente asociado a pescado de origen marino (Baumann y col, 1984a), y al género *Aeromonas*, encontrado con mayor frecuencia en pescado de agua dulce (Popoff, 1984). Finalmente, es importante mencionar a las bacterias pertenecientes al grupo *Flavobacterium-Cytophaga*, que incluye a microorganismos móviles o inmóviles, incapaces de fermentar la glucosa y que producen pigmentos amarillos o anaranjados cuando crecen en medio sólido (Holmes y col, 1984).

Por lo que se refiere a las bacterias Gram positivas que se han encontrado habitualmente en pescado recién capturado, y que pueden formar parte de su flora natural, en su mayoría pertenecen al grupo de microorganismos corineformes (Horsley, 1973; Laycock y Regier, 1970), al género *Bacillus* (Claus y col, 1986), al género *Arthrobacter* (Keddie y col, 1986) y al grupo de las bacterias acidolácticas, principalmente al género *Carnobacterium* spp (Collins y col, 1987).

Además de la carga microbiana presente, de modo natural, en el pescado recién capturado (debida a la influencia del ambiente) hay que sumar la que el hombre aporta durante la manipulación y procesado previos al empleo de tratamientos tecnológicos tales como la aplicación de bajas temperaturas. Esta contaminación añadida está compuesta, principalmente, por microorganismos mesófilos (Shewan, 1970). Entre estos grupos microbianos destacan aquéllos cuyo hábitat primario es la piel y el tracto digestivo de los mamíferos, tales como algunos miembros de las familias *Micrococcaceae* (*Staphylococcus* y *Micrococcus*) y *Enterobacteriaceae* (Liston, 1980b; Petit, 1987). En algunos trabajos, como el de Wempe y Davidson (1992), se observan unos elevados e inusuales niveles de microorganismos, pertenecientes a los anteriores grupos de bacterias (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*), en filetes de pescado recién obtenidos y que, con gran probabilidad, son indicativos de manipulaciones llevadas a cabo de modo incorrecto.

La composición cuantitativa de la microflora, es decir, el porcentaje de cada grupo microbiano con respecto a la flora total, es muy variable en las muestras de piel de pescado. Como ejemplo, baste decir que los niveles de bacterias halófilas (*Vibrio* spp.) en pescado capturado en aguas continentales son mucho menores a los encontrados en peces de origen marino (Nedohula y Westhoff, 1993). En pescado de agua dulce, Horsley (1973) también observa muchas diferencias, relacionadas con la zona geográfica de captura, al estudiar salmónidos de distintos orígenes: encuentra que representantes del género *Aeromonas* son más frecuentes en los cursos altos de los ríos. Por otro lado, este mismo autor determinó que la flora de agallas y la de la piel del pescado de un mismo origen eran muy parecidas entre sí y con la del agua de cría. Trust (1975), por un lado, y Nedohula y Westhoff (1993), por otro, no encontraron muchas diferencias entre la microflora del pescado de vida libre y la del pescado cultivado, siendo menos variada en los últimos.

El análisis microbiológico de las agallas y del intestino es importante si tenemos en cuenta que ambas estructuras funcionales y anatómicas pueden actuar como fuente y reservorio de microorganismos que podrían participar en la alteración del pescado entero, tal y como apuntaron Herbert y col (1971) y Shewan (1971). Se ha de tener presente que durante la evisceración del pescado se puede producir la liberación de los microorganismos, contenidos en el tracto intestinal, a la parte comestible del pescado. De este modo, el estudio de la flora microbiana asociada a ambos órganos es importante por su posible influencia en la vida útil del pescado. En general, la flora predominante, en pescados de agua dulce y en ambos casos (agallas e intestino), está constituida por microorganismos Gram negativos. En muestras intestinales de salmónidos y otros peces de agua dulce, la mayor parte de los microorganismos aislados son Gram negativos, principalmente bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y a los géneros *Aeromonas* y *Acinetobacter* (Austin y Al Zarahni, 1988; Nedohula y Westhoff, 1993; Sugita, 1985; Trust y Sparrow, 1974; Westhoff, 1993), género, este último, cuyo papel en la alteración es limitado en comparación con otros grupos microbianos (Gram y col, 1987). En agallas se aíslan, principalmente, microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* (Trust, 1975).

A lo largo del almacenamiento a refrigeración del pescado, la composición cuantitativa de su flora microbiana se va modificando, de manera que aquellos grupos microbianos capaces de crecer a bajas temperaturas son seleccionados, al contrario que otros microorganismos que son incapaces de desarrollarse o que se multiplican muy lentamente a estas temperaturas (en general, se puede decir que los grupos de microorganismos alterantes pueden recibir una ventaja selectiva para su crecimiento debido a la manera en que el producto de la pesca es procesado o almacenado -Martin y col, 1978-). Como resultado de esta evolución se da lugar a las llamadas sucesiones microbianas, en cuyo desarrollo se constituyen las asociaciones microbianas alterantes. Estas asociaciones están compuestas por microorganismos que actúan sobre la fracción no proteica del músculo, que contiene compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos y óxido de trimetilamina, dando lugar a malos olores característicos de alteración (ver capítulo I). En principio, también se podrían considerar alterantes a aquellos microorganismos que poseyeran actividad proteolítica, pero tienen muy poca importancia relativa en comparación con la acción sobre la fracción no proteica del músculo (Venugopal, 1990). En general, los patrones de alteración (signos de alteración y su presentación) que tienen lugar durante el almacenamiento a refrigeración de distintos tipos de pescado, así como los grupos microbianos que en ella intervienen, son muy similares entre sí, si bien se aprecian pequeñas diferencias, en función del origen del pescado, que se reflejan en los porcentajes de cada grupo microbiano sobre la flora total al final de la vida útil. En este sentido, Gillespie y McRae (1975) observaron patrones de alteración en pescado tropical muy semejantes a los descritos en pescado procedente de aguas templadas.

Como consecuencia de la existencia de un período de latencia, observado en algunos estudios, durante los primeros estadios del almacenamiento la composición cualitativa de las poblaciones microbianas apenas cambia (Acuff y col, 1984), pero a medida que avanza el almacenamiento, desaparecen determinados grupos microbianos y aumentan los porcentajes, respecto a la flora total, de los microorganismos cuyo crecimiento no se ve inhibido por acción de las bajas temperaturas. La mayor parte de los gérmenes que resisten estas condiciones son bacterias Gram negativas aerobias móviles (ya en 1964, Adams y col observaron que los niveles de *Pseudomonas*, con respecto a la flora total, se incrementaban a

medida que avanzaba el almacenamiento). También se aislan, aunque con menor frecuencia, y en proporciones decrecientes a lo largo del almacenamiento, bacterias Gram negativas aerobias inmóviles (Acuff y col, 1984), si bien en ocasiones manifiestan incrementos moderados (Gennari y Tomaselli, 1988).

Paralelamente, se produce la desaparición progresiva de algunos de los grupos microbianos a los que nos hemos referido anteriormente (Acuff y col, 1984; Gennari y Tomaselli, 1988; Gram y col, 1990; Wempe y Davidson, 1992). A medida que avanza el almacenamiento, la mayor parte de las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (mesófilas) ven inhibido o retardado su crecimiento por las bajas temperaturas y, por tanto, se van aislando en menores porcentajes. Esto mismo se puede decir de otros microorganismos, tales como la mayor parte de las bacterias Gram positivas (*Micrococcaceae* y *Bacillus*), en su mayoría mesófilos. Lo mismo se podría aplicar a las bacterias acidolácticas. En cuanto a los miembros del grupo *Flavobacterium-Cytophaga*, sus niveles se ven reducidos drásticamente durante los primeros días del almacenamiento a pesar de tratarse de microorganismos psicrotrofos (Lerke y col, 1963). Los microorganismos corineformes y las levaduras son aislados, únicamente, en los primeros estadios del almacenamiento (Acuff y col, 1984).

Como acabamos de mencionar, los microorganismos que participan en la alteración son aquéllos capaces de utilizar compuestos de bajo peso molecular, a partir de los cuales se originan malos olores característicos de la alteración del pescado (Pedrosa-Menabrito y Regenstein, 1988). La actividad proteolítica interviene poco en este proceso alterante, y sólo se manifiestan estos efectos cuando se alcanzan niveles de 10^8 ufc/g, momento en el que son evidentes otros signos de alteración (Herbert y Shewan, 1976). Entre los microorganismos alterantes destacan las bacterias aerobias móviles, principalmente *Shewanella putrefaciens* (Chai y col, 1968; Jorgensen y Huss, 1989), algunas especies pertenecientes al género *Pseudomonas* (Herbert, 1975) y, en menor medida, cepas del género *Aeromonas* (Jorgensen y Huss, 1989), pero no todos poseen la misma capacidad alterante (Adams y col, 1964; Herbert y Shewan, 1976; Shaw y Shewan, 1968). Además, se ha comprobado que sólo un pequeño porcentaje (entre un 10 y un 40%) de la flora que se desarrolla en el pescado durante el almacenamiento posee esta capacidad (Adams y col, 1964). Una vez establecida la alteración, momento en el cual el pescado es organolépticamente inaceptable, la presencia de microorganismos alterantes clásicos en el conjunto de la flora disminuye con respecto a las etapas inmediatamente anteriores (Adams y col, 1964).

El ejemplo característico de microorganismo alterante del pescado y productos de la pesca es *Shewanella putrefaciens* (anteriormente conocido como *Pseudomonas putrefaciens* -Castell y col, 1949- y como *Alteromonas putrefaciens* -Lee y col, 1968-) que es capaz de producir compuestos azufrados (H_2S , mercaptano de metilo y sulfuro de dimetilo a partir de aminoácidos sulfurados -Herbert y col, 1975-), de reducir el óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (TMA, Van Sprekens, 1977) y de hidrolizar compuestos proteicos (Castell y col, 1949). Castell y col, 1949 encontraron, igualmente, que si bien los representantes de esta especie no eran abundantes en pescado recién capturado, se multiplicaban rápidamente a bajas temperaturas y penetraban fácilmente la piel del pescado, colonizando el tejido muscular subyacente. Jorgensen y Huss (1989) lo consideran como el agente principal responsable de la alteración del pescado mantenido a temperaturas cercanas a $0^{\circ}C$, con independencia del origen del mismo.

Shaw y Shewan (1968) consideraron que algunas cepas de *Pseudomonas* (principalmente las no fluorescentes) eran los microorganismos alterantes más activos, ya que eran capaces de producir malos olores (no debidos a TMA) y algunas daban lugar a reblandecimiento del músculo a causa de su actividad proteolítica. Además, crecían a 5°C más rápidamente que otros microorganismos presentes en pescado, como *Moraxella* y *Flavobacterium*. Castell y Anderson (1948) afirmaron que, además, cada especie de *Pseudomonas* alterante daba lugar a una sucesión específica de malos olores. Así, los olores afrutados son sustituidos, a lo largo del almacenamiento, por olores a moho, amargos y amoniacaes, como resultado de la actividad de los microorganismos sobre los aminoácidos libres. Generalmente, las cepas pertenecientes a este género microbiano no dan lugar, en pescado, a la producción de H₂S y TMA (Gram y col, 1990).

Por lo que respecta a los microorganismos aerobios inmóviles, si bien se ha observado en distintos estudios que sus niveles se mantienen constantes o disminuyen levemente a lo largo del almacenamiento, no producen alteración detectable organoléptica o químicamente (Adams y col, 1964; Gennari y Tomaselli, 1988; Gillespie y McRae, 1975; Lee y Harrison, 1968; Lerke y col, 1963). Shewan y col (1960a) apreciaron que cepas de *Achromobacter* inducían pequeños cambios visibles en tejido muscular y ligeros malos olores. Otros autores han observado que cepas de *Moraxella* producen malos olores en extractos de pescado, a pesar de no dar lugar a H₂S (Gram y col, 1987), e incluso algunas transforman OTMA en TMA (Van Sprekens, 1977). Otro género de bacterias Gram negativas aerobias inmóviles, *Flavobacterium*, parece tener poca importancia como alterante del pescado (Castell y Mapplebeck, 1952).

Algunas cepas del género *Aeromonas* son capaces de producir olores anormales en pescado almacenado en hielo, así como H₂S y TMA (Gram y col, 1990). Gram y col (1990) implicaron a este género en la alteración específica de las agallas, en las que su color original cambia a verdoso y es debido a la hemólisis y a la producción de H₂S que da lugar a sulfomioglobina. Estos mismos autores (Gram y col, 1990) reconocen a este género como microorganismo alterante específico de pescado mantenido a temperatura ambiente. Por otra parte, algunas enterobacterias son capaces de desarrollar malos olores en extractos de pescado (Castell y Anderson, 1948). Además, junto a representantes del género *Aeromonas* pueden participar en la alteración anaerobia del pescado, al atacar monosacáridos, aminoácidos y OTMA, dando lugar a malos olores (Strøm y Larsen, 1979).

Kazanas (1968) observó que, dentro de las cepas aisladas de pescado de agua dulce, todos los géneros (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Corynebacterium*) a excepción de *Achromobacter*, tenían actividad proteolítica, si bien este fenómeno no tenga tanta importancia en la alteración del pescado como la transformación de compuestos de bajo peso molecular. Finalmente, cabe mencionar el aislamiento, en alimentos frescos de origen marino, de algunas levaduras psicrotrofas que presentaban actividad proteolítica (Kobatake y col, 1992).

El objetivo del trabajo comprendido en este capítulo ha sido el estudio, tanto de las asociaciones microbianas presentes en las muestras tomadas de los peces recién capturados, como de las relaciones existentes entre dichas asociaciones. También se ha analizado la influencia del manejo de los ejemplares sobre la composición cualitativa de la flora

microbiana de dichas muestras (presencia de microorganismos tales como *Staphylococcus* y enterobacteriáceas). Asimismo, se ha procedido al estudio de las sucesiones microbianas, es decir, la evolución de los patrones de las poblaciones microbianas a lo largo del almacenamiento a refrigeración del pescado, en las muestras de piel, superficie de la cavidad abdominal y tejido muscular, con el fin de establecer cuál o cuáles han sido las poblaciones microbianas predominantes en el curso del período de conservación, así como la composición de la flora microbiana en el momento de la alteración, en cada una de dichas muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas.

Las cepas aisladas de las placas empleadas para los recuentos de las floras aerobias viables mesófilas y psicrotrofa, tanto en los ejemplares recién capturados como durante el almacenamiento a refrigeración (véase capítulo I), tras su aislamiento y purificación, se sometieron a las pruebas microscópicas, bioquímicas y fisiológicas que se señalan a continuación.

Pruebas de identificación.

Pruebas microscópicas a partir de cultivos obtenidos en Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid) tras 18 horas de incubación:

1. Tinción por el método de Gram. Siguiendo la metodología descrita en Harrigan y McCance (1976) se examinó la coloración rosada (negativa) o azul púrpura (positiva).
2. Morfología microscópica. Diferenciación de formas cocoides, cocobacilares, bacilares y filamentosas, así como la presencia de esporos. Asimismo, también se ha anotado la presencia de formas de agrupamiento celular, tales como la formación de dímeros, cadenas, tétradas, racimos, estructuras en empalizada,... (Trüper y Kramer, 1981)

Pruebas bioquímicas y fisiológicas:

1. Actividad citocromo-c-oxidasa. Descrita con detalle en el capítulo I.
2. Actividad catalasa. Descrita con detalle en el capítulo II.
3. Oxidación-Fermentación de la glucosa. Véase capítulo II.
4. Movilidad. Descrita con detalle en el capítulo II.
5. Presencia de formas de resistencia. Resistencia a un tratamiento térmico a 80°C, durante diez minutos. Estas condiciones se aplicaron a tubos conteniendo un cultivo de 24 h de la cepa problema. Tras el tratamiento se procedió a la recuperación de los microorganismos resistentes en Agar Triptona de Soja (Oxoid). Las placas se incubaron durante 72 h, periodo tras el cual se examinaba la presencia de crecimiento en su superficie. Esta prueba únicamente se utilizó con las cepas de microorganismos Gram positivos y catalasa positivos.

Clasificación.

En función de los resultados de las pruebas anteriores, las cepas se agruparon en los siguientes taxones, señalados en el Manual de Bergey y en otras referencias:

1. **Gram negativos aerobios móviles:** microorganismos aerobios estrictos, catalasa y oxidasa positivos. En este grupo se incluyen, entre otros, los géneros *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes* y representantes del género *Flavobacterium* (Holmes y col, 1984; Kersters y De Ley, 1984; McDonell y Colwell, 1985; Palleroni, 1984).
2. **Gram negativos aerobios inmóviles:** bacilos y cocobacilos aerobios estrictos, oxidasa positivos, pero inmóviles. Incluye a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* (Bovre, 1984; Juni, 1984; Juni y Heym, 1986), sí como a representantes del género *Flavobacterium* (Holmes y col, 1984).
3. **Vibrionáceas:** bacilos y cocobacilos móviles Gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos. En este grupo están comprendidos los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (Baumann y Schubert, 1984). En el presente capítulo no se han tenido en cuenta las recientes modificaciones propuestas por distintos investigadores (McDonell y Colwell, 1985) para el realojamiento de los géneros tradicionalmente incluidos dentro de la familia *Vibrionaceae*.
4. **Enterobacteriáceas:** microorganismos Gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa negativos y catalasa positivos (Brenner, 1984). En este grupo se encuentran comprendidos géneros microbianos implicados en infecciones alimentarias “sensu stricto”, como *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, y otros géneros tales como *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, etc.
5. **Bacterias acidolácticas:** bacterias Gram positivas catalasa negativos, de morfología bacilar o cocoide. Incluye los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* y a las bacterias lácticas de morfología cocoide como *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (Collins y col, 1987; Collins y col, 1989; Kandler y Weiss, 1986; Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984).
6. **Micrococáceas:** cocos Gram positivos, catalasa positivos. Este grupo comprende los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Planococcus* (Schleifer, 1986).

Las cepas que no pudieron ser incluidas en dichos taxones, fueron adscritas a uno de los siguientes grupos:

1. **Bacilos Gram positivos no identificados:** catalasa positivos. Incluye formas esporógenas (*Bacillus* -Claus y col, 1986-), y no esporógenas (bacterias corineformes, *Arthrobacter*, *Brochotrix*).
2. **Bacilos Gram negativos no identificados:** anaerobios facultativos, oxidasa positivos e inmóviles.

RESULTADOS

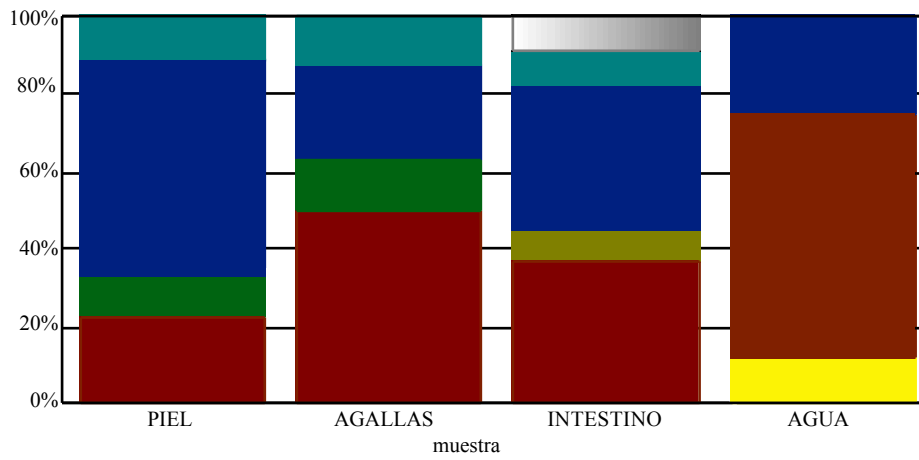
En las figuras IV.1 y IV.2 se presenta la distribución porcentual de los diferentes grupos taxonómicos en las muestras obtenidas de los ejemplares recién capturados (así como en el agua procedente de los lugares de obtención), para las floras mesófila y psicrotrofa, respectivamente.

La evolución de las asociaciones microbianas (distribución porcentual) durante el almacenamiento del pescado se presenta en las figuras IV.3 (piel, flora mesófila), IV.4 (piel, flora psicrotrofa), IV.5 (superficie de la cavidad abdominal, flora mesófila), IV.6 (superficie de la cavidad abdominal, flora psicrotrofa), IV.7 (tejido muscular, flora mesófila) y IV.8 (tejido muscular, flora psicrotrofa).

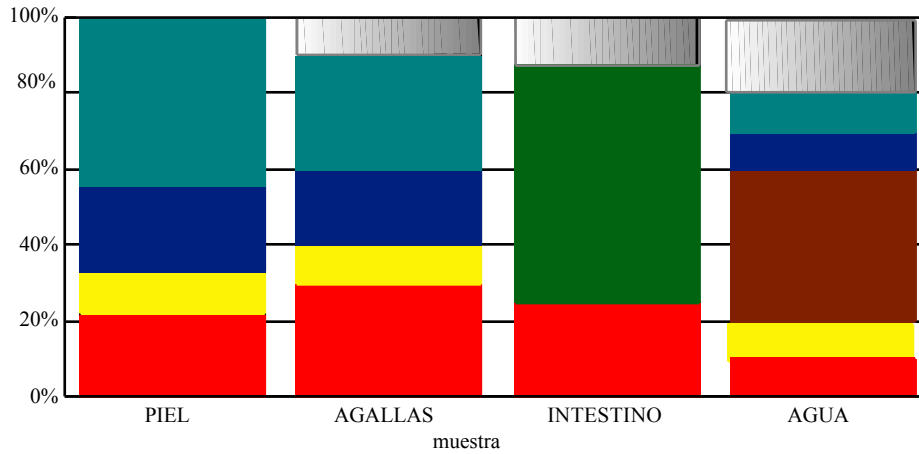
En cada figura se presentan gráficas distintas para cada especie de pescado (A, trucha común; B, trucha arco iris; C, lucio).

Figura IV.1. Composición de la flora mesófila en peces de agua dulce recién capturados.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio

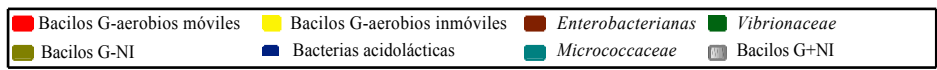
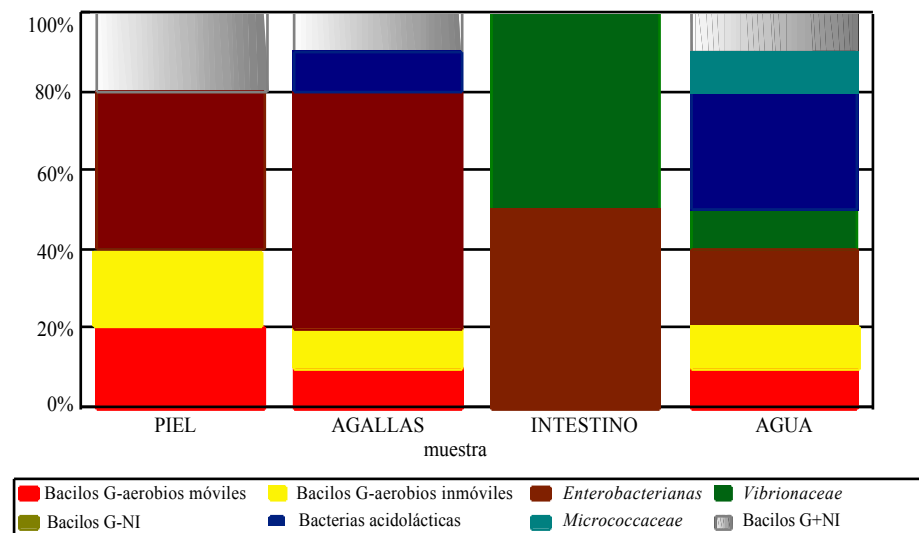
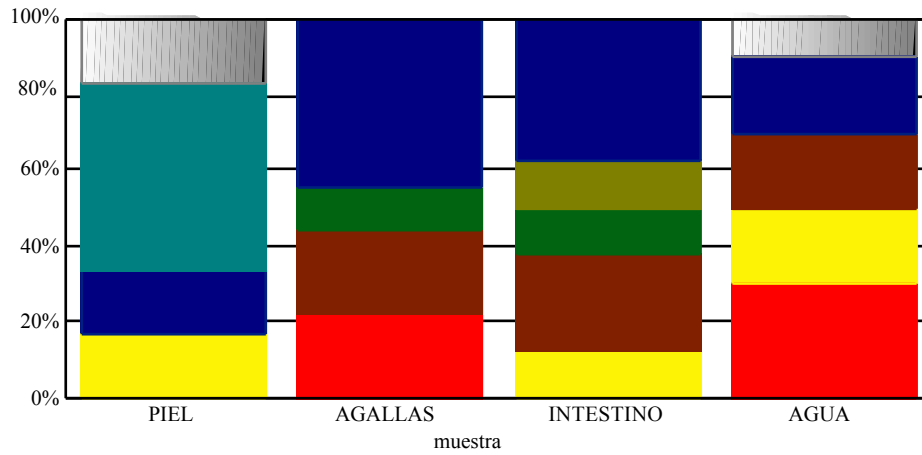
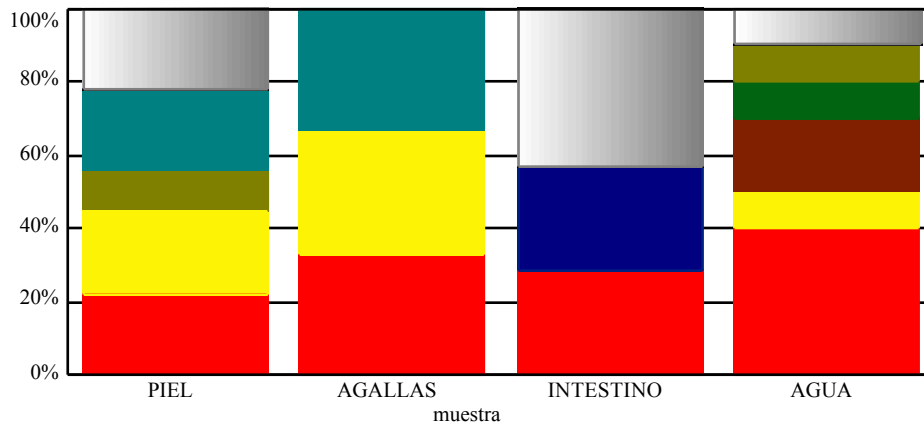


Figura IV.2. Composición de la flora psicrotrofa en peces de agua dulce recién capturados.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.

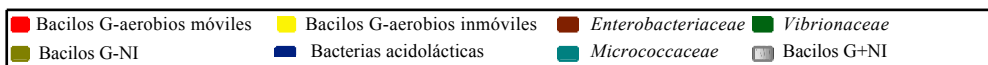
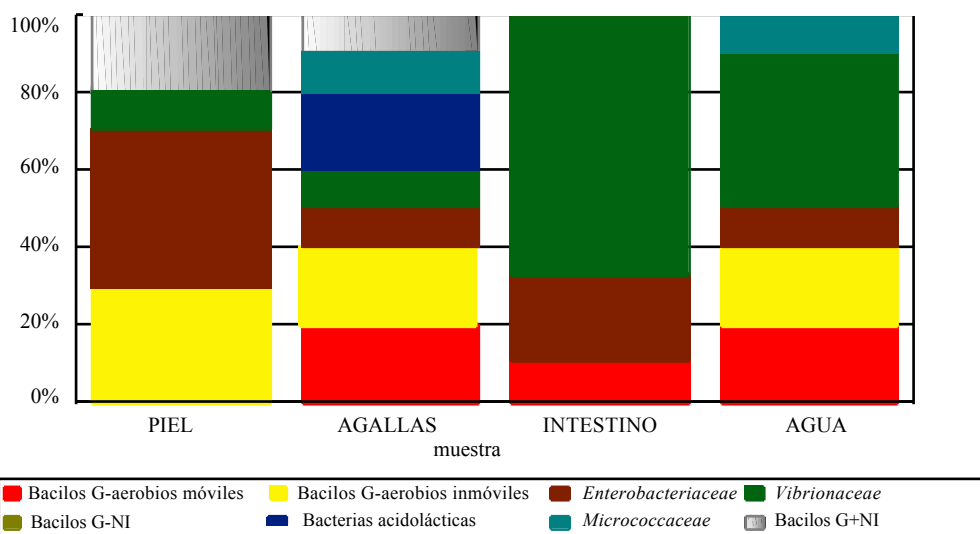
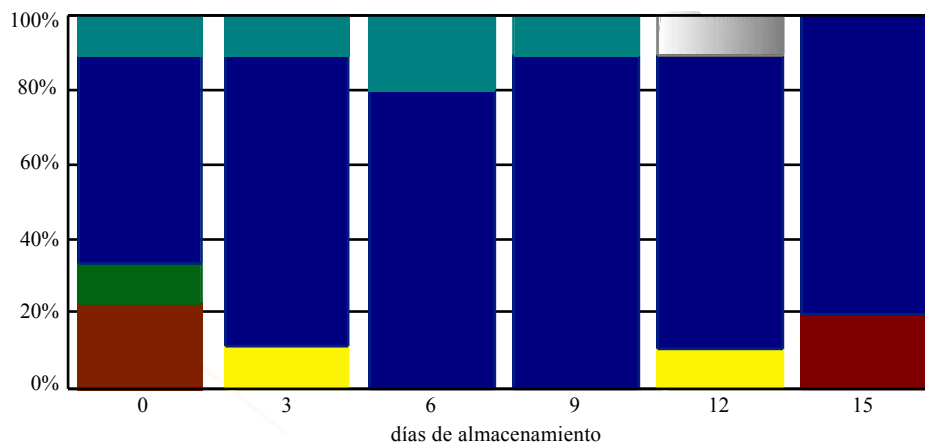
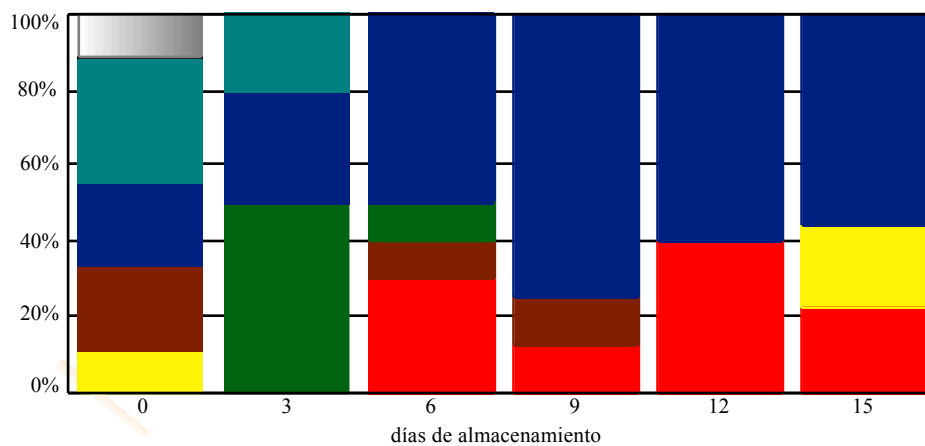


Figura IV.3. Sucesiones microbianas de la flora mesófila en la piel de peces de agua dulce almacenados a refrigeración.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.

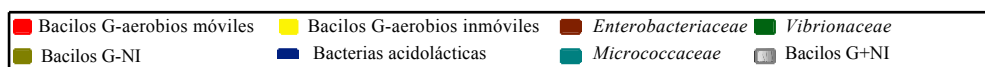
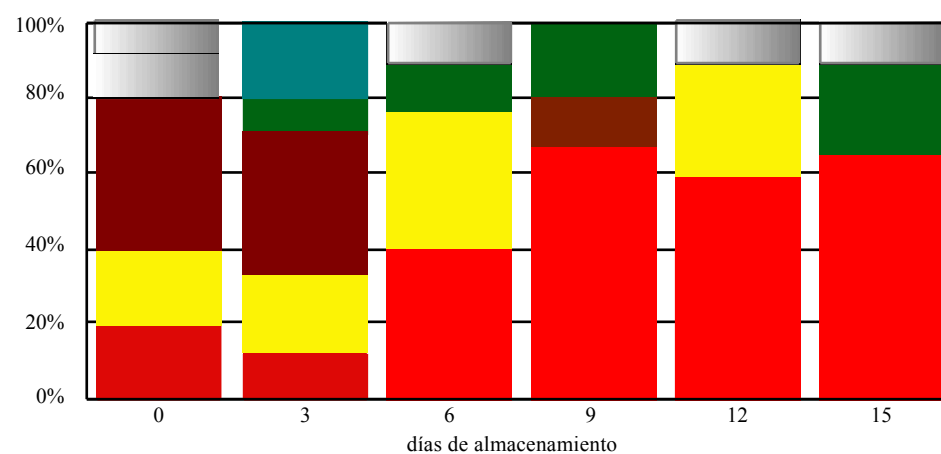
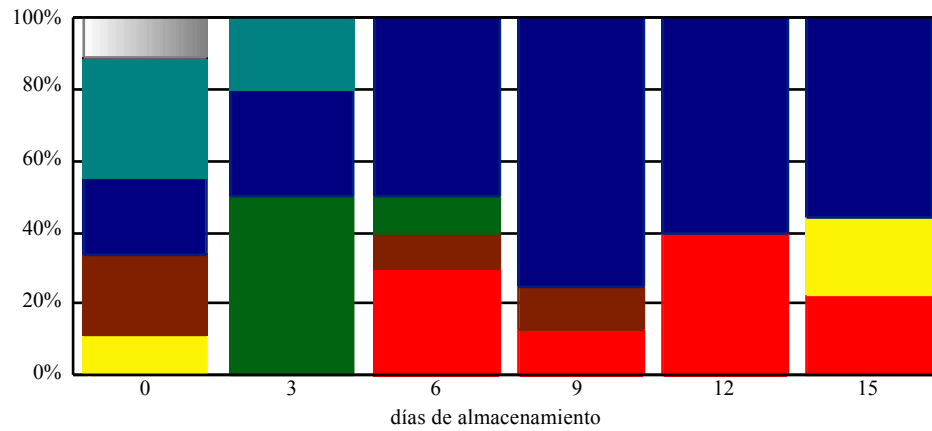
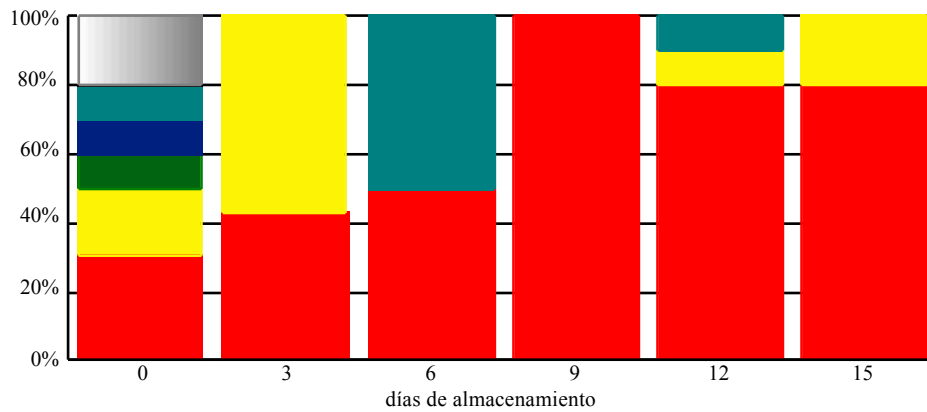


Figura IV.4. Sucesiones microbianas de la flora psicrotrofa en la piel de peces de agua dulce almacenados a refrigeración.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.

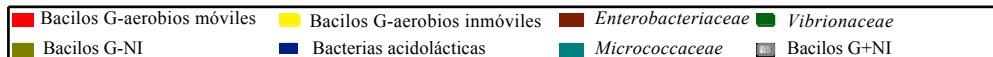
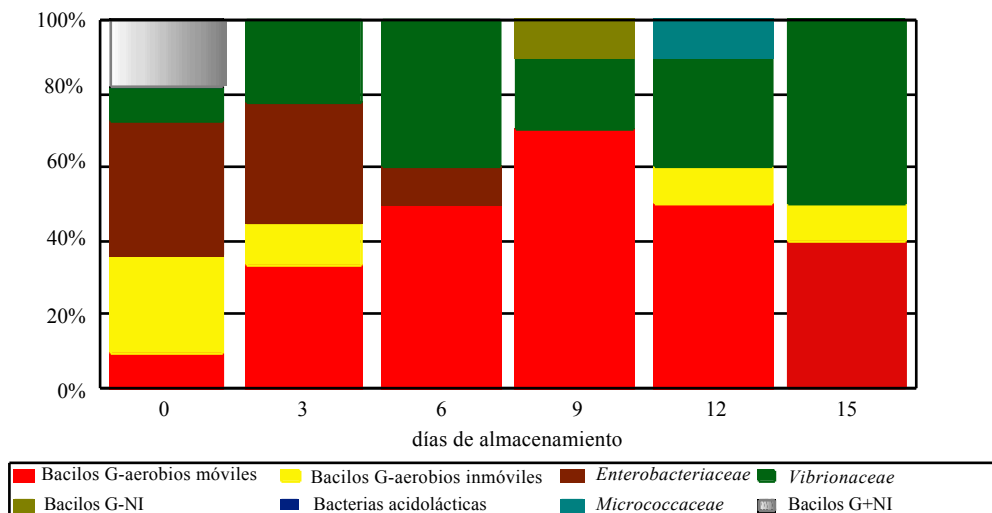
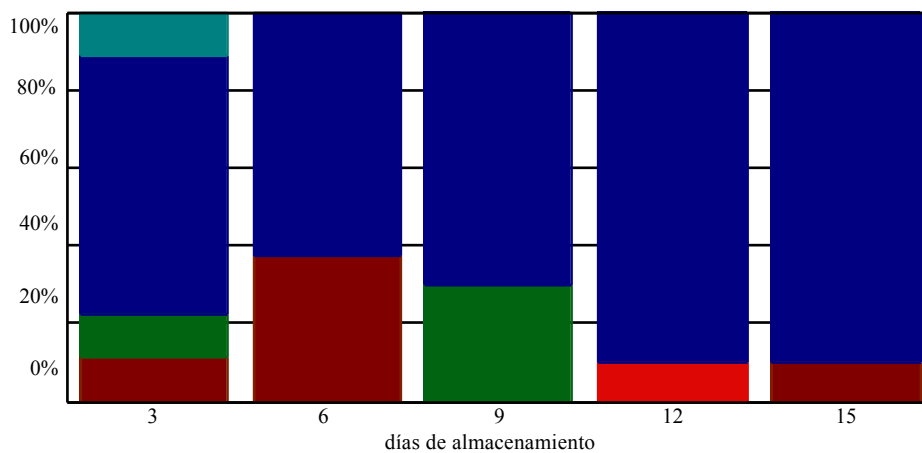
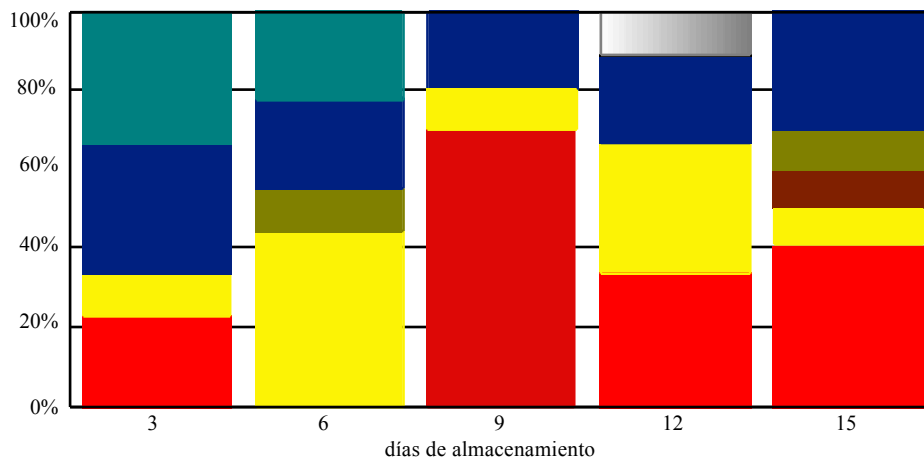


Figura IV.5. Sucesiones microbianas de la flora mesófila en la cavidad abdominal de peces de agua dulce almacenados a refrigeración.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.

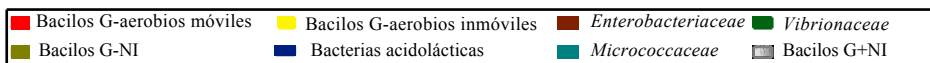
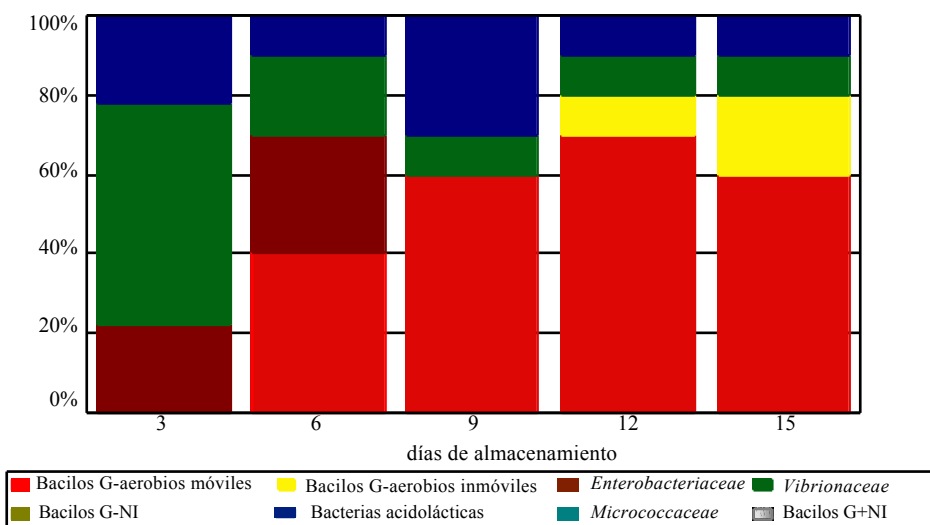
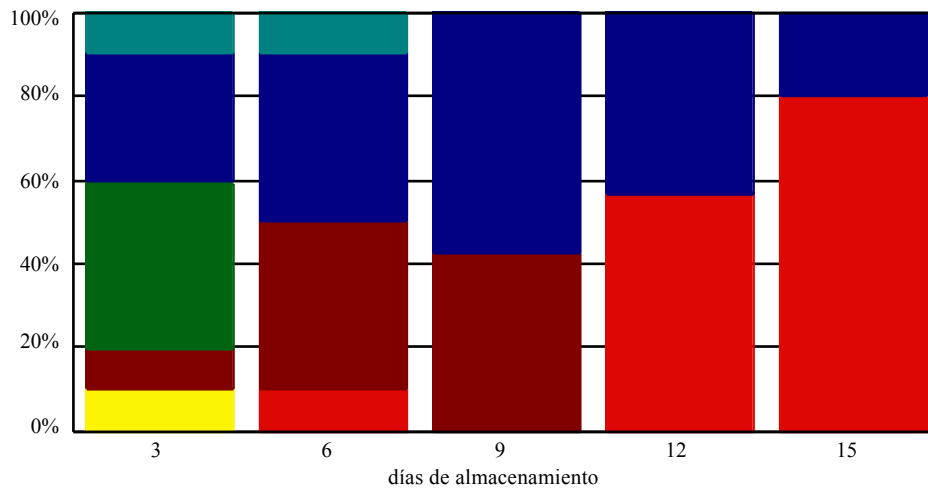
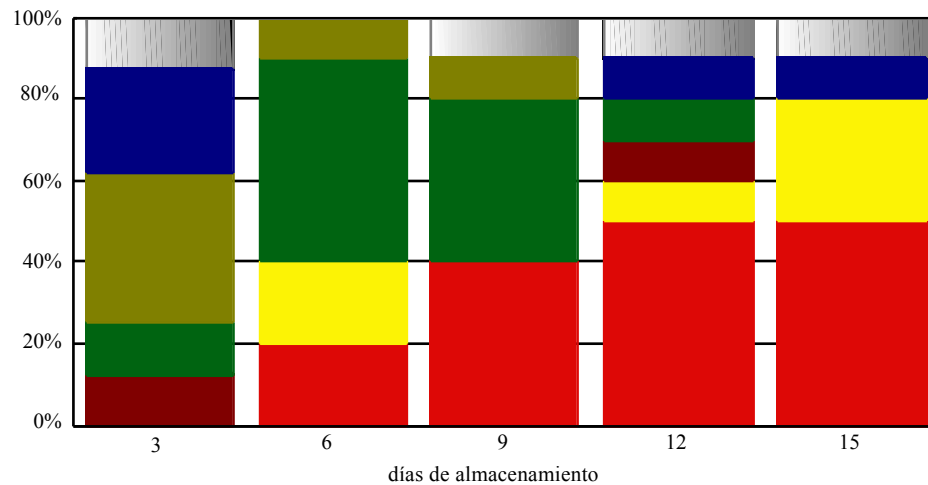


Figura IV.6. Sucesiones microbianas de la flora psicrotrofa en la cavidad abdominal de peces de agua dulce almacenados a refrigeración.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.

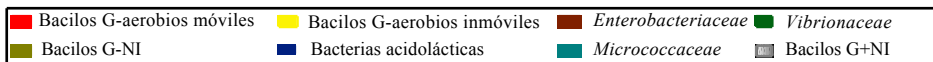
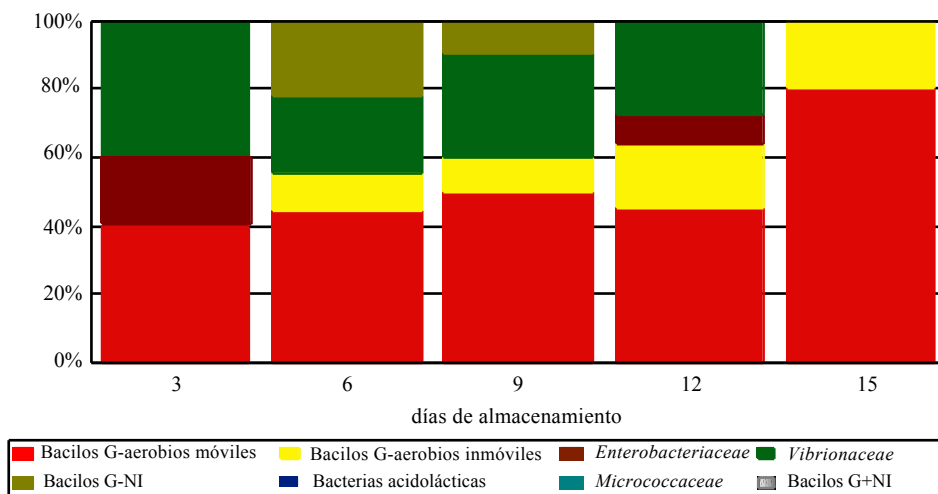
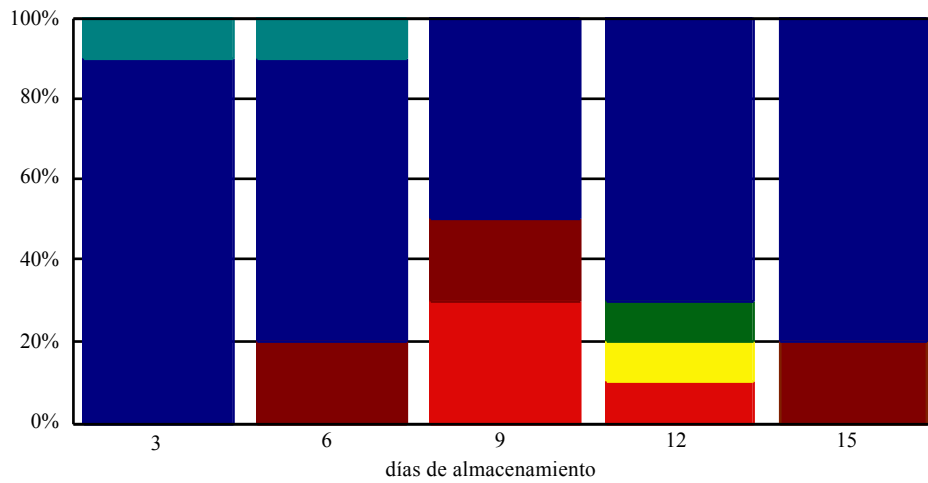
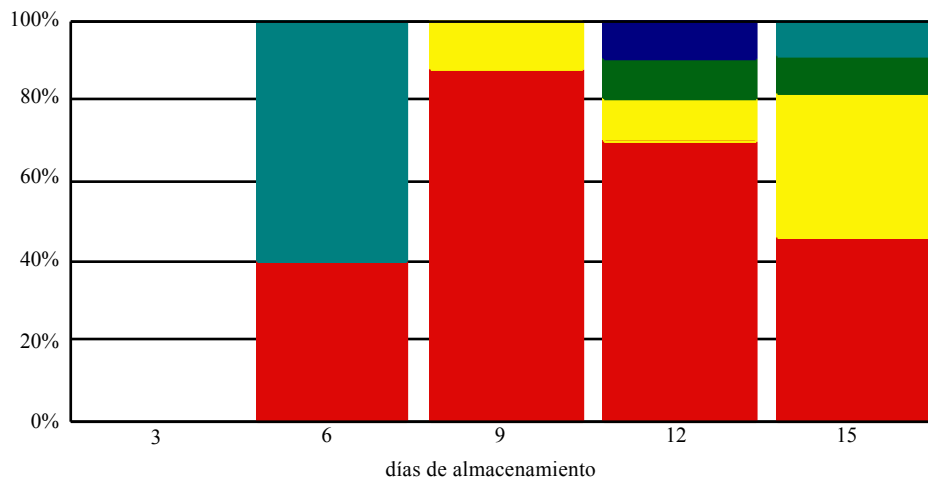


Figura IV.7. Sucesiones microbianas de la flora mesófila en el tejido muscular de peces de agua dulce almacenados a refrigeración.

A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.

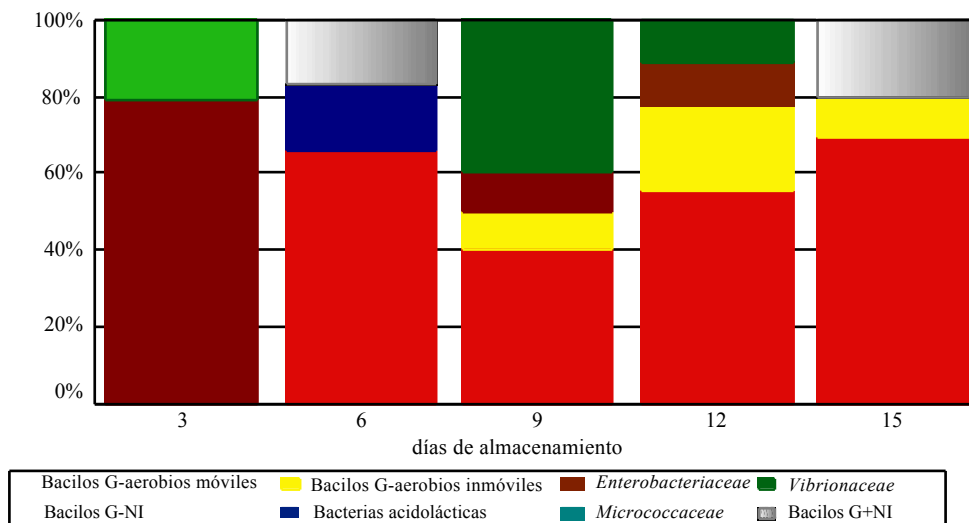
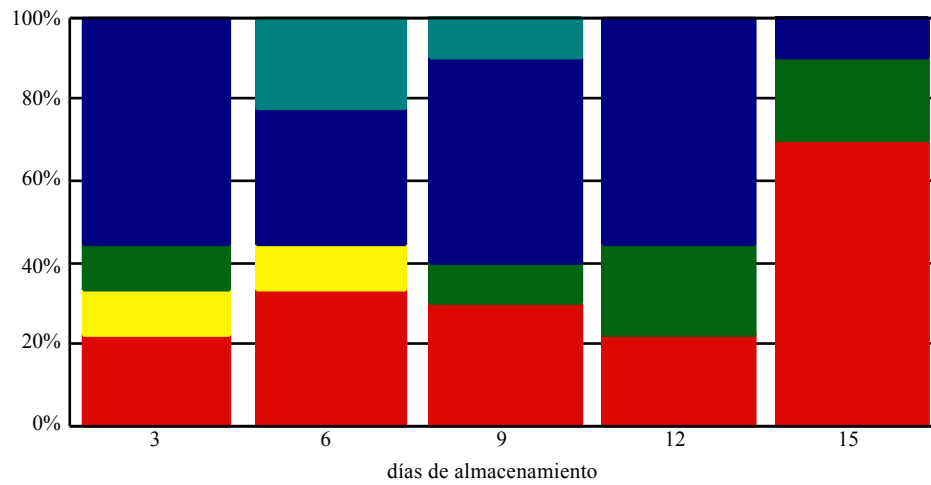
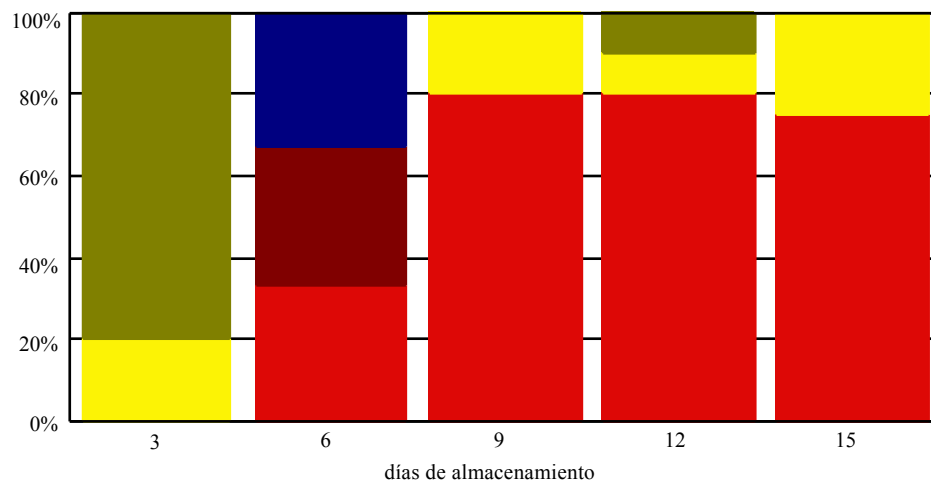


Figura IV.8. Sucesiones microbianas de la flora psicrotrófica en el tejido muscular de peces de agua dulce almacenados a refrigeración.

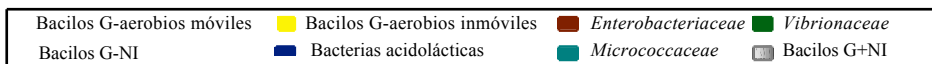
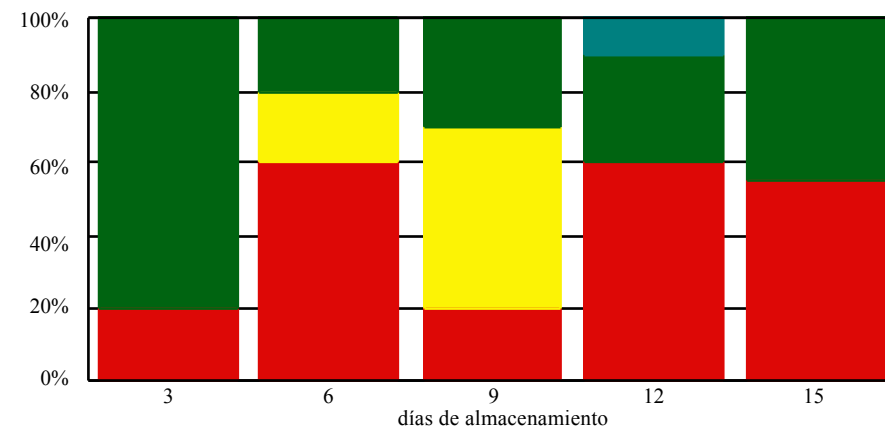
A) Trucha común.



B) Trucha arco iris.



C) Lucio.



DISCUSIÓN

Agua de la zona de captura.

La flora mesófila del agua de la zona de captura de los peces mostraba una composición variable en función de su origen. Así, el agua donde se recogían los ejemplares de trucha común era la que presentaba una flora mesófila más sencilla (únicamente tres grupos taxonómicos, figura IV.1), mientras que la composición de la flora mesófila del agua de la zona de captura de las otras dos especies piscícolas era más compleja (6 a 7 grupos) y bastante similar (únicamente en la zona de captura de los lucios se detectó un grupo taxonómico más -vibrionáceas-, modificándose además la presencia porcentual de enterobacteriáceas y bacterias acidolácticas en relación con la zona de captura de trucha arco iris -figura IV.1-).

Mientras que los ejemplares de trucha común se obtenían en cursos altos de los ríos, tanto las piscifactorías de donde se recogían las truchas arco iris como las zonas de captura de los lucios se situaban en los cursos medios-bajos. La presencia de niveles altos de enterobacteriáceas en muestras de agua correspondientes a trucha común pudiera deberse a la contaminación, con materia orgánica de origen animal, de los cursos altos de los ríos; al parecer, en algunas zonas de montaña se procede a la descarga de los residuos fecales que son destinados al abono de los campos.

La flora psicrotrófica de las diferentes aguas de captura de los peces era más uniforme en su composición que la mesófila, con variaciones cualitativas en uno o dos de los grupos taxonómicos, y relativa constancia en cuanto a la importancia porcentual de los tres grupos comunes en todos los orígenes: enterobacteriáceas, bacilos Gram negativos aerobios móviles y bacilos Gram negativos aerobios inmóviles (figuras IV.1 y IV.2).

Por otra parte, salvo para la trucha común, las floras mesófila y psicrotrófica del agua tenían una composición más compleja (mayor número de grupos taxonómicos) que las de las distintas zonas de los peces (piel, agallas e intestino, figuras IV.1 y IV.2).

En las muestras de agua, los microorganismos Gram negativos representaron entre el 50% (figura IV.1c) y el 90% (figuras IV.2b y IV.2c) de la flora total, niveles característicos en agua de áreas templadas, en las que los gérmenes Gram negativos suponen un elevado porcentaje de la flora (Acuff y col, 1984; Horsley, 1973). El grupo de bacterias mesófilas encontrado con mayor frecuencia es el de las enterobacteriáceas, mientras que entre los psicrotrofos el grupo microbiano mayoritario es el de las bacterias Gram negativas aerobias estrictas (tanto móviles como inmóviles). Las enterobacteriáceas representan, con relación a la flora total determinada a 7°C, el 17% de las cepas identificadas, porcentaje muy similar al encontrado por Horsley (1973) al analizar muestras de agua dulce en Canadá. En este mismo trabajo, Horsley (1973) obtuvo una frecuencia de bacterias Gram negativas aerobias estrictas (*Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter-Moraxella*) del 37% en este mismo tipo de muestras, ligeramente por debajo de los porcentajes obtenidos en nuestro trabajo, en las determinaciones de microorganismos psicrotrofos (48%), y por encima de los hallados entre los mesófilos. Al realizar análisis microbiológicos de agua dulce de zonas templadas, Trust (1975) observó que los gérmenes Gram negativos suponían el 82% de la flora total, dentro de los límites encontrados por nosotros y semejantes a los obtenidos por Evelyn y McDermott (1961). Por otro lado, las bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* se detectaron en

niveles similares a los encontrados por Horsley (1973), alrededor del 20%, únicamente en las muestras de los lugares de captura de los lucios.

Peces recién capturados.

Por lo que se refiere a la composición cuantitativa de la flora microbiana presente en el pescado, uno de los aspectos más llamativos es el no aislamiento de enterobacteriáceas en agallas, intestino y piel de trucha arco iris (figuras IV.1b y IV.2b), a pesar de haberse detectado su presencia en las muestras de agua correspondientes. Por otro lado, miembros de este grupo microbiano se aíslan con relativa frecuencia en las otras dos especies de pescado estudiadas (en intestino y agallas). Su ausencia en trucha arco iris podría ser debida al uso de antibióticos en el pienso (Austin, 1985) y de compuestos antimicrobianos en el agua de cría, de tal manera que los primeros impidieran su desarrollo en el tracto gastrointestinal, y que los últimos las incapacitaran para competir con otros microorganismos.

En las muestras intestinales (figuras IV.1 y IV.2), la proporción de microorganismos Gram negativos se encuentra entre un 28% (psicrotrofos en trucha común, figura IV.2a) y un 100% (mesófilos y psicrotrofos en lucio, figuras IV.1c y IV.2c), si bien en la mayoría de los casos superan el 50% de la flora total. En estas muestras los grupos predominantes son distintos en cada una de las especies de pescado.

En la flora mesófila las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* son mayoritarias en todas las especies de pescado, así como en la flora psicrotrofa de trucha común y lucio. Esta observación coincide con lo observado por Trust y Sparrow (1974) en intestino de salmónidos de vida libre, en los que, dentro de la variedad de grupos aislados, algunos géneros pertenecientes a ambas familias (*Enterobacter* y *Aeromonas*) se encuentran entre los microorganismos predominantes (36% y 13%, respectivamente). Por otro lado, Sugita y col (1985), estudiando carpa y tilapia, determinaron que los microorganismos aislados en la mayor parte de las muestras de intestino analizadas pertenecían a los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*, entre los aerobios, y al género *Bacteroides*, entre los anaerobios. Por su parte, Campbell y Buswell (1983) observaron que los grupos microbianos predominantes en el intestino de gallo eran *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. En nuestro caso, fueron detectados representantes del género *Pseudomonas* (género mayoritario dentro del grupo de bacterias Gram negativas móviles) en trucha arco iris y lucio. En lo referente al género *Aeromonas*, cabe hacer una serie de consideraciones previas. En las figuras IV.1 a IV.8, los representantes del género *Aeromonas* aparecen comprendidos en el grupo de las vibrionáceas, que también incluye a los gérmenes del género *Vibrio* aislados. Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, representantes de género *Vibrio* son aislados con mayor frecuencia en pescado de origen marino. Así, Newman y col (1972) detectaron, en una especie de pescado de este origen (*Pomatomus saltatrix*), que el 28% del total de cepas aisladas pertenecían a este género, mientras que tan sólo un 3% eran clasificadas como bacterias fermentadoras (no identificadas a nivel de género y que pudieran ser *Aeromonas*). Por el contrario, en pescado de agua dulce la mayor parte de las cepas fermentadoras móviles y oxidasa positivas son adscritas al género *Aeromonas*. En el presente trabajo cabe decir que el 82% de las cepas aisladas pertenecen a este último género. Se puede concluir, por tanto, que al referirnos al grupo de las vibrionáceas, éstas se pueden tratar “sensu lato” como *Aeromonas*.

En nuestro trabajo hemos aislado e identificado microorganismos pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* en trucha común, y microorganismos corineformes (parte de los contenidos bajo el epígrafe bacilos Gram positivos no identificados) en trucha común y trucha arco iris, mientras que, en las muestras de lucio, no se encontraron microorganismos Gram positivos. Trust y Sparrow (1974) también detectaron la presencia de corinebacterias y *Micrococcus* en intestino de salmónidos. En las muestras intestinales obtenidas a partir de trucha arco iris (figuras IV.1b y IV.2b), y posiblemente debido también al efecto de los antibióticos sobre determinadas poblaciones microbianas, se aprecian unos niveles elevados de microorganismos Gram positivos, bacterias acidolácticas y, principalmente, bacilos no identificados a nivel de especie (que comprende a representantes del género *Bacillus* y bacterias corineformes). Las proporciones de los distintos grupos microbianos en esta misma especie de pescado (principalmente *Aeromonas* y *Bacillus* -Gram positivos no identificados- en las determinaciones de microorganismos mesófilos -figura IV.1b-) son muy similares a las encontradas por Nedohula y Westhoff (1993) en *Morone saxatilis* cultivado. Un dato interesante es que, esos mismos investigadores, aislaron *Carnobacterium* spp a este nivel, microorganismo que fue igualmente detectado en nuestro trabajo. Evelyn y McDermott (1961), por su parte, aislaron cepas de *Lactobacillus* en distintas especies de pescado de agua dulce de Canadá. Austin y Al Zahrani (1988) observaron, en intestino de trucha arco iris cultivada, que el 65% de la flora total estaba compuesto por bacterias Gram negativas, entre las que destacaban los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Providencia* y *Flavobacterium*. Entre los gérmenes Gram positivos predominaron el género *Bacillus* y los microorganismos corineformes.

La muestra de agallas que exhibe una mayor heterogeneidad en cuanto a la composición de la flora microbiana es la tomada de los lucios. En este tipo de muestras, el aislamiento de bacterias Gram negativas estuvo comprendido entre un 40% (mesófilos, trucha arco iris) y el 80% (mesófilos, lucios). Se puede decir que, en general, las muestras de agallas analizadas son el mejor reflejo de la flora microbiana presente en el agua, hecho que concuerda con lo expuesto por Horsley (1973) a propósito de la similitud entre los patrones de composición microbiana de las muestras de agua, agallas y piel examinadas por él. El grupo microbiano que predomina entre las cepas mesófilas es el de las enterobacteriáceas, en trucha común y lucio, mientras que en trucha arco iris lo hacen los microorganismos Gram negativos aerobios estrictos móviles y las micrococáceas. En las determinaciones de microorganismos psicrotrofos, los grupos predominantes son las bacterias acidolácticas (trucha común y lucio), micrococáceas (trucha arco iris), y gram negativos aerobios estrictos (trucha arco iris y lucio). Un hecho destacable es la escasa presencia e incluso ausencia de vibrionáceas en las muestras analizadas (fenómeno también observado por Horsley -1973-), que pudiera estar relacionado con una incapacidad, por su parte, de colonizar estas estructuras anatómicas, si bien otros autores han detectado niveles altos de miembros de esta familia, concretamente *Aeromonas*, en este tipo de muestras (Trust, 1975; Nedohula y Westhoff, 1993).

Entre los grupos microbianos mayoritarios que identificó Horsley (1973) en agallas de salmónidos destacan seis: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, bacterias semejantes a *Corynebacterium*, micrococáceas, *Moraxella* y *Acinetobacter*. De estos seis cabe decir que *Pseudomonas* (englobados dentro de los microorganismos Gram negativos aerobios estrictos móviles) y *Moraxella* y *Acinetobacter* (comprendidos en el grupo de microorganismos Gram negativos aerobios estrictos inmóviles) fueron detectados por nosotros en casi todas las muestras, principalmente en trucha arco iris y lucio, mientras que no se observó la presencia

de representantes del género *Flavobacterium*. Por lo que respecta a las micrococáceas, se puede decir que fueron aisladas a partir de las agallas de las tres especies de pescado (tanto en las determinaciones de microorganismos mesófilos, como en las de psicrotrofos). Horsley (1973) definió las bacterias semejantes a *Corynebacterium* (“coryneform-like”) como bacilos Gram positivos o Gram variables, que aparecían formando dímeros (en forma de “V” ancha) al ser observados al microscopio. En esta vaga descripción podían estar comprendidos, no sólo los microorganismos próximos a este género microbiano, sino también cepas pertenecientes al género *Carnobacterium* (suponen el 90% de las cepas del grupo de las bacterias acidolácticas aisladas e identificadas en el presente estudio -véase capítulo VIII-). Cepas adscritas a este género microbiano fueron aisladas a partir de las tres especies de pescado objeto de estudio en nuestro trabajo, con niveles comprendidos entre el 10% y el 30% de la flora mesófila total. Entre los grupos microbianos minoritarios detectados por Horsley (1973) hay que destacar al género *Aeromonas* (5% de la flora total) y al género *Bacillus* (1%) también presentes, en niveles parecidos, en nuestro trabajo. Finalmente, cabe decir que los niveles de enterobacteriáceas obtenidos en el presente estudio (entre el 10 y el 60%), excepción hecha de las muestras de trucha arco iris, están muy por encima de los que detectó Horsley en su trabajo (alrededor del 6%). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores, como Trust (1975), en salmónidos de vida libre, y Nedohula y Westhoff (1993), en *Morone saxatilis*, en los que cepas pertenecientes al género *Aeromonas*, dentro de los microorganismos Gram negativos, y al grupo de las bacterias corineformes, dentro de los Gram positivos, fueron muy abundantes. En el estudio de Gennari y Tomaselli (1988) sobre el almacenamiento de sardinas, predominaron bacterias Gram negativas aerobias móviles, inmóviles, enterobacterias y flavobacterias.

Entre las muestras tomadas de piel se observa una gran variabilidad (con la especie) en lo que respecta a los porcentajes de bacterias las Gram positivas y Gram negativas con respecto a la flora total. Así, en lucio (figuras IV.1c y IV.2c) predominan las bacterias Gram negativas (alrededor del 80%), mientras que en trucha común y trucha arco iris (figuras IV.1a, IV.1b, IV.2a y IV.2b) lo hacen las bacterias Gram positivas (65-85% y 50-60%, respectivamente). Acuff y col (1984), en piel de tilapia, apreciaron que la proporción de bacterias Gram positivas ronda el 30%, incluyéndose en dicho grupo, sobre todo, micrococáceas, aunque también estaban presentes, en menor medida, bacterias corineformes y lactobacilos. En ese mismo trabajo, las bacterias Gram negativas, supusieron, aproximadamente, el 65% del total de la flora. Dentro de éstos, los niveles de microorganismos Gram negativos aerobios móviles, microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles y vibrionáceas, con respecto a la flora total, fueron similares entre sí (del orden del 15%). Nedohula y Westhoff (1993) en piel de *Morone saxatilis*, por su parte, aislaron, principalmente, bacterias corineformes, vibrionáceas, *Pseudomonas* y representantes del grupo *Flavobacterium-Cytophaga*. Tal y como se aprecia en las figuras IV.1 y IV.2, la mayor parte de estos grupos microbianos han sido aislados a partir de muestras de piel en nuestro estudio, pero cada especie de pescado presenta características diferenciales.

Uno de los aspectos más llamativos es que el grupo microbiano mayoritario presente en cada tipo de pescado parece verse influido por la contaminación aportada desde el momento de la captura hasta el primer análisis microbiológico realizado. Así, en las muestras de piel de ambas especies de trucha analizadas se observa que el porcentaje de micrococáceas es más elevado que en las muestras de agallas e intestino correspondientes. En este sentido hay que recordar que el aislamiento de miembros de esta familia a partir del agua es ocasional

y presenta valores bajos si son detectados (Acuff y col, 1984). Estos altos porcentajes de micrococáceas influyen decisivamente en el predominio de los microorganismos Gram positivos sobre los Gram negativos a este nivel. Otro hecho a considerar es la importancia porcentual de las micrococáceas entre la flora psicrotrofa. Dado que algunos miembros de la familia *Micrococcaceae* pueden desarrollarse a bajas temperaturas (Venugopal y col, 1994), podría plantearse la posibilidad de que estos microorganismos fueran capaces de multiplicarse en pescado conservado a temperaturas de refrigeración y contribuir al desarrollo de malos olores y otros signos característicos de la alteración (Gillespie y McRae, 1975). En las muestras de piel tomadas en lucio se aprecia que el grupo microbiano mayoritario es el de las enterobacteriáceas si bien, a diferencia de las micrococáceas en los ejemplares de trucha, su presencia no sólo podría ser resultado de una manipulación incorrecta del pescado, sino que podrían estar presentes de modo natural teniendo en cuenta su importante presencia en las muestras de agua analizadas. Okafor y Nzeako (1985) relacionaron la presencia de *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus* en pescado de agua dulce en Nigeria con malas condiciones higiénicas durante la manipulación.

Entre los microorganismos Gram positivos presentes inicialmente en la piel de trucha común destacan las bacterias acidolácticas, que suponen hasta un 55% de la flora mesófila total. Este fenómeno se puede explicar si tenemos en cuenta que la refrigeración de estos ejemplares sufrió un retraso con respecto al momento de su captura (véase material y métodos del capítulo I), lo cual pudo permitir, probablemente, la implantación y el desarrollo de este grupo microbiano que aprovechó la temperatura ambiente y el efecto inhibitorio que el mucus superficial ejerce sobre los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Horsley, 1973). Aproximadamente, un 90% de estas bacterias acidolácticas fueron identificadas como pertenecientes al género *Carnobacterium* (ver capítulo VIII). Este género microbiano y, en ocasiones, otros representantes del género *Lactobacillus* se han aislado a partir de muestras de pescado (Mauguin y Novel, 1994; Nedohula y Westhoff, 1993; Okafor y Nzeako, 1985). Horsley (1973) también detectó la presencia, en muestras tomadas a partir de piel de salmónidos, de “microorganismos semejantes a corinebacterias” (donde constituían un 20% de la flora total) y cuya descripción (mencionada con anterioridad en la discusión del presente capítulo) coincide con las características microscópicas observadas por nosotros en las cepas que hemos adscrito al género *Carnobacterium*. De todos modos, en nuestro trabajo también hemos aislado microorganismos corineformes, no esporulados y catalasa positivos, que aparecen comprendidos en el grupo de bacilos Gram positivos no identificados. Las corinebacterias han sido igualmente detectadas por otros autores en hábitats acuáticos (Acuff y col, 1984; León Fajardo y Marth, 1979; Nedohula y Westhoff, 1993).

La presencia de vibrionáceas (*Aeromonas* en su mayoría) en la piel de peces es muy reducida, siendo solamente detectadas en trucha común y lucio y en bajos niveles, lo que coincide con lo observado por Horsley (1973). Asimismo, y al contrario que este mismo autor y Acuff y col (1984), tampoco fueron aislados representantes del género *Flavobacterium* en piel en nuestro estudio. Por otro lado, se observó la presencia de microorganismos Gram negativos aerobios estrictos, siendo más frecuente el aislamiento de microorganismos aerobios inmóviles (excepto en las determinaciones de mesófilos llevadas a cabo en trucha común) que el de aerobios móviles, los cuales no se detectaron, siquiera, en trucha común. Horsley (1973) apunta que los bajos porcentajes, con respecto a la flora total, de *Aeromonas* y bacilos Gram negativos aerobios observados en su estudio en muestras de piel (en comparación con otras muestras) se deben al efecto inhibitorio del mucus de la piel sobre el crecimiento microbiano. En el presente trabajo, podemos suponer este mismo efecto, pues

estos grupos microbianos (bacilos Gram negativos aerobios y vibrionáceas) representan reducidos porcentajes con respecto a la flora total de la piel. Por el contrario, Evelyn y McDermott (1961) encontraron que *Pseudomonas* y *Aeromonas* predominaban en el mucus de truchas.

En resumen, se podría afirmar que, en pescado recién capturado, en conjunto, los grupos microbianos predominantes, sin distinguir entre las determinaciones realizadas a 7 ó 30°C, difieren para cada especie de pescado. Así, en trucha común destacan las bacterias acidolácticas y los representantes de la familia *Enterobacteriaceae*. En trucha arco iris se aislaron, con mayor frecuencia, bacilos Gram negativos aerobios, vibrionáceas y micrococáceas, mientras que en lucio los grupos microbianos característicos fueron *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*.

Sucesiones microbianas durante el almacenamiento a refrigeración.

Si observamos la evolución de las asociaciones microbianas en muestras de piel (figuras IV.3 y IV.4) podemos apreciar notables diferencias entre las tres especies de pescado y, dentro de cada especie, entre las determinaciones de flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrofa. Así, se puede ver que el grupo microbiano predominante a lo largo del almacenamiento a refrigeración de la trucha común es el de las bacterias acidolácticas, grupo que también es aislado en distintos momentos del almacenamiento a refrigeración de la trucha arco iris (aunque en ningún momento representa más del 20% de la flora total) y en los ejemplares de lucio (únicamente durante los primeros estadios del almacenamiento). Su presencia, en estos porcentajes tan elevados con respecto a la flora total en trucha común, ha sido explicada anteriormente y está relacionada con un retraso a la hora de aplicar bajas temperaturas a los ejemplares tras su captura. Este hecho pudo permitir la implantación de este grupo microbiano eminentemente mesófilo, pero con capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración y, además, conferirle cierta ventaja a la hora de competir con otros microorganismos por el nicho ecológico que representa la piel. En los análisis llevados a cabo a temperaturas empleadas para determinaciones de mesófilos se puede ver que las bacterias acidolácticas representan valores (en tanto por ciento) más altos, con respecto a la flora total, que en las determinaciones de microorganismos psicrotrofos, hecho que prueba que el desarrollo a 30°C de una parte de la flora psicrotrofa presente en el pescado se ve limitado. A su vez se puede aclarar el hecho de que el final de la vida útil de estos ejemplares fuera muy similar a los de trucha arco iris, a pesar de que los recuentos microbianos, en trucha común, fueron más altos, pues una gran parte de la flora total (bacterias acidolácticas) no poseían características típicas de microorganismos alterantes (véase capítulo VIII). Asimismo, se podrían explicar las diferencias existentes entre los valores obtenidos en los recuentos de flora anaerobia en trucha común y aquellos obtenidos con las otras dos especies de pescado. Así, este tipo de microorganismos Gram positivos, que son anaerobios facultativos, podrían crecer en el medio reforzado para aislamiento de clostridios (medio de cultivo poco selectivo) en las condiciones de incubación empleadas.

En la bibliografía existente no se describe ningún fenómeno de las mismas características que el aquí expuesto, en el que un grupo microbiano encontrado con poca frecuencia en este tipo de productos se haya desarrollado y mantenido en niveles superiores a los de los microorganismos alterantes clásicos del pescado. Acuff y col, 1984 citan la

presencia de representantes del género *Lactobacillus* en niveles muy bajos (menos del 2% de la flora total) durante algunos momentos del almacenamiento a refrigeración de tilapia mantenida en hielo picado. Otros autores han detectado *Carnobacterium* en pescado fresco (Evelyn y McDermott, 1961, en truchas; Okafor y Nzeako, 1985, en pescado de origen tropical) y en pescado ahumado (Zorn y col, 1993), pero no alcanzan niveles tan elevados como en nuestro caso.

Las determinaciones realizadas a 7°C en medios de recuentos de totales nos pueden reflejar, con mayor fidelidad, la evolución de aquellos microorganismos que poseen actividad alterante. Así, en los ejemplares de trucha común (figuras IV.3a y IV.4a) los microorganismos alterantes clásicos (bacilos Gram negativos aerobios y vibrionáceas) supusieron hasta el 50% de la flora psicrotrófica en algunos momentos del almacenamiento, mientras que en las determinaciones de mesófilos fueron detectados en raras ocasiones.

Por lo que respecta a las vibrionáceas, se puede decir que están presentes durante los primeros días del almacenamiento, mientras que las bacterias Gram negativas aerobias inmóviles son detectadas, únicamente, en el primer muestreo realizado. Por el contrario, los microorganismos Gram negativos aerobios móviles (*Pseudomonas*, *Shewanella*, ...) comienzan a ser aislados y detectados a partir del día seis del almacenamiento, y representan el 40% de la flora total (figura IV.4a) en el momento en el que finaliza el período de vida útil comercial (día 12). Este grupo microbiano no se detecta en ninguna de las determinaciones realizadas a 30°C en trucha común. Acuff y col (1984), estudiando las sucesiones microbianas en tilapia, Gram y col (1990) en pesca del Nilo, y Lee y Harrison (1968), en pescado de origen marino, observaron que *Pseudomonas* era el género microbiano predominante a medida que avanzaba el almacenamiento, que los representantes de *Flavobacterium* desaparecían, y que los niveles de Gram negativos aerobios inmóviles se reducían mucho.

La presencia de *Bacillus* y corinebacterias (bacilos Gram positivos no identificados a nivel de especie), así como de micrococáceas y enterobacteriáceas, disminuye a lo largo del almacenamiento, algo particularmente notorio entre los psicrotrofos, lo que muestra su dificultad para desarrollarse a bajas temperaturas. Es de destacar, de todas maneras, la persistencia de enterobacteriáceas y micrococáceas, que están presentes, incluso, al final del almacenamiento.

En los ejemplares de trucha arco iris (figuras IV.3b y IV.4b) y lucio (figuras IV.3c y IV.4c) se aprecia que los patrones de sucesiones microbianas no son muy diferentes entre sí y que, en las determinaciones de flora aerobia mesófila y flora aerobia psicrotrófica, se observa una mayor presencia de la flora típicamente asociada con la alteración del pescado, es decir, microorganismos Gram negativos aerobios (móviles e inmóviles) en comparación con las sucesiones microbianas alterantes en trucha común.

La diferencia más notable que se puede apreciar entre los patrones de evolución de microorganismos de estas dos especies de pescado consiste en una mayor presencia de vibrionáceas, así como de enterobacteriáceas en los primeros estadios del almacenamiento, en lucio, frente a la preponderancia de micrococáceas (en los primeros días de almacenamiento) en trucha arco iris.

Al principio del almacenamiento, la proporción de microorganismos Gram negativos aerobios se situaba entre el 38% y el 50% en trucha arco iris (figuras IV.3b y IV.4b) y alrededor del 40% en lucio (figuras IV.3c y IV.4c), si bien sus porcentajes, con respecto a la flora total, se incrementaron a lo largo del almacenamiento a refrigeración, alcanzándose un

máximo entre los días nueve y doce, fechas en que comenzaban a aparecer o se establecían los primeros síntomas de alteración. En ambas especies, y tanto en los análisis de mesófilos como de psicrotrofos, se puede ver como los porcentajes de las poblaciones de estos gérmenes Gram negativos móviles aumentaron paulatinamente, tal y como observaron Acuff y col (1984) y Lee y Harrison (1968), mientras que los niveles relativos de bacilos Gram negativos aerobios inmóviles se incrementaron ligeramente o se mantenían estables durante las primeras etapas del almacenamiento para, al final del mismo, disminuir drásticamente en la mayoría de las ocasiones.

En lucio, las vibrionáceas (microorganismos con aptitud alterante -Gram y col, 1987; Makarios-Laham y Traxler, 1991-) presentan un patrón de evolución semejante al de los microorganismos Gram negativos aerobios móviles, pero alcanzándose el máximo una vez que finaliza el período de vida útil. Este hecho puede ser indicativo de una menor capacidad, por parte de este grupo microbiano, de competir frente a otros microorganismos Gram negativos.

En general, las bacterias Gram positivas representan, en trucha arco iris y lucio, al menos un 10% de la flora total alrededor del final de la vida útil, ya sean micrococáceas, bacterias acidolácticas o corinebacterias. La evolución de las micrococáceas, así como de las enterobacterias, es similar a la observada en trucha común, es decir, sus porcentajes con respecto a la flora total disminuyen a medida que avanza el almacenamiento. En el grupo de los bacilos Gram positivos no identificados a nivel de especie hay que decir que solamente se detectan en las determinaciones de mesófilos, en las que sus niveles se mantienen constantes al final de la vida útil.

En las muestras de la superficie de la cavidad abdominal de trucha común (figuras IV.5a y IV.6a), las sucesiones microbianas presentan un patrón similar al mostrado en piel. Es decir, predominio de bacterias acidolácticas, con un ligero descenso de su importancia entre la flora psicrotrofa al final de la vida útil, y una mayor presencia de bacilos Gram negativos aerobios y enterobacterias (figura 6a). La similitud entre los patrones evolutivos de piel y cavidad abdominal parece indicar que la flora presente en esta última está determinada, no sólo por las bacterias contenidas en el tracto gastrointestinal y liberadas a esta última superficie durante la evisceración, como podría ser el caso de las enterobacteriáceas, sino por aquéllas procedentes de la piel debido al lavado y arrastre de microorganismos presentes en su superficie como consecuencia de la fusión del hielo picado empleado en la conservación. La presencia de micrococáceas se ve reducida a los primeros estadios del almacenamiento, mientras que las vibrionáceas son detectadas en las mismas etapas que en la piel.

También se observan similitudes entre la evolución de las asociaciones microbianas en la cavidad abdominal y en la piel de la trucha arco iris (figuras IV.5b y IV.6b). De hecho, las bacterias Gram negativas aerobias se presentan como el grupo microbiano mayoritario, y suponen más del 60% de la población total a los doce días de iniciarse el almacenamiento. Del resto de microorganismos Gram negativos hay que distinguir entre enterobacteriáceas y vibrionáceas. Por lo que se refiere a las enterobacteriáceas en la cavidad abdominal de trucha arco iris, están presentes en niveles mucho más bajos que en trucha común, mientras que las vibrionáceas son detectadas con mayor frecuencia en la cavidad abdominal que en las muestras de piel de trucha arco iris (figuras IV.3b, IV.4b, IV.5b y IV.6b). En ambos casos

puede ser debido a la descarga de microorganismos procedentes del intestino durante el eviscerado. Así, se aprecia que en las muestras de intestino tomadas a partir de trucha arco iris no se detecta la presencia de enterobacteriáceas, mientras que en trucha común sí. También se puede observar que el intestino es una fuente de vibrionáceas, mientras que este grupo microbiano apenas se aísla a partir de piel (figura IV.3b). Al igual que en las muestras de piel, las micrococáceas ven disminuidos sus niveles al avanzar el almacenamiento, mientras que los bacilos Gram positivos no identificados y bacterias acidolácticas mantienen sus porcentajes, con respecto a la flora total, durante el transcurso del mismo (figura IV.6b). Se aprecia, además, que las bacterias acidolácticas se encuentran en proporciones más elevadas que en piel.

En la cavidad abdominal de lucio (figuras IV.5c y IV.6c) se puede ver que las bacterias acidolácticas están presentes, con una frecuencia mayor que en la piel de esta misma especie, mientras que las enterobacteriáceas se encuentran en menores porcentajes. Al contrario de lo mostrado en piel, las vibrionáceas en lucio pierden importancia relativa a medida que avanza el almacenamiento. Los niveles más altos de bacterias Gram negativas aerobias se dan al final del almacenamiento, una vez que los ejemplares han sido rechazados para el consumo.

Para reafirmar la influencia que la carga microbiana intestinal pudiera tener sobre la composición de la flora a nivel de la cavidad abdominal, hay que decir que casi todos los grupos microbianos presentes en el contenido intestinal de cada especie de pescado, con la excepción de los bacilos Gram positivos no identificados a nivel de especie en las dos especies de trucha (figuras IV.1 y IV.2), fueron aislados en sus respectivas muestras abdominales (figuras IV.5 y IV.6).

Por lo que respecta a las sucesiones microbianas en la masa muscular (figuras IV.7 y IV.8), y dentro de la semejanza existente entre éstas y los patrones de evolución en las muestras de piel, es interesante destacar que los microorganismos Gram negativos aerobios y las vibrionáceas, gérmenes alterantes típicos en este tipo de alimentos, presentan unos valores, con respecto a la flora total, superiores a los observados en piel y cavidad abdominal. La presencia de enterobacteriáceas en músculo podría tener su origen en la rotura de la pared intestinal, y consiguiente paso de estas bacterias a la serosa del peritoneo, lo cual facilitaría la invasión de la masa muscular adyacente a esta membrana. Por lo que respecta a las bacterias acidolácticas (no se había descrito su aislamiento a este nivel con anterioridad) y micrococáceas, tanto el intestino como la piel y las agallas podrían haber servido de fuente de estos microorganismos para invadir la masa muscular durante el período de almacenamiento del pescado (Shewan, 1971).

En general se aprecia que, tal y como ocurría en las muestras iniciales, el grupo o grupos microbianos característicos en cada especie de pescado a lo largo del almacenamiento a refrigeración es distinto. Así, en trucha común, se observa que las bacterias acidolácticas son los microorganismos encontrados con mayor frecuencia, tanto en determinaciones de mesófilos como de psicrotrofos (figuras IV.7a y IV.8a). En los ejemplares de trucha arco iris (figuras IV.7b y IV.8b), sin embargo, el grupo predominante es el de los microorganismos Gram negativos aerobios (principalmente móviles). En lucio, en las determinaciones de mesófilos (figura IV.7c) predominan, fundamentalmente, las bacterias Gram negativas

aerobias móviles, mientras que en las de psicrotrofos (figura IV.8c) tanto vibrionáceas como Gram negativos aerobios móviles están igualmente representados. Adams y col (1964) observaron que, al comienzo del almacenamiento, el porcentaje de microorganismos Gram negativos aerobios estrictos era del 30-40%, mientras que, al final de la vida útil, estos porcentajes se incrementaron hasta llegar al 80-90%, tal y como ocurre en nuestro estudio en las gráficas correspondientes a determinaciones de psicrotrofos (figura IV.8).

En general, las asociaciones microbianas alterantes alcanzan niveles más altos entre la flora psicrotrofa que entre la flora mesófila, lo que pone de manifiesto la mayor importancia de aquélla a la hora de evaluar la vida útil del pescado.

CAPÍTULO V:

ESTUDIO TAXONÓMICO DE LOS MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS MÓVILES

INTRODUCCIÓN

Dentro de los microorganismos Gram negativos aerobios móviles, el grupo más importante, desde el punto de vista de la alteración de los alimentos, está representado por la familia *Pseudomonadaceae*. Esta familia engloba a microorganismos saprófitos presentes en ambientes acuáticos de agua dulce y marinos y que, en ocasiones, se han asociado con enfermedades en animales y plantas (Bergan, 1981; Palleroni, 1981; Schroth y col, 1981). Entre las características comunes a estos organismos se encuentran las capacidades tanto para producir ácido a partir de la glucosa anaeróticamente, como para crecer en presencia de una gran variedad de sustratos orgánicos, además de no ser fotosintéticos.

De entre los cuatro géneros incluidos en las pseudomonadáceas (Palleroni, 1981), el género *Pseudomonas*, cuyas especies son mayoritariamente móviles y oxidasa positivas, se ha asociado frecuentemente con la alteración de alimentos refrigerados (Jay, 1992). Así, diversos autores han aislado a representantes de este género a partir de carne alterada de distintos orígenes (Mölin y Ternström, 1982, 1986a; Prieto y col, 1992a; Shaw y Latty, 1982), de leche cruda o pasteurizada alterada (Shelley y col, 1987; Ternström y col, 1993) y de pescado alterado, de origen marino o de agua dulce, (Gennari y Tomaselli, 1988; Gillespie, 1981; Gray y Stewart, 1980; Sternström y Mölin, 1990).

Las *Pseudomonas*, tal y como las definieron Shewan y col (1960a), son bacilos y cocobacilos Gram negativos, móviles, no esporulados y de metabolismo no fermentativo. A las características anteriores, Colwell y Liston (1961) añadían que ocasionalmente utilizaban distintos azúcares y que eran resistentes al agente vibriostático O-129. De todas maneras, si bien se dan excepciones a alguna de las propiedades genéricas a las que hemos hecho referencia (ya que existen, igualmente, especies móviles -*P. mallei*-, u oxidasa negativas -p. e. *P. syringae*-), las especies de *Pseudomonas* que más nos interesan desde el punto de vista de la Microbiología de los Alimentos son móviles (con flagelo polar), oxidasa positivas, que no producen pigmentos distintos de la fluoresceína y no requieren ningún factor de crecimiento para su desarrollo.

Palleroni y Doudoroff (1972), dividieron el género *Pseudomonas* en cinco grupos ARN (obtenidos por estudios de homología del ARN ribosómico). Palleroni (1984), basándose en aquellos estudios, realizó una nueva clasificación dentro del género *Pseudomonas* y obtuvo un total de cinco secciones. En la sección I incluyó a especies tanto productoras de pigmento fluorescente como a especies no fluorescentes. Dentro de las primeras destacaban *P. aeruginosa* (de interés clínico), *P. fluorescens* y *P. putida* (ambas aisladas en ambientes diversos y relacionadas con la alteración de alimentos conservados a bajas temperaturas), mientras que entre las segundas se encontraban *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* y *P. pseudoalcaligenes*. *P. fluorescens* y *P. putida* eran subdivididas, a su vez, en cinco y dos biovars respectivamente. La sección II (grupo ARNr II de Palleroni y

Doudoroff, 1972), que estaba muy relacionado con la sección III (de hecho, eran indistinguibles desde el punto de vista fenotípico), agrupaba a especies patógenas para los animales (*P. mallei* y *P. pseudomallei*) y para las plantas y/o animales (*P. caryophilli*, *P. cepacia*, *P. solanacearum*). La sección III, por su parte, comprendía a las especies *P. acidovorans* y *P. testosteroni*, a las cuales De Vos (1985) reclasificó como pertenecientes al género *Comamonas*, así como a *P. saccharophila* y *P. flava*. Los grupos ARNr IV y V de Palleroni y Doudoroff (1972) se incluyeron en la sección IV y estaban representados por especies que necesitaban factores de crecimiento para su desarrollo (*P. vesicularis* -grupo ARNr IV-, *P. diminuta* -ARNr IV- y *P. maltophilia* -ARNr V-, ésta relacionada a su vez con el género *Xanthomonas*). Finalmente, la sección V comprendía a especies de *Pseudomonas* cuyas relaciones con otras especies de este género eran desconocidas en aquellos momentos. Asimismo, también englobaba a especies que habían sido objeto de estudios taxonómicos pero que no habían sido introducidas en la Lista de Nombres Bacterianos Aprobados (Skerman y col, 1980). Las especies contenidas en esta sección (V) y que nos interesan, desde nuestro punto de vista, son aquellas aisladas frecuentemente a partir de los alimentos (leche y productos lácteos, huevos, carnes y pescados), fundamentalmente *P. fragi*. Esta especie, por otro lado estaba relacionada con el grupo I de ARNr.

Mölin y Ternström (1986a) consideraban que el estado de la taxonomía del género *Pseudomonas* no era satisfactoria al faltar criterios de diagnóstico útiles para separar diferentes grupos de *Pseudomonas*. Estos mismos autores y Gavini y col (1989) propusieron la división del grupo I de ARNr de Palleroni y Doudoroff (1972) en varios géneros. Uno de esos géneros estaría constituido por el “complejo *P. fluorescens*-*P. putida*”, por el “complejo *P. fragi*”, y por *P. lundensis*, especies, por otra parte, que eran aisladas con mayor frecuencia a partir de alimentos alterados (Mölin y Ternström, 1986a, Sternström y Mölin, 1990; Ternström y col, 1993). En el momento presente no tenemos noticia de que se haya aceptado tal modificación en la taxonomía de *Pseudomonas*.

La situación actual de los grupos de mayor interés dentro de este género aparece recogida en el trabajo de Stackebrandt y col (1988). Los distintos grupos de pseudomonas se englobaban en la clase *Proteobacteria*, dentro, a su vez, del “*phylum*” Eubacteria (Woese, 1987). La clase *Proteobacteria* se subdividía en cuatro subclases (alfa, beta, gamma y delta). El complejo “*P. fluorescens*” se encontraba en la subclase gamma, mientras los complejos “*P. solanacearum*” y “*P. acidovorans*” lo hacían en la subclase beta. Más tarde, De Vos y col (1989) establecieron las relaciones genotípicas y la localización taxonómica de las especies de *Pseudomonas* hasta entonces descritas, de las especies de *Pseudomonas* no clasificadas y de aquellas cepas semejantes a *Pseudomonas*. Consideraron que la rama ARNr-*P. fluorescens* (comprendida en la superfamilia II de ARNr) constituía el auténtico género *Pseudomonas*, agrupando a cepas procedentes de muy diferentes nichos ecológicos, incluyendo a todas las cepas clasificadas anteriormente como pertenecientes a la sección I de Palleroni (1984) y a otras especies de importancia en Microbiología de los Alimentos, entre las que destacaba *P. fragi* (incluida en la sección V de Palleroni -1984-). Las pseudomonas de origen marino (*P. nautica*, *P. doudoroffi* y *P. marina*) descritas por Baumann y col (1972) se agruparon en otras ramas de esta misma superfamilia ARNr II. La superfamilia ARNr III contenía a las especies del género *Pseudomonas* comprendidas en la subclase beta (Stackebrandt y col, 1988).

Shewanella (Mc Donell y Colwell, 1985) es otro género microbiano constituido por bacilos Gram negativos aerobios móviles y que agrupa a una especie (*S. putrefaciens*) de gran importancia en la alteración de pescado conservado a bajas temperaturas (Sternström y Mölin,

1990). La especie tipo de este género era conocida desde hacía muchos años bajo el nombre, primero, de *Pseudomonas putrefaciens* (Castell y col, 1948) y, más tarde, debido a que algunos autores sugerían que presentaba unas características genéricas peculiares (Shewan, 1971), como *Alteromonas putrefaciens* (Lee y col, 1977). Estos autores (Lee y col, 1977) realizaron un estudio taxonómico en el que analizaron bacterias marinas semejantes a las estudiadas por Shewan y col (1960b) y observaron que existían grandes diferencias entre aquéllas adscritas a los grupos I y II de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* y *P. fragi*) y las ubicadas en los grupos III y IV (*P. putrefaciens* y *P. rubescens*). Por ello, y basándose en los resultados obtenidos a partir de los valores G+C y por otras características (fenotípicas), recomendaron la separación de estas dos especies del género *Pseudomonas* y su adscripción al género *Alteromonas* (propuesto por Baumann y col -1972- para agrupar a bacilos curvos móviles, aerobios, denitrificantes, incapaces de hidrolizar la arginina, que necesitaban Na²⁺ para su crecimiento y cuyo hábitat lo constituían el mar abierto o las aguas de zonas costeras) con el nombre de *Alteromonas putrefaciens*. Sin embargo, Baumann y col (1984b), autores del capítulo de *Alteromonas* del Manual de Bergey, sitúan a *A. putrefaciens* como especie “*incertae sedis*”. Más adelante, Van Landschoot y De Ley (1983) observaron una heterogeneidad muy alta entre *A. putrefaciens* y otras *Alteromonas*, la suficiente como para dar a la primera el *estatus* de un género separado. En este sentido, McDonell y Colwell (1985) recomendaron la creación del género *Shewanella* y su inclusión en la familia *Vibrionaceae*, tras analizar la fracción 5S del ARN ribosómico de varias especies de organismos relacionados. Este género estaría constituido por las especies *S. putrefaciens* (especie tipo del género), *S. hanedai* y *S. bentica*, todas ellas bacilos cortos Gram negativos, no pigmentados, móviles, oxidasa positivos y asociados a hábitats acuáticos. En estudios posteriores, Sterntröm y Mölin (1990) demostraron que *S. hanedai* y *S. putrefaciens* estaban poco relacionados entre sí. Simidu y col (1990) describieron una bacteria de origen marino, productora de tetraodotoxina, a la que adscribieron al género *Shewanella* con el nombre de *S. algae*.

Tal y como se muestra en el estudio de Stackebrandt y col (1988), este género (*Shewanella*) aparece situado, dentro de la clase *Proteobacteria*, en la subclase . De Vos y col (1989) lo sitúan en una de las ramas de la superfamilia I de ARNr de la subclase .

El género *Alcaligenes*, aislado en ocasiones a partir de alimentos de origen acuático (Allen y col, 1983b), aparece definido en el Manual de Bergey (Kerstens y De Ley, 1984) como bacilos, cocobacilos o cocos Gram negativos, móviles por la presencia de flagelos peritricos, oxidasa positivos, aerobios estrictos y no pigmentados. Se encuentran principalmente en agua y suelo aunque también se han detectado en material clínico. Baumann y col (1972) encontraron dificultades para diferenciar, empleando únicamente pruebas fenotípicas, las cepas adscritas a este género de las *Pseudomonas*. Añadían, asimismo, que sólo se podía establecer esta diferenciación en base a los valores G+C y a la presencia de flagelos polares o peritricos. Concluyeron afirmando que serían necesarios más estudios antes de establecer la validez de este género. Kersters y De Ley (1984) argumentaron que una de las características más obvias de *Alcaligenes* era su extremadamente limitada acción sobre los hidratos de carbono, si bien esto podría inducir a su confusión con otras especies microbianas. Las especies reconocidas dentro de este género son *A. faecalis* y *A. denitrificans* (con dos subespecies), ambas aisladas a partir del agua, del suelo y de

muestras clínicas. Dentro de las proteobacterias, *Alcaligenes* se encuentra, junto a *Pseudomonas* en la subclase (Stackebrandt y col, 1988).

Entre la flora de pescado recién capturado se han venido aislando cepas pertenecientes al grupo conocido como *Flexibacter-Cytophaga-Flavobacterium* (Acuff y col, 1984; Nedohula y Westhoff, 1993). La taxonomía de este grupo fue objeto de constantes cambios hasta que Mitchell y col (1969) realizaron un exhaustivo trabajo en pos de clarificar su sistemática. Así, definían a *Cytophaga* como bacilos cortos, gram negativos, de morfología microscópica y macroscópica variable, que actuaban sobre polisacáridos y que daban lugar a colonias pigmentadas de color amarillo pálido a oscuro. McMeekin y Shewan (1978) clasificaron el género *Flavobacterium*, y otros géneros relacionados, en dos secciones, la I (inmóviles) y la II (móviles), teniendo como característica común el que desarrollaban colonias amarillentas. Actualmente, se reconoce que este género engloba a microorganismos oxidasa positivos, inmóviles, que dan lugar a pigmentos amarillos, anaranjados o rojos cuando crecen en un medio de cultivo sólido y que tienen diferentes modos de acción sobre la glucosa en condiciones aerobias (Holmes y col, 1984). Algunas antiguas especies incluidas en este género y que presentaban cierta movilidad, aún sin poseer flagelos, fueron incluidas dentro del género *Sphingobacterium* (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992), si bien la diferenciación entre ambos géneros no es muy nítida. A pesar de tratarse de un grupo que contiene tanto cepas móviles como inmóviles, será objeto de atención en el presente capítulo.

Tradicionalmente se ha tratado de encontrar esquemas simples para la identificación y diferenciación de las cepas consideradas como miembros del género *Pseudomonas*, y de las cepas pertenecientes a grupos microbianos afines, del resto de bacterias con las que compartían determinados nichos ecológicos. Así, Thornley (1960) diseñó un esquema que se basaba en el metabolismo de la arginina, de tal manera que eran identificadas como *Pseudomonas* aquellas cepas capaces de hidrolizar la arginina, mientras las cepas negativas para esta propiedad eran adscritas al género *Achromobacter*.

Shewan y col (1960b) desarrollaron un sistema para diferenciar los microorganismos que frecuentemente se encontraban en el pescado de origen marino, tanto en pescado fresco como alterado, si bien consideraron que esta metodología se podía aplicar a microorganismos procedentes de otros ambientes. Consistía en una clave dicotómica que se basaba en la realización de un número reducido de pruebas a través de las cuales se podían llegar a adscribir a nivel de género, e incluso de especie, a los microorganismos objeto de estudio. Las pruebas bioquímicas en las que consistía dicho esquema eran la movilidad, la presencia de la enzima citocromo-c-oxidasa, la pigmentación, la oxidación-fermentación de la glucosa y la sensibilidad al compuesto vibriostático O-129. Por lo que hace referencia a su aplicación en la diferenciación de los distintos tipos de *Pseudomonas*, cabe decir que pudieron subdividir este género microbiano en cuatro grupos. Al grupo I asignaron las cepas que producían fluoresceína. El grupo II incluía a la cepa tipo de *P. fragi*, mientras que los grupos III y IV contenían las cepas tipo de *P. aureofaciens* y *P. rubescens*. Hasta finales de los años setenta y principios de los ochenta se clasificaron e identificaron, mediante este sistema, a los grupos de microorganismos saprofitos de alimentos, agua y tierra, excluyendo a aquéllos que eran patógenos de plantas, animales y a los que eran quimiolitotrofos facultativos (Hendrie y Shewan, 1979).

Palleroni y Doudoroff (1972) afirmaron que la separación de las *Pseudomonas* de otros géneros se basaba en una serie de características arbitrarias, lo cual suponía un problema añadido desde el punto de vista de la identificación. En este mismo sentido, Gray y Stewart (1980) afirmaron que características distintas de la reacción en el medio OF (Hugh y Leifson, 1955) y de la capacidad para producir pigmento fluorescente deberían ser usadas por los microbiólogos para diferenciar a microorganismos Gram negativos, heterótrofos, no fermentativos y con flagelos polares. Stanier y col (1966) y Palleroni y Doudoroff (1972) sentaron las bases para la identificación de las pseudomonas a nivel de especie teniendo en cuenta aquellas propiedades fenotípicas más útiles para la caracterización de dichas especies, lo cual llevaba aparejado la realización de un número creciente de “tests”, con lo cual la consecución de un esquema simple de identificación se hacía más complicada. A pesar de ello se ensayaron nuevos métodos para llevar a cabo la identificación de *Pseudomonas* de un modo sencillo (Hendrie y Shewan, 1979), pero eran limitados a bacterias presentes en hábitats tales como los alimentos, y no siempre se conseguía una separación definitiva entre unas y otras especies.

La utilización de la informática en Microbiología y, concretamente, en taxonomía bacteriana, significó un gran avance cualitativo en la sistemática de bacterias como las Gram negativas aerobias móviles (tanto en lo referente a su clasificación, como en lo referente a su identificación), ya que permitía procesar un gran volumen de datos en un tiempo relativamente reducido. Así, en la taxonomía numérica, la codificación de los datos, el cálculo de los coeficientes de similitud y el agrupamiento de los microorganismos en taxones definidos, entre otras operaciones, se hace con ayuda de equipos informáticos (Sackin y Jones, 1993), existiendo multitud de trabajos en los que se trata la taxonomía de *Pseudomonas* y bacterias relacionadas aisladas en alimentos, mediante estos métodos (p.e. Mölin y Ternström, 1982; Prieto y col, 1992a ; Shaw y Latty, 1982; Sternström y Mölin, 1990). En cuanto a la identificación de bacterias por métodos informáticos, Priest y Williams (1993) afirmaron que se puede llevar a cabo la tradicional caracterización fenotípica de las cepas con la ayuda de un ordenador personal. Con este ánimo, Prieto (1994) desarrolló un programa informático mediante el cual la identificación de bacterias era posible y sencilla de llevar a cabo.

Entre los objetivos contemplados en nuestro estudio está la identificación de los microorganismos Gram negativos aerobios móviles aislados durante el almacenamiento a refrigeración de pescado de agua dulce, haciendo especial hincapié en los representantes del género *Pseudomonas* y en bacterias semejantes a *Pseudomonas* que pudieran ser responsables de la alteración en este tipo de alimentos. Para ello empleamos la identificación microbiana por métodos clásicos asistida por ordenador, la cual fue complementada con la realización de análisis matemáticos para establecer las relaciones fenotípicas entre los microorganismos investigados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas.

En el estudio comprendido en este capítulo y en el siguiente se clasificaron e identificaron un total de 661 cepas de microorganismos adscritos al grupo de bacterias Gram negativas, cepas que se obtuvieron a partir de placas de TSA (Oxoid) utilizadas para el recuento de las floras aerobia mesófila viable y aerobia psicrotrofa viable y que fueron almacenadas en “slants” de este mismo agar a refrigeración tras su obtención en cultivo puro (ver capítulo I de la presente memoria).

Todas las cepas aisladas en el transcurso de dichos análisis fueron sometidas a una serie de pruebas preliminares (que aparecen reflejadas en el capítulo IV) resultando ser bacilos o cocobacilos Gram negativos, catalasa positivos y no esporulados. De acuerdo con lo descrito en dicho capítulo, todas estos aislamientos se subdividieron, siguiendo los esquemas de Shewan y col (1960b), en tres grandes grupos atendiendo, en primera instancia, a su capacidad de producir ácido a partir de la glucosa anaeróbicamente y, en segundo lugar, a su movilidad (ver material y métodos del capítulo IV). Así se obtuvieron, por un lado, un gran grupo de bacterias fermentadoras de la glucosa (tanto oxidasa positivas como oxidasa negativas) que englobaba a vibrionáceas y enterobacteriáceas y, por otro lado, un grupo de bacterias aerobias no fermentadoras de la glucosa. Con estas últimas se ensayó el “test” de la movilidad, de manera que se subdividieron en bacilos Gram negativos aerobios móviles y bacilos Gram negativos aerobios inmóviles.

En la tabla V.1 aparece la distribución de las cepas, aisladas en las muestras de agua y pescado, entre los distintos grupos establecidos del modo descrito anteriormente y en función de la temperatura de aislamiento.

Tabla V.1. Distribución de las cepas de bacilos o cocobacilos Gram negativos catalasa positivos no esporulados en función del grupo microbiano y la temperatura de aislamiento.

	Aerobios móviles	Aerobios inmóviles	Anaerobios facultativos
Mesófilos	146*	50	95
Psicrotrofos	200	56	114
Total	346	106	209

*, número de cepas.

La distribución de las cepas contenidas en cada taxón en función de su origen (especie de pescado) y temperatura de aislamiento se presenta en la tabla V.2.

Tabla V.2. Distribución de las cepas de bacilos o cocobacilos Gram negativos catalasa positivos no esporulados en función de origen (especie de pescado) y temperatura de aislamiento.

	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
Aerobios móviles			
- mesófilos	5	71	70
- psicrotrofos	41	85	74
Aerobios inmóviles			
- mesófilos	4	28	18
- psicrotrofos	7	27	22
Anaerobios facultativos			
- mesófilos	26	8	61
- psicrotrofos	30	15	69

Los microorganismos Gram negativos aerobios móviles se tratarán en el presente capítulo. Por otra parte, los Gram negativos inmóviles y los anaerobios facultativos serán objeto de estudio en el siguiente capítulo.

Las cepas aerobias y móviles se sometieron a identificación clásica (siguiendo los esquemas que más adelante veremos) y a un estudio de taxonomía numérica. Con el objeto de establecer relaciones entre las cepas salvajes y microorganismos conocidos, utilizamos una serie de “cepas tipo” incluidas como patrones internos en el estudio de taxonomía numérica. Estos microorganismos corresponden: a cepas de colección de especies reconocidas como alterantes del pescado, a cepas de otras especies que pudieran tener interés desde el punto de vista de la salud pública, y a otras relacionadas con el hábitat acuático. A continuación se muestra el listado de los organismos de referencia empleados en el presente capítulo:

Pseudomonas aeruginosa CECT 110
Pseudomonas putida CECT 324
Pseudomonas fluorescens CECT 378
Pseudomonas stutzeri CECT 930
Pseudomonas mendocina CECT 320
Pseudomonas fragi CECT 446
Pseudomonas alcaligenes CECT 929
Pseudomonas cepacia CECT 322
Shewanella putrefaciens CECT 331
Alcaligenes faecalis CECT 928
Flavobacterium odoratum CECT 998

Propiedades examinadas en el análisis numérico y empleadas en la identificación clásica.

Las 346 cepas clasificadas previamente como bacilos móviles no fermentadores de la glucosa, así como los once microorganismos tipo, fueron sometidas a un total de 108 pruebas fisiológicas, morfológicas, bioquímicas, nutricionales y de sensibilidad a antibióticos, las cuales aparecen detalladas a continuación.

Morfología en medio sólido. Las distintas cepas se sembraron en Agar Nutritivo (Oxoid) y se incubaron a 30°C durante 48 h. Tras este período, se anotó (Prieto y col, 1992a) la morfología (bordes enteros o irregulares), tamaño (menor de un mm, entre uno y dos mm y mayores de 2 mm), cremosidad y coloración de las colonias (no pigmentadas o con pigmentación amarilla, anaranjada o roja).

Producción de pigmentos fluorescentes en Agar King A (piocianina) y King B (fluoresceína). El medio se formuló de acuerdo a lo descrito en el Manual Oxoid de Medios de Cultivo (Anon., 1990). Las cepas se sembraron por agotamiento en la superficie del medio sólido, se incubaron a 30°C y se procedió a la lectura de los resultados a las 24 y 48 h. Tras este periodo, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente y, a los cinco días, se repitieron las lecturas. La presencia de pigmento fluorescente se detectaba empleando una lámpara de Wood. Así, el pigmento producido en King A (piocianina) se hacía visible empleando una longitud de onda de 365 nm (coloración verde-azulada). La producción de fluoresceína en el agar King B se detectaba empleando una longitud de onda de 254 nm (coloración verde-amarillenta).

Crecimiento a distintas temperaturas. Se examinó la capacidad que tenían las cepas de crecer a temperatura de refrigeración (4°C), así como a 37 y a 42°C. El medio utilizado fue Caldo Nutritivo (Oxoid) y las incubaciones se llevaron a cabo en baños de precisión. Las lecturas se realizaron a los diez días (para la incubación realizada a 4°C) y a las 48 h (para el “test” a 37 y 42°C). Los tubos que presentaban una turbidez manifiesta tras agitarlos suavemente fueron calificados como positivos (Mölin y Ternström, 1982).

Tolerancia a distintas concentraciones de NaCl. Para ello se utilizó Caldo Nutritivo (Oxoid) al que se le añadió NaCl hasta lograr concentraciones finales del 3% y del 6% (p/v). Tras la inoculación, los tubos se incubaron a 30°C y se efectuaron lecturas a las 24 y 48 h. Todos los tubos que, tras agitación, mostraban turbidez fueron registrados como positivos (Prieto y col, 1992a).

Crecimiento a pH 4.5. Tubos conteniendo Caldo Nutritivo (Oxoid), cuyo pH había sido previamente ajustado a 4.5, fueron inoculados con la cepa problema e incubados 48 h a 30°C. Tras este periodo, las cepas capaces de crecer bajo estas condiciones presentaban una turbidez aparente (Prieto y col, 1992a).

Crecimiento en Agar McConkey (Oxoid). Consistía en la siembra de las cepas problema, seguida de incubación a 30°C durante 48 h. La presencia de crecimiento en la zona de inoculación (independientemente de la coloración que presentaba la colonia) fue registrada como positiva.

Crecimiento en Agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, Difco). Se realizó de modo análogo al anterior pero con períodos de incubación más largos (hasta 7 días). Los resultados se interpretaron tal y como se señala en el “test” de crecimiento en Agar McConkey.

Actividad citocromo-c-oxidasa. A partir de un cultivo de 24 h en Agar Nutritivo (Oxoid) y añadiendo unas gotas del reactivo de Kovac`s (descrito en capítulos anteriores -Cowan, 1974-) se visualiza esta actividad enzimática, al aparecer, en unos segundos, color púrpura en la superficie de las colonias.

Crecimiento en Agar Citrato de Simmon (Oxoid). El medio se dispensó en tubos y se dejó solidificar de manera que su superficie quedase inclinada (formando un pico de flauta o “slant”). A continuación, las cepas se sembraron en dicha superficie y se incubaron a 30°C durante 48 h, periodo tras el cual se efectuaron las lecturas. El medio se tornaba de color azulado cuando las cepas eran capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono.

Producción de H₂S a partir de L-cisteína. En Caldo Nutritivo al que se adicionó cisteína (ver estudio taxonómico del género *Aeromonas*). En este caso, las incubaciones se realizaron a 30°C durante 72 h. El ennegrecimiento de las tiras de acetato de plomo fue indicativo de esta producción

Actividades α y β -hemolítica. Se realizó en placas de Agar Columbia (Oxoid) suplementado con sangre de oveja (Oxoid) al 5%. El método empleado y la interpretación de los resultados aparece detallada en el capítulo II.

Hidrólisis de la esculina. Se empleó el medio Agar Esculina (Cowan, 1974) de modo análogo al descrito en el estudio taxonómico del género *Aeromonas*. Las cepas que hidrolizaban este compuesto daban lugar a un ennegrecimiento alrededor de las colonias.

Producción de indol. En esta prueba se empleó Caldo Nutritivo (Oxoid) debido a que entre sus componentes se encuentra la peptona y, por tanto, el triptófano, aminoácido a partir del cual algunos microorganismos producen indol. El periodo de incubación (30°C) fue de 48 h, tras el cual a los tubos se les añadieron unas gotas del reactivo de Kovac`s (Cowan, 1974). La presencia de indol se manifestaba por la aparición de un anillo de color rojo teja en la superficie del medio.

Producción de levano a partir de sacarosa. Esta prueba fue llevada a cabo empleando el Agar Sacarosa, descrito por Lelliot y col (1966). La sacarosa era añadida, a una concentración final del 5%, a Agar Nutritivo (Oxoid). La siembra se realizó en “spot” y las placas se incubaron hasta siete días a 30°C. El levano producido aparecía con aspecto mucoso en la superficie de la zona sembrada.

“Test” del rojo de metilo y producción de acetoina a partir de la glucosa (prueba de Voges-Proskauer). Para la realización de ambas pruebas se utilizó el medio MRVP (Oxoid) siguiendo el esquema descrito en el capítulo II. En breve, la acidificación del medio (“test” RM) se caracterizaba por el mantenimiento de un color rojizo tras añadir una solución de rojo de metilo, mientras que la transformación de la glucosa en acetoina se manifestaba con la

aparición de un anillo rojizo en el medio tras alcalinizarlo y adicionar el reactivo de α -naftol (Cowan, 1974).

Oxidación del gluconato. Se empleó el Caldo Gluconato (Cowan, 1974). Los tubos sembrados se incubaron a 30°C durante 48 h. La reacción se visualizó tras añadir 1 ml de la solución cualitativa de Benedict (Cowan, 1974) y hervir los tubos durante 15 minutos. Los tubos que presentaron coloraciones anaranjadas fueron calificadas como capaces de oxidar el gluconato sódico (Cowan, 1974).

Reducción del óxido de trimetilamina a trimetilamina. Para preparar el medio TMAO y llevar a cabo este "test" se siguieron las instrucciones de Gram y col (1987). Una vez inoculados los tubos, a cada uno se le añadió un tapón de parafina y se incubaron a 30°C durante tres días. El viraje del indicador hacia el color amarillo indicaba la reducción del óxido de trimetilamina a trimetilamina. Asimismo, también se observaba la producción de ácido sulfhídrico (ennegrecimiento del medio) a partir de tiosulfato sódico, pero este carácter no se tuvo en cuenta para el estudio de taxonomía numérica.

Reducción de nitratos a nitritos y a NO_2 . Para ello se utilizó el Caldo Nitrato (Difco). Los tubos inoculados, los cuales contenían campanas de Durham invertidas, se incubaron a 30°C durante cinco días, periodo tras el cual los resultados se hicieron visibles empleando la metodología descrita a continuación (Cowan, 1974). Los tubos que contenían cepas capaces de reducir los nitratos a nitritos adquirirían un color rojo intenso tras la adición de un reactivo (mezcla a partes iguales de una solución acuosa de ácido sulfanílico en ácido acético y una solución acuosa de α -naftilamina en ese mismo ácido). A los tubos cuya coloración permaneció invariable se les añadió polvo de zinc. Si los microorganismos no actuaban sobre los nitratos al añadir polvo de zinc el medio se tornaba de color rojo. Si, por el contrario, no se modificaba su coloración, la totalidad del nitrato contenido en el medio antes de la inoculación de la cepa correspondiente había sido transformado en óxido nitroso, hecho que, por otra parte, se manifestaba por la presencia de gas en las campanas de Durham. La denitrificación, transformación de los nitratos en NO_2 , fue el único carácter tenido en cuenta en el análisis matemático llevado a cabo y en la identificación subsiguiente.

Prueba de la hidrólisis del ONPG. Como primer paso, las cepas se sembraron en un medio sólido (Agar Nutritivo -Oxoid-), al que se le había adicionado lactosa al 1% con el fin de estimular su actividad enzimática α -galactosidasa, y se incubaron a 30°C durante 24 h. Tras la incubación, y con ayuda de un asa de platino, se recogieron cinco colonias y se suspendieron en solución salina al 0,85%. Finalmente, se añadieron discos de ONPG (Oxoid) a cada uno de los tubos y se efectuaron lecturas a los quince minutos y a las seis horas de incubación a 30°C. La presencia de tonalidad amarilla en los tubos era indicativa de actividad α -galactosidasa.

Hidrólisis del almidón. Siguiendo la técnica de Mölin y Ternström (1982), se prepararon placas de Agar Almidón (Agar Nutritivo -Oxoid- al que se añadía almidón al 0,3%). Una vez sembradas se incubaron a 30°C durante 48 horas. Para visualizar las zonas donde el almidón había sido hidrolizado, las placas se inundaron con una solución de lugol de media fuerza.

Hidrólisis de la tirosina. El Agar Tirosina se preparó de acuerdo con Mölin y Ternström (1982). La tirosina se adicionó a Agar Nutritivo (Oxoid) hasta obtener una concentración final del 5%. La incubación a 30°C se prolongó hasta los siete días realizando lecturas periódicas en las que se anotó, no sólo la existencia de áreas de aclaramiento (correspondientes a la hidrólisis de la tirosina), sino también la presencia de una pigmentación parda-rosácea alrededor de las zonas de crecimiento (Mölin y Ternström, 1982).

Hidrólisis del hipurato. El Agar Hipurato se formuló siguiendo las instrucciones de Mölin y Ternström (1982), obteniéndose una concentración final de hipurato sódico del 3% en el medio. La aparición de coloración rosada alrededor de las zonas de crecimiento, tras un periodo de incubación de hasta siete días a 30°C, era registrada como resultado positivo (Mölin y Ternström, 1982).

Hidrólisis de la urea. Para este “test” se utilizó el Agar Urea de Christiansen. Al Agar Base para Urea (Oxoid) se le añadieron ampollas de urea (Oxoid) en las cantidades recomendadas por el fabricante. El medio se dejó solidificar con los tubos colocados en posición inclinada. A continuación, y con ayuda de un asa de cultivo, se inoculaba el organismo problema en la superficie del “pico de flauta”, en la zona inclinada. En aquellos tubos en los que las cepas eran capaces de hidrolizar la urea, el indicador viraba hacia un color rosa, tras una incubación máxima de 48h. Las lecturas se efectuaron cada 24 h.

Producción de ácido a partir de la glucosa. Este método, ya descrito en el capítulo II, se realizó empleando como medio base el medio OF de Hugh y Leifson (Difco) al que se le adicionaba glucosa (Sigma) al 1%, si bien en este caso únicamente se computó el resultado correspondiente a las condiciones de aerobiosis, ya que partíamos de cepas incapaces de crecer producir ácido anaeróbicamente. La incubación se realizó a 30°C y se procedió a su lectura a las 24 h (Cowan, 1974). Eran positivas aquellas cepas que provocaban un viraje en el indicador hacia el color amarillo.

Producción de gas a partir de la glucosa. Se comprobó en un medio líquido al que se le adicionaba glucosa y empleando campanas de Durham sumergidas en la profundidad del mismo. La preparación del medio ha sido detallada en el capítulo II. En este caso, la incubación a 30°C se prolongó hasta los siete días, realizándose lecturas periódicas cada 24 horas y anotándose la aparición de burbujas de gas en el interior de las campanas como reacción positiva (Cowan, 1974).

Producción de ácido a partir de distintos azúcares. Como medio base se empleó Caldo Púrpura (Difco) al que se le añadieron soluciones acuosas, previamente esterilizadas por filtración, de los siguientes azúcares: adonitol, almidón, L-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, *meso*-inositol, lactosa, maltosa, manitol, D-manosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, D-ribosa, sacarosa, salicina, sorbitol, L-sorbosa, trealosa, xilitol y D-xilosa. La concentración final de estos azúcares en el medio base fue del 1%. El medio conteniendo cada azúcar se distribuyó en placas de microtítulo (Anon, 1978) que se sembraron automáticamente, con ayuda de un multiinoculador Ridgway Watt AM 80 (Dynatech, Billingshurst, England) con un cabezal de 96 puntas, a partir de una placa “madre” que contenía las distintas cepas problema suspendidas en solución salina al 0,85% (Prieto y col, 1992a). Tras la inoculación se procedió a la incubación (30°C) y se realizaron lecturas

periódicas a las 12, 24 y 48 horas (Cowan, 1974). Aquellos pocillos que exhibieron viraje en el color del indicador (púrpura de bromocresol) hacia amarillo, como consecuencia de la producción de ácido a partir del azúcar correspondiente, se anotaron como positivos.

Crecimiento en presencia de una sola fuente de carbono. Como medio base se utilizó el descrito por Mölin y Ternström (1982), pero obviando el agar en su formulación. A continuación se le añadieron soluciones acuosas, previamente esterilizadas por filtración, de los siguientes compuestos hasta alcanzar una concentración final del 0,13%: adonitol, almidón, D-arabinosa, L-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, gluconato, *meso*-inositol, lactosa, maltosa, manitol, D-manosa, ramnosa, sacarosa, salicina, sorbitol, trealosa, xilitol, L-arginina, L-cisteína, L- lisina, glicocola, formiato sódico, alcohol butílico y etanol. La siembra se realizó de manera análoga a la del estudio de la producción de ácido a partir de azúcares. Las placas se incubaron a 30°C y se realizaron lecturas periódicas a las 48 h y a los siete días con el fin de detectar turbidez, manifestación de la capacidad de los distintos microorganismos de crecer en presencia del sustrato ensayado como una única fuente de carbono (Prieto y col, 1992a).

Descarboxilación de L-lisina y L-ornitina e hidrólisis de la L-arginina. Como medio base se empleó el medio Möller para descarboxilaciones (Difco). El procedimiento empleado ha sido descrito en el capítulo II. La incubación a 30°C se prolongó hasta el momento en que se produjeron virajes en el color de los tubos utilizados como control.

Hidrólisis del ADN. En Agar DNAsa (Oxoid). La descripción del método empleado aparece en el capítulo II.

Actividad lipolítica sobre distintos sustratos. Se investigó la capacidad de los distintos microorganismos para hidrolizar los siguientes compuestos en medio sólido: Tween 20, Tween 80, tributirina y lecitina (reacción de la yema de huevo). En todos los casos las placas se incubaron hasta un máximo de siete días. Los procedimientos empleados aparecen descritos en capítulos anteriores.

Aclaramiento de la yema de huevo. Con esta prueba se pretendía evidenciar la actividad proteolítica sobre este sustrato, que se caracteriza por la aparición, alrededor de la zona de crecimiento, y tras una incubación a 30°C durante siete días, de un área de aclaramiento. Para ello se utilizan el medio y el protocolo descritos para el estudio de la actividad lipolítica (fosfolipasa) sobre la lecitina (Mölin y Ternström, 1982). Las lecturas se realizaron cada 24 h.

Actividad proteolítica sobre distintos sustratos. Los compuestos objeto de estas pruebas fueron los siguientes: elastina, caseína y gelatina. Los métodos empleados en cada caso aparecen descritos descritos en el capítulo de identificación de *Aeromonas*. Para la caseína y gelatina, la incubación a 30°C se prolongó hasta los siete días.

Resistencia al agente vibriostático O-129. Mediante la colocación, en medio sólido (ver capítulo II), de un disco de O-129 de 150µg (Oxoid). La presencia de halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco se interpretaba como sensibilidad a dicho agente antimicrobiano (Hendrie y Shewan, 1979).

Análisis numérico de los datos.

Un total de 108 caracteres cuantitativos se codificaron como: 0, negativo; 1, positivo, y 2, prueba no realizada o resultado de difícil interpretación. El coeficiente de similitud (SSM - Sokal y Michener, 1958-) se obtuvo entre cada par de cepas empleando programas en BASIC desarrollados por Prieto (1994). El agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) se consiguió con el programa SPSS/PC+ V3.1 (SPSS Inc., Chicago).

También se calcularon el coeficiente de correlación (r) entre la matriz de similitud y los niveles en el fenograma derivados de los de la matriz (correlación cofenética; Sneath, 1978a) empleando el programa NTSYS-pc V1.80 (Exeter Software, New York). Las tablas de frecuencia se generaron mediante el programa LOTUS 1,2,3 V2.0 (Lotus Development Corporation, Texas) y fueron empleadas para determinar los caracteres más discriminantes (Sneath, 1978a).

Reproducibilidad.

Todas las pruebas se repitieron en un 10% de las cepas (treinta y cinco). La probabilidad media de error (p) se calculó de acuerdo con lo especificado por Sneath y Johnson (1972).

Identificación clásica asistida por ordenador.

Se utilizó el programa de identificación diseñado por Prieto (1994). Para ello se tuvieron en cuenta las pruebas consideradas como más discriminantes entre los grupos resultantes de nuestro estudio de taxonomía numérica, así como aquéllas de mayor valor taxonómico y que aparecen recogidas en el Manual de Bergey (Palleroni, 1984). Es decir, se emplearon un total de 72 de los 108 criterios taxonómicos introducidos en el análisis matemático y que aparecen señalados a continuación: prueba de la oxidasa, producción de pigmento amarillo, producción de fluoresceína, crecimiento a 4 y 42°C, crecimiento en presencia de 3 y 6% de NaCl, tolerancia a pH 4.5, crecimiento en Agar Citrato de Simmon, producción de indol, producción de H₂S, hidrólisis de la urea, reducción de los nitratos a NO₂, producción de levano y reducción del OTMA; producción de ácido a partir de: glucosa, L-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, galactosa, glicerol, maltosa, manitol, manosa, ramnosa, D-ribosa, sacarosa, almidón, trealosa y D-xilosa; asimilación de: adonitol, L-arabinosa, D-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, galactosa, glicerol, glucosa, gluconato, maltosa, manitol, manosa, ramnosa, sacarosa, almidón, trealosa, D-xilosa, glicocola, L-arginina, cisteína, L-lisina, alcohol butílico, etanol y formiato sódico; hidrólisis del Tween 20, del Tween 80, de la tributirina, reacción de la yema de huevo, aclaramiento de la yema de huevo, hidrólisis de la gelatina, de la caseína, de la elastina y del ADN; hemólisis y ; hidrólisis de la tirosina y producción de pigmento rosado en el Agar Tirosina; hidrólisis del almidón, de la esculina y del hipurato; actividades -galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.

Paralelamente se preparó una base de datos que recogía los resultados obtenidos por otros autores en distintos estudios taxonómicos sobre cepas aisladas a partir de alimentos diversos (Allen y col, 1983b; Cox y McRae, 1989; Gillespie, 1981; Mölin y Ternström, 1982, 1986a; O'Connor y col, 1986; Shaw y Latty, 1982; Shelley y col, 1987; Sternström y Mölin, 1990; Ternström y col, 1993) así como de las descripciones de las especies de *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium* que aparecen en el Manual de Bergey (Holmes y col, 1984; Kersters y De Ley, 1984; Palleroni, 1984). Los perfiles fenotípicos obtenidos por nosotros para cada cepa (y/o HMO -organismo medio hipotético o centroide de cada taxón- en su caso) fueron comparados con la base de datos a la que acabamos de hacer referencia. A cada una de nuestras cepas se la relacionó, al menos, con uno de los géneros introducidos en la base de datos. Como resultado de dicha comparación se obtuvieron los valores NS (“normalized score” o cociente normalizado -Willcox y col, 1973-) que definían la proximidad entre la descripción de una cepa salvaje y la del perfil introducido en la base de datos.

RESULTADOS

En la figura V.1 aparece la distribución porcentual y el número de cepas (a continuación del género) correspondientes a cada uno de los géneros englobados en este grupo de bacterias aerobias, y que han sido aislados e identificados en el transcurso del presente estudio. Asimismo se incluyen las cepas que no se pudieron adscribir a ninguno de dichos géneros (NI). De este mismo modo, y en la figura V.2, se presentan los datos correspondientes a las especies de *Pseudomonas*.

Figura V.1. Géneros de microorganismos Gram negativos aerobios móviles en pescado de agua dulce.

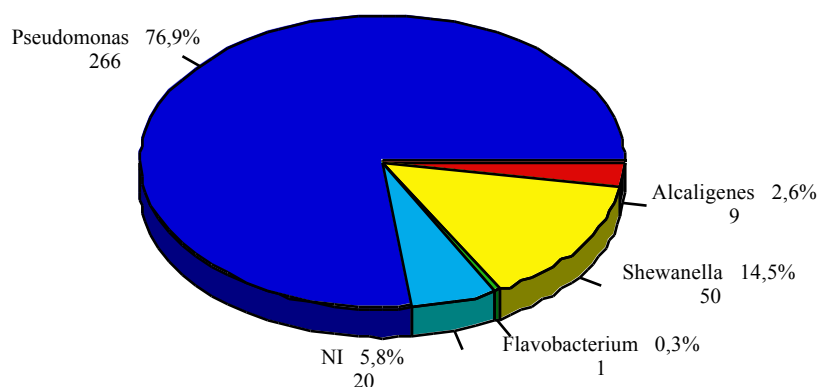
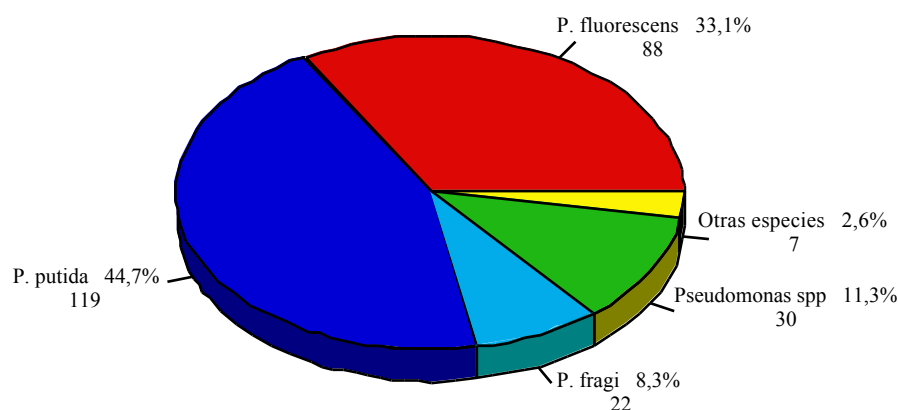
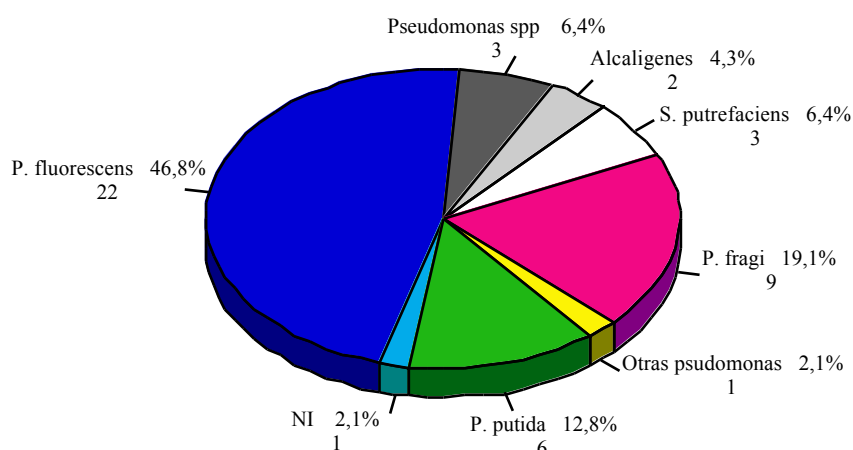


Figura V.2. Especies de *Pseudomonas* aisladas a partir de las muestras de pescado de agua dulce.

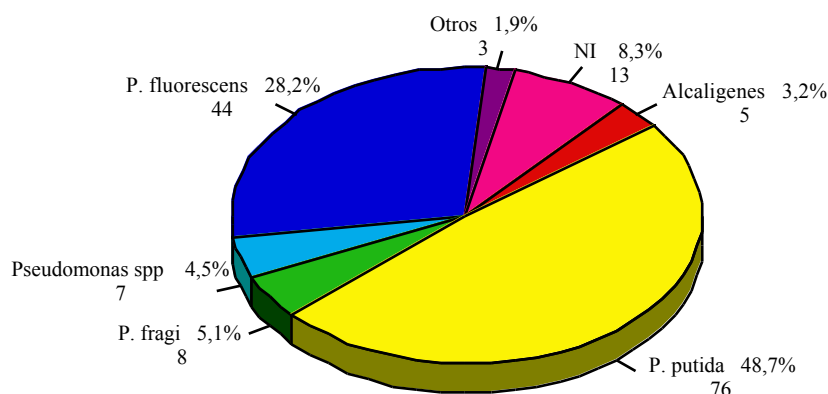


Las cepas contenidas dentro del epígrafe "otras especies" corresponden a: *P. syringae* (2 cepas), *P. pseudoalcaligenes* (2), *P. solanacearum* (1), *P. caryophilli* (1) y *P. pseudomallei* (1).

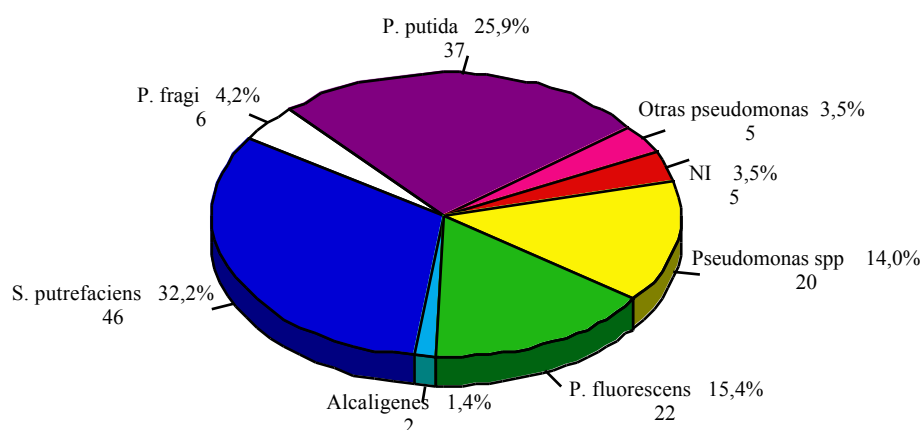
En las siguientes figuras se puede observar la distribución porcentual (y el número de cepas -a continuación del género-) de las especies microbianas aisladas: en cada una de las especies de pescado de agua dulce analizadas (figuras V.3 a V.5), en las muestras de pescado analizadas a lo largo del almacenamiento a refrigeración (figuras V.6 a V.8) y en los recuentos de mesófilos y psicrotrofos (figuras V.9 a V.10).

Figura V.3. Distribución de especies microbianas aisladas en trucha común.

Las cepa contenida dentro del epigrafe "otras pseudomonas" corresponde a P. syringae (1 cepa).

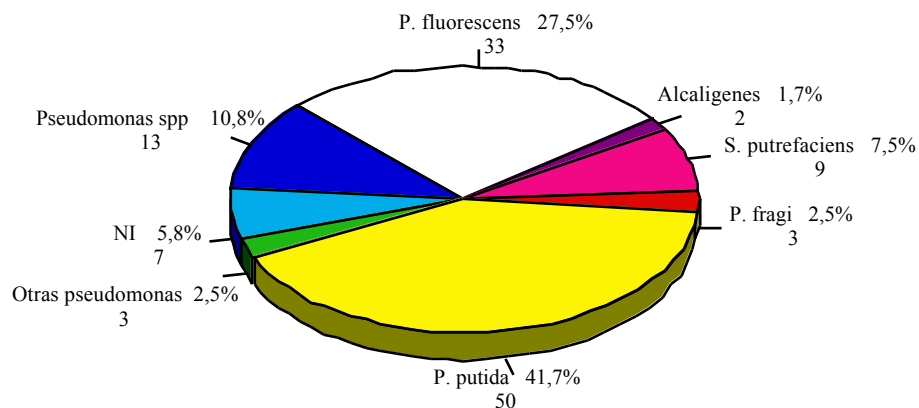
Figura V.4. Distribución de especies microbianas aisladas en trucha arco iris.

Otros: representan a S. putrefaciens (una cepa), Flavobacterium (1) a P. caryophilli (1).

Figura V.5. Distribución de especies microbianas aisladas en lucio.

Las cepas contenidas dentro del epigrafe "otras pseudomonas" corresponden a: P. syringae (1 cepa), P. pseudoalcaligenes (2), P. solanacearum (1) y P. pseudomallei (1).

Figura V.6. Distribución de las especies microbianas aisladas en muestras de piel.



Las cepas contenidas dentro del epígrafe "otras pseudomonas" corresponden a *P. syringae* (1 cepa), *P. pseudoalcaligenes* (1), y *P. pseudomallei* (1).

Figura V.7. Distribución de las especies microbianas aisladas en muestras de cavidad abdominal.

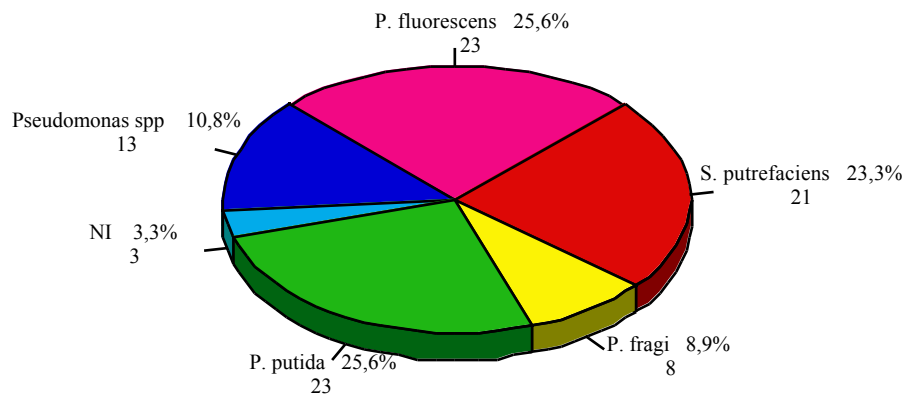
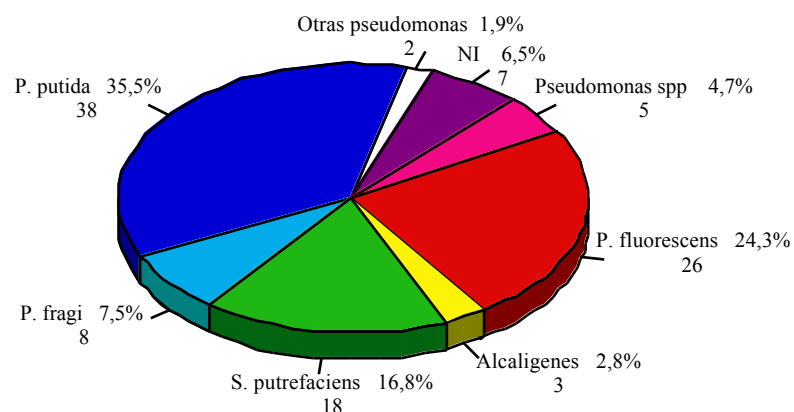
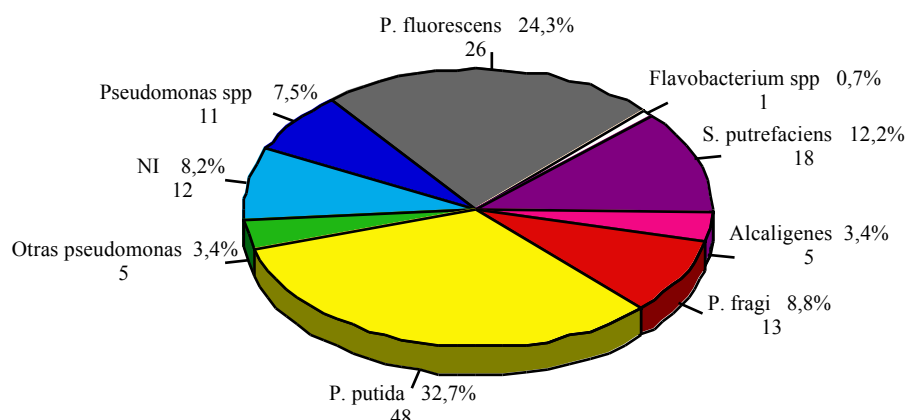


Figura V.8. Distribución de las especies microbianas aisladas en muestras de tejido muscular.



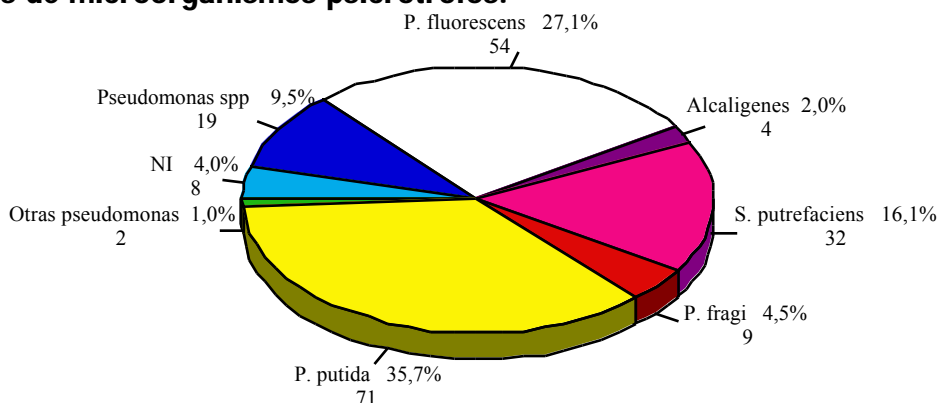
Las cepas contenidas dentro del epígrafe "otras pseudomonas" corresponden a *P. syringae* (1 cepa) y *P. solanacearum* (1).

Figura V.9. Especies microbianas aisladas de las placas empleadas para los recuentos de microorganismos mesófilos.



Las cepas contenidas dentro del epígrafe “otras pseudomonas” corresponden a: *P. pseudoalcaligenes* (1), *P. solanacearum* (1), *P. caryophylli* (1) y *P. pseudomallei* (1).

Figura V.10. Especies microbianas aisladas de las placas empleadas para los recuentos de microorganismos psicrotrofos.



Las cepas contenidas dentro del epígrafe “otras pseudomonas” corresponden a: *P. syringae*.

En la tabla V.4 se presenta el número de cepas de cada especie aisladas en las muestras del agua de cría del pescado y en agallas e intestino del pescado recién capturado.

Tabla V.4. Cepas aisladas en agua de cría, agallas e intestino de pescado.

	Agua	Agallas	Intestino
<i>P. fluorescens</i>	2*	1	3
<i>P. putida</i>	2	2	4
<i>P. fragi</i>	1	1	1
<i>P. pseudoalcaligenes</i>			1
<i>P. caryophylli</i>	1		
<i>S. putrefaciens</i>	1	1	
<i>Alcaligenes</i> ⁽¹⁾	2		2
NI	2		1

*, número de cepas; ⁽¹⁾ incluye a las cepas de las especies *A. faecalis* y *A. denitrificans*.

En la tabla que aparece a continuación (V.5) se muestran el número de cepas correspondientes a cada biovar descrito de *P. fluorescens* y de *P. putida* y su distribución entre las especies de pescado analizadas.

Tabla V.5. Número de cepas identificadas como pertenecientes a los distintos biovars de *P. fluorescens* y *P. putida* y distribución por especie de pescado.

Biovariedad	Total	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
<i>P. fluorescens</i> *	5	2	2	1
<i>P. fluorescens</i> I	12	9	3	
<i>P. fluorescens</i> III	37	4	21	12
<i>P. fluorescens</i> V	34	7	18	9
<i>P. putida</i> *	57	2	43	12
<i>P. putida</i> A	50		26	24
<i>P. putida</i> B	12	4	7	1

*, cepas pertenecientes a biovars desconocidos o con propiedades intermedias entre los biovars descritos (Palleroni, 1984).

En las figuras V.11 y V.12 se aprecia la distribución porcentual de las distintas especies microbianas cuando el pescado comenzaba a presentar signos claros de alteración (día 12) y cuando ésta era manifiesta (día 15) respectivamente

Figura V.11. Distribución de especies microbianas cuando se presentaban los primeros signos de alteración.

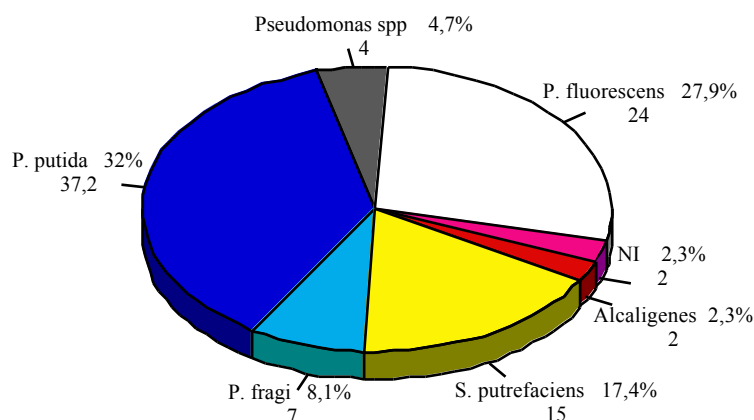
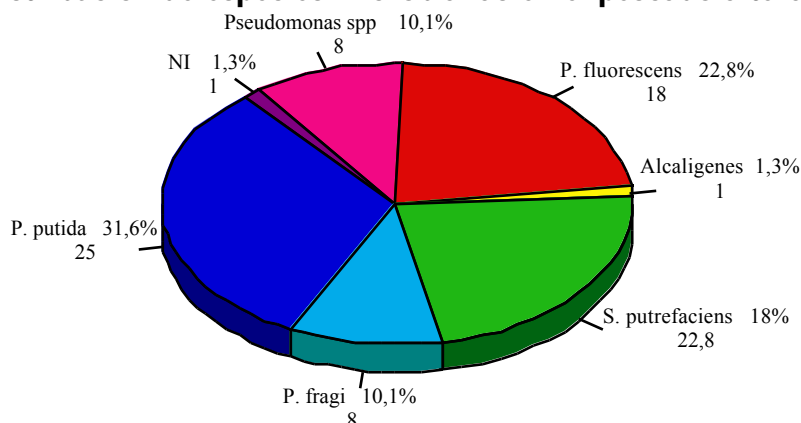


Figura V.12. Distribución de especies microbianas en el pescado alterado.

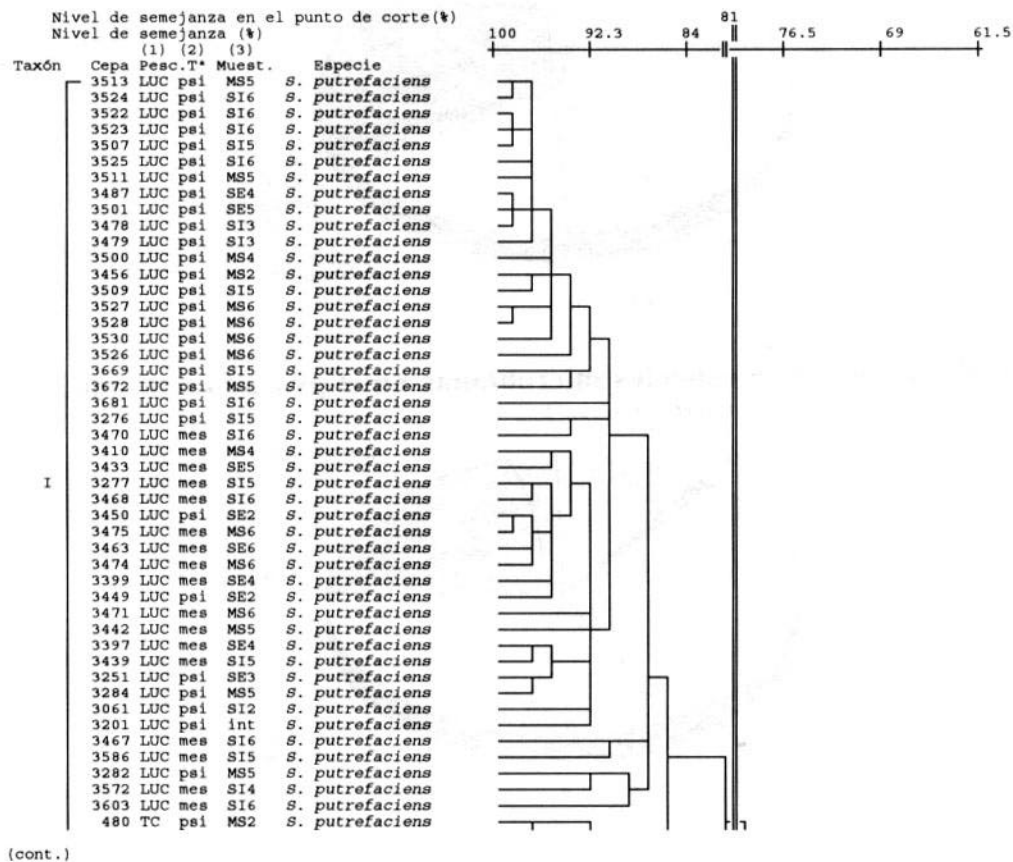


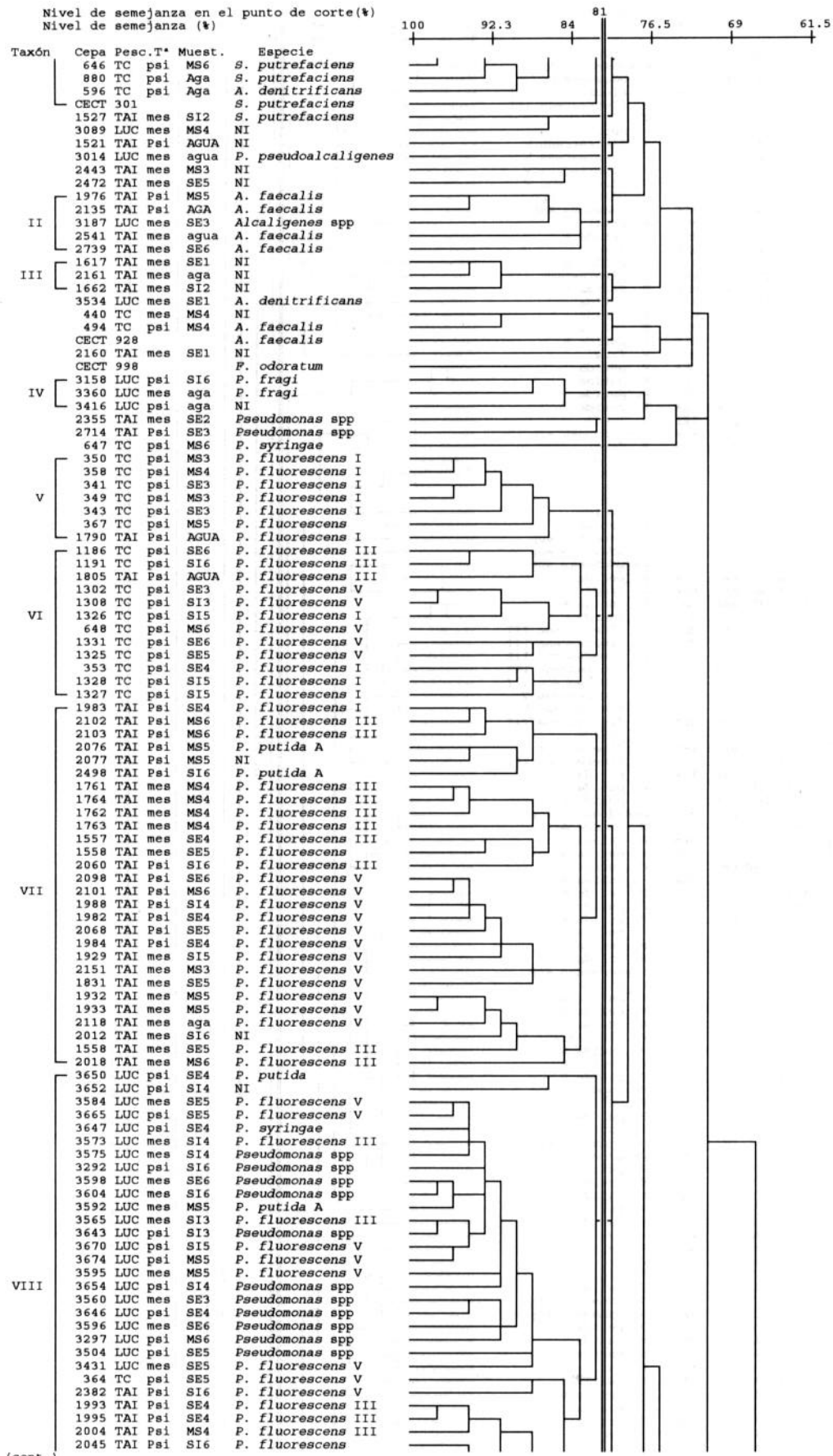
Todas las cepas incluidas en el presente estudio eran bacterias Gram negativas no cocoides, inmóviles, catalasa positivas, incapaces de fermentar la glucosa y que no requerían factores de crecimiento para su desarrollo. Tal y como se observa en la figura V.13, a un nivel

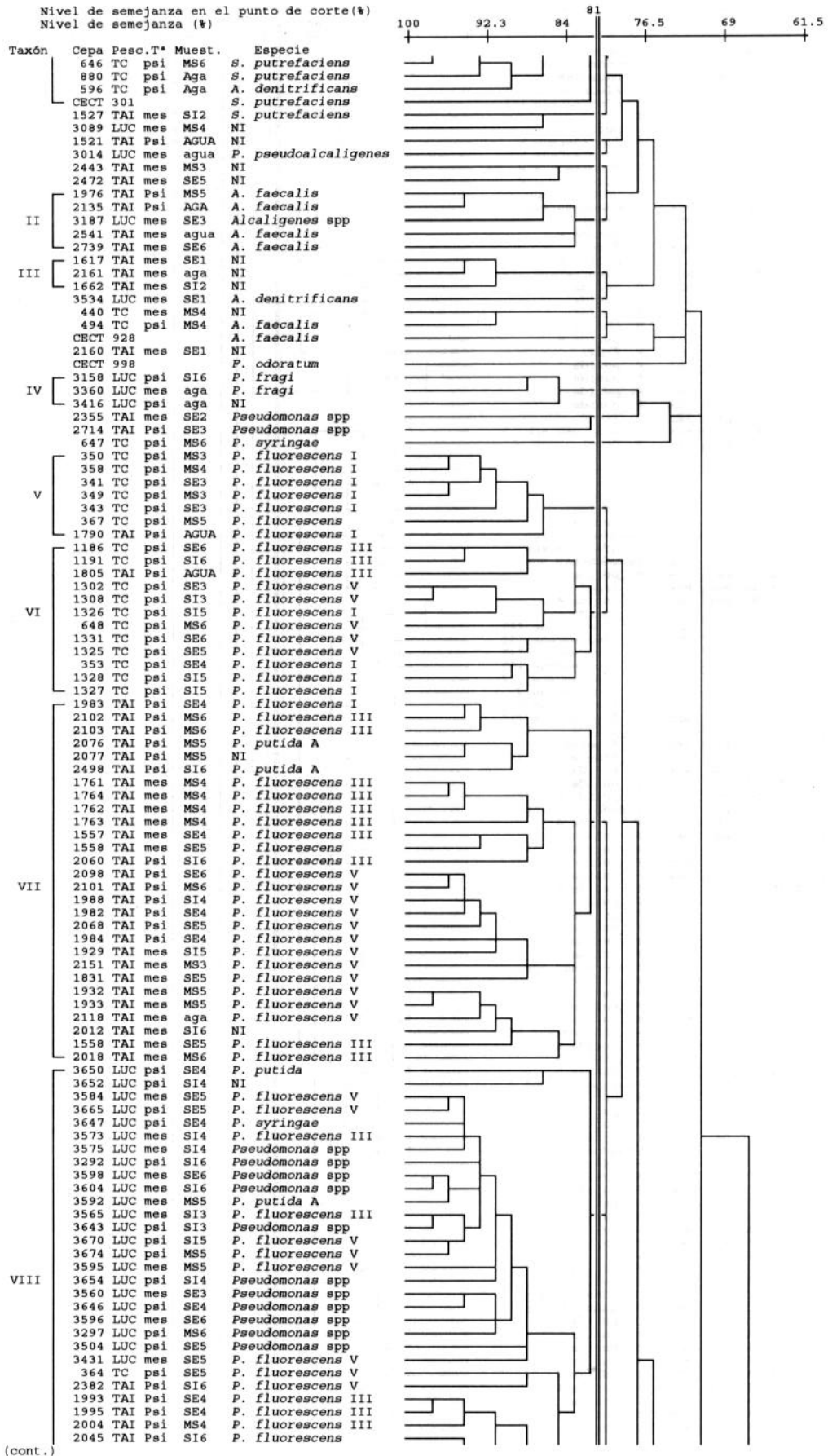
de semejanza del 81% empleando el coeficiente de similitud S_{SM} ("Simple matching coefficient"), 324 cepas se agruparon en un total de 26 taxones, de los cuales 10 estuvieron constituidos por menos de tres cepas (taxones no significativos). El resto de los agrupamientos (taxones significativos) los subdividimos en taxones mayoritarios, que contenían más de diez cepas (un total de 7), y en taxones minoritarios, que incluían menos de diez cepas (nueve agrupamientos). Las restantes 33 cepas (entre ellas siete cepas tipo) no se agruparon al anteriormente mencionado nivel de semejanza. Únicamente la cepa tipo de *S. putrefaciens* se incluyó en alguno de los taxones significativos, mientras *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* formaron un taxón no significativo y *P. fragi* se agrupó con una cepa salvaje en otro taxón no significativo. Las restantes cepas tipo no contenidas en los taxones establecidos se agruparon con el resto a unos niveles de semejanza comprendidos entre el 64 y el 80%. En la figura V.14 se muestra la representación gráfica simplificada del dendrograma que aparece en la figura V.13.

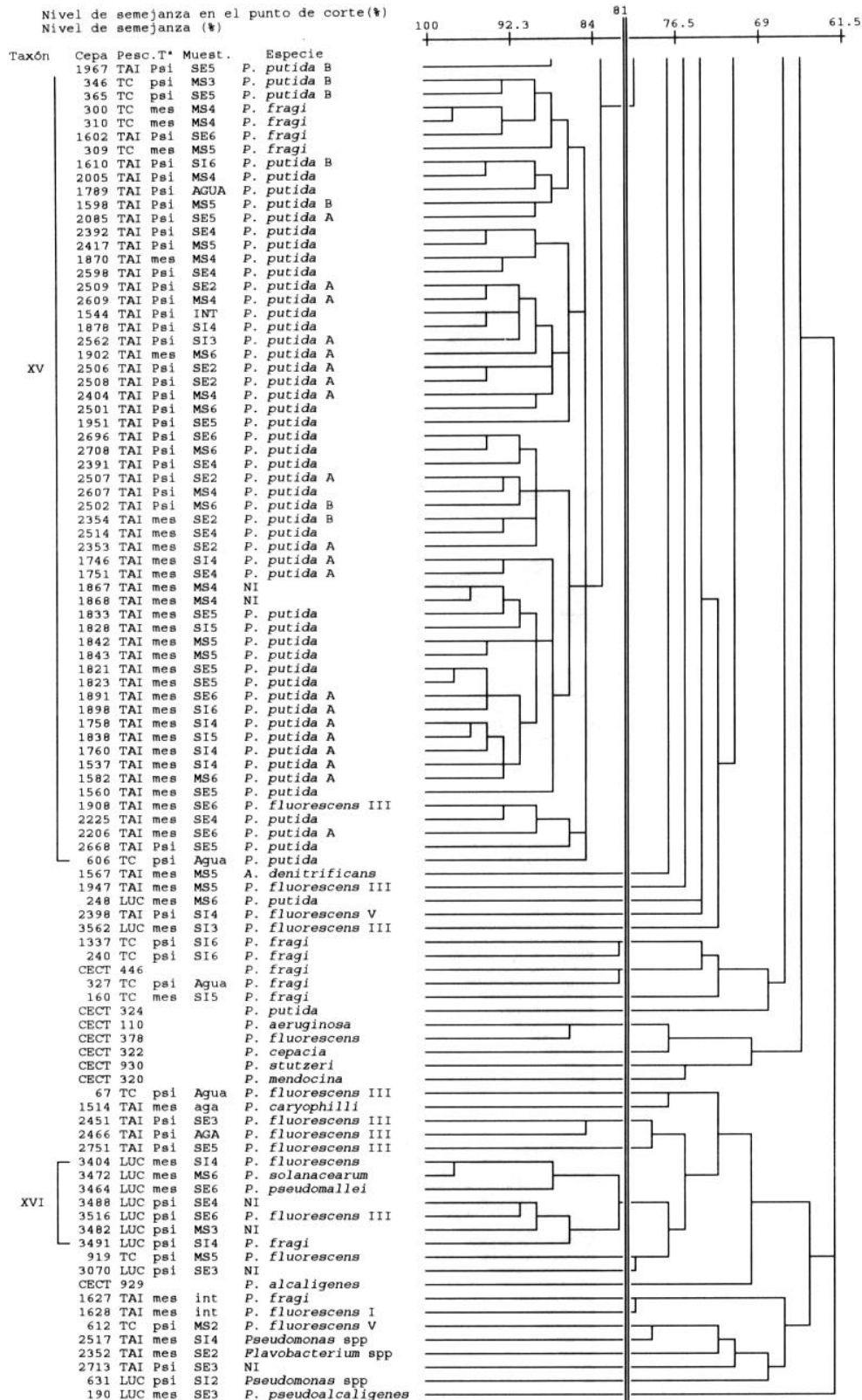
El coeficiente cofenético r fue igual a 0.82431, valor que nos indica que no se produce una distorsión significativa de la matriz triangular de similitudes al comparar dicha matriz con la obtenida al aplicar el agrupamiento UPGMA.

Figura V.13. Dendrograma resultante del análisis numérico de cepas de microorganismos Gram negativos aerobios móviles aislados de pescado de agua dulce. Coeficiente S_{SM} . Agrupamiento UPGMA. Nivel de corte: 81%.



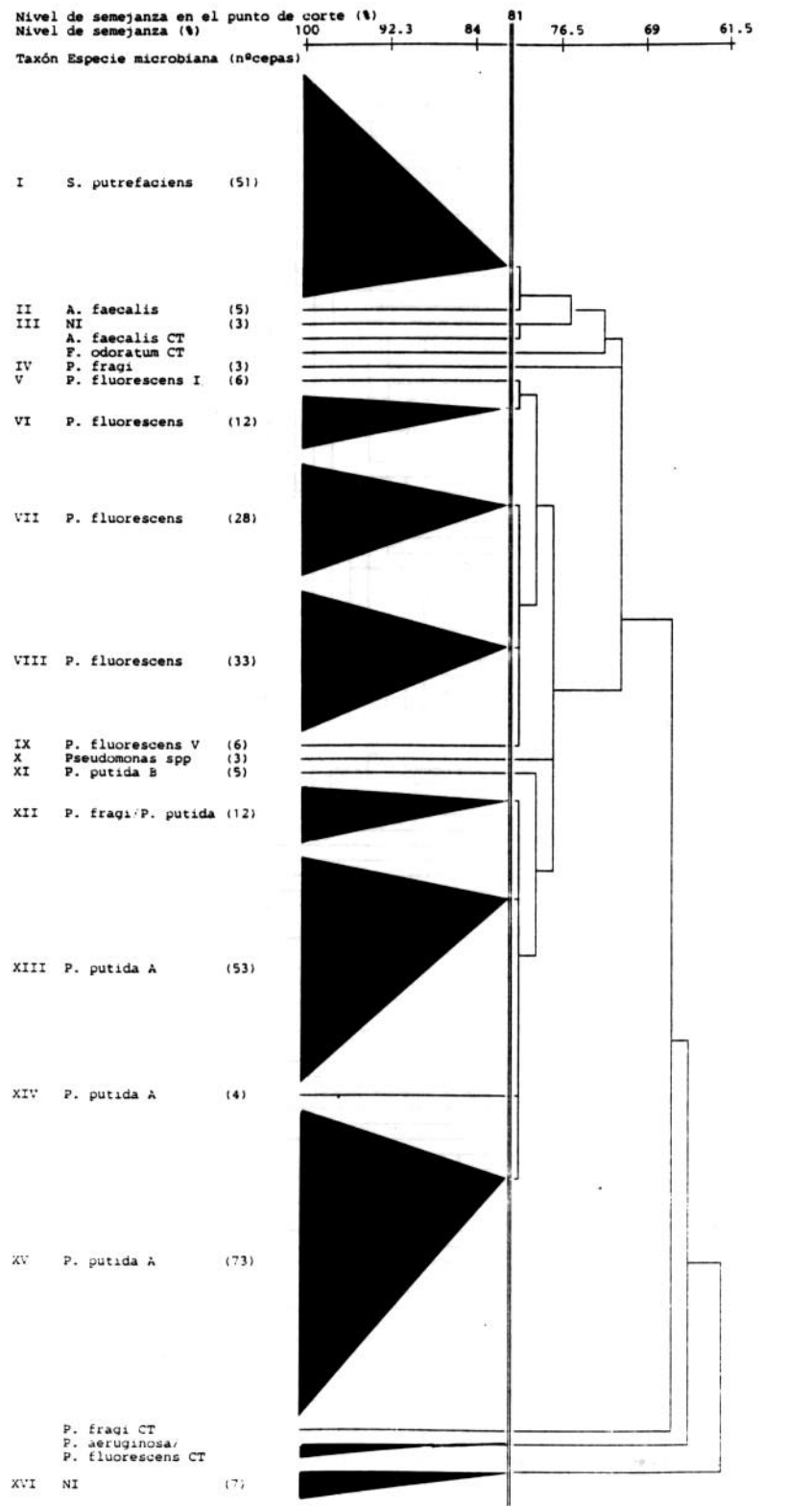






- (1) *Pesc.*, especie de pescado en la que fueron aisladas (TC, trucha común; TAI, trucha arco iris; LUC, lucio). (2) T*, grupo del que fueron aisladas (mes, mesófilos; psi, psicrotrofos). (3) Muest., muestra (SE, piel; SI, cavidad abdominal; MS, tejido muscular).

Figura V.14. Dendrograma simplificado correspondiente al análisis "cluster" llevado a cabo sobre microorganismos Gram negativos aerobios móviles aislados de pescado de agua dulce.



En la tabla V.6 se presenta un resumen en el que se reflejan los taxones en los cuales aparecen agrupadas las distintas especies (y biovares) identificadas por taxonomía clásica.

Tabla V.6. Distribución de las especies identificadas entre los diferentes taxones.

ESPECIE (y biovar, en su caso)	TAXON																A N S	N A
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
<i>P. fluorescens</i> *					+		+	+								+	+	
<i>P. fluorescens</i> I					+	+	+										+	
<i>P. fluorescens</i> III						+	+	+				+		+	+	+	+	
<i>P. fluorescens</i> V						+	+	+	+			+					+	
<i>P. putida</i> *								+	+		+	+	+	+	+		+	
<i>P. putida</i> A							+	+				+	+	+		+	+	
<i>P. putida</i> B											+		+	+		+	+	
<i>P. fragi</i>				+						+	+	+	+		+	+	+	
Otras <i>Pseudomonas</i>								+								+	+	
<i>Pseudomonas</i> spp								+		+		+	+		+		+	
<i>S. putrefaciens</i>	+																+	
<i>A. faecalis</i>		+															+	
<i>A. denitrificans</i>	+																+	
<i>Alcaligenes</i> spp.		+																
<i>Flav./Cyto./Sphin.</i> ⁽¹⁾																	+	
NI				+			+	+	+						+	+	+	

*; cepas pertenecientes a biovares desconocidos o con propiedades intermedias entre los biovares descritos; NI, cepas no identificadas; ANS, cepas contenidas en taxones no significativos; NA, cepas no agrupadas; ⁽¹⁾ grupo *Flavobacterium/Cytophaga/Sphingobacterium*.

En base a los procedimientos de adscripción a género, especie o biovariedad que se discuten más adelante, los taxones fueron identificados de este modo:

TAXON 1. *Shewanella putrefaciens*.

TAXON 2. *Alcaligenes faecalis*.

TAXON 3. No identificado a nivel de género.

TAXON 4. *Pseudomonas fragi*.

TAXON 5. *Pseudomonas fluorescens* biovar I

TAXON 6. *Pseudomonas fluorescens* intermedio biovar I-biovar V.

TAXON 7. *Pseudomonas fluorescens* intermedio biovar III-biovar V.

TAXONES 8 y 9. *Pseudomonas* spp.

TAXON 10. *Pseudomonas fragi*.

TAXON 11. *Pseudomonas putida*.

TAXON 12. Intermedio *Pseudomonas fragi*-*Pseudomonas putida*.

TAXONES 13 a 15. *Pseudomonas putida*.

TAXON 16. *Pseudomonas* spp.

En la tabla V.7 se presentan las propiedades fenotípicas con una mayor capacidad discriminante entre los distintos taxones significativos obtenidos, así como el índice de separación entre agrupamientos (IS) obtenido para cada prueba.

Tabla V.7. Pruebas más discriminantes entre taxones y otras de interés en la taxonomía de microorganismos Gram negativos aerobios móviles.

TAXON	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	IS
Número de cepas	51	4	3	3	7	10	28	33	6	3	5	12	53	3	73	5	
Citocromo-c-oxidasa	+(¹)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15(³)
Pigmento amarillo	-(²)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Fluoresceína en King B	-	-	-	-	+	+	75	70	+	-	80	33	+	67	56	-	24
Crecimiento a 4°C	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	80	+	+	+	+	+	26
Crecimiento en 3% NaCl	+	25	-	67	+	+	+	+	67	+	-	83	60	+	39	+	16
Crecimiento a pH 4.5	19	40	-	-	+	+	61	+	33	-	20	67	60	+	34	-	16
Agar citrato de Simmon	-	20	+	+	+	+	+	+	83	+	+	+	+	67	+	-	22
Producción de H ₂ S	+	60	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	24
Denitrificación	+	40	-	33	-	17	64	18	17	-	80	25	62	-	30	+	6
Producción de levano	-	-	-	-	+	25	32	-	-	-	-	-	25	-	-	-	12
Reducción del OTMA	60	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	71	-
Hidrólisis de la urea	41	50	-	67	+	50	30	59	-	33	-	71	40	67	20	-	4
Hidrólisis de la esculina	-	20	+	-	-	-	-	-	-	33	20	-	-	-	-	-	12
Hidrólisis de la tirosina	-	-	-	-	57	33	+	56	67	-	-	-	47	33	46	-	8
Pigmento Agar Tirosina	16	-	-	+	29	-	-	48	-	-	40	+	53	67	47	-	14
Hemólisis	+	40	67	-	-	17	54	39	+	+	40	50	40	-	70	+	12
Acido a partir de:																	
Glucosa	-	40	-	67	+	+	79	+	83	+	20	+	+	67	+	-	21
D-fructosa	-	-	-	+	-	42	-	-	-	-	20	-	-	33	-	+	22
Galactosa	-	-	-	67	+	+	-	-	-	33	40	+	-	-	-	83	21
Glicerol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	28
Maltosa	-	-	-	+	-	25	-	-	-	-	20	-	-	-	-	+	24
Manosa	-	-	-	67	-	+	-	-	-	33	20	+	-	33	-	+	27

tabla V.7 (continuación).

TAXON	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	IS
Ribosa	-	-	-	+	-	-	-	-	17	33	-	42	-	-	-	+	22
Trealosa	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	14
D-xilosa	-	-	-	33	43	+	21	-	33	33	20	+	-	67	-	-	14
Asimilación de:																	
Adonitol	-	20	33	-	+	75	+	-	17	-	+	67	45	-	29	-	12
L-arabinosa	-	20	67	33	+	+	76	33	83	33	80	+	-	+	+	-	15
D-arabinosa	-	-	-	+	-	-	-	-	33	67	-	55	83	33	65	-	9
Celobiosa	-	-	-	33	-	50	-	-	17	-	+	-	-	-	24	80	10
D-fructosa	23	20	-	+	+	+	46	+	33	67	+	36	+	+	63	57	7
Galactosa	-	-	-	67	+	+	-	-	-	33	40	+	-	-	-	83	27
Glicerol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	28
Glucosa	+	20	33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Gluconato	+	20	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
Maltosa	-	-	-	+	-	25	-	-	-	-	20	-	-	-	-	+	24
Manitol	-	20	+	33	+	+	+	33	+	33	80	67	-	+	+	-	14
Manosa	-	-	+	67	+	+	+	33	+	67	+	67	-	+	+	+	27
Trealosa	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	14
Xilitol	-	-	-	-	+	45	54	-	50	+	50	33	-	-	78	-	16
Glicocola	-	-	-	33	43	42	+	30	67	-	+	+	94	+	+	-	30
L-arginina	-	-	-	+	+	+	+	+	83	+	+	+	+	+	+	-	44
Cisteína	48	20	-	+	-	+	29	21	-	-	+	83	+	-	18	57	20
L-lisina	-	-	-	+	+	+	+	78	83	-	80	+	+	+	+	-	40
Alcohol butílico	29	20	67	+	29	+	+	67	33	-	+	+	+	67	+	-	14
Etanol	-	-	-	33	-	42	+	-	-	-	+	+	+	33	79	-	32
Formiato sódico	-	-	-	67	-	17	54	-	-	-	+	+	+	33	59	-	24

Tabla V.7 (continuación).

TAXON	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	IS
Hidrólisis de:																	
Tween 20	+	20	-	-	-	33	39	58	17	33	60	-	40	-	23	+	10
Tween 80	+	20	-	-	29	+	46	76	-	-	-	-	25	33	18	+	18
Tributirina	62	-	67	-	+	+	71	+	+	-	60	50	53	33	51	+	15
Lecitina	81	20	67	-	43	+	82	+	83	-	-	-	25	+	-	+	20
Yema de huevo	-	0	0	0	+	+	54	+	50	-	-	-	26	+	-	43	32
Gelatina	+	-	+	-	+	+	82	+	67	-	-	17	26	-	-	+	36
Caseína	34	40	33	-	+	+	+	+	83	-	-	33	25	-	-	71	28
Elastina	+	20	67	-	-	50	33	67	80	-	-	-	-	-	-	+	16
ADN	77	20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	24
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	20	58	74	+	-	71	35
Lisina descarboxilasa	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	+	12
Ornitina descarboxilasa	54	20	-	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

⁽¹⁾+, $\geq 85\%$ positivas para esa prueba; ⁽²⁾-, $\leq 15\%$ positivas para esa prueba; ⁽³⁾ producto de taxones positivos y taxones negativos para cada prueba fenotípica (Sneath, 1978b). Todas las cepas contenidas en estos agrupamientos fueron: catalasa positivas, negativas para la producción de piocianina, pigmento naranja, ácido a partir del adonitol, meso-inositol, lactosa, melibiosa, salicina, D-sorbosa, sorbitol, xilitol y para la utilización de meso-inositol, lactosa, salicina y sorbitol como única fuente de carbono. Tampoco fueron capaces de crecer en Agar TCBS ni presentaron actividad -galactosidasa.

TAXONES MAYORITARIOS

El taxón 1 contenía 49 cepas ambientales identificadas como *S. putrefaciens*, la cepa tipo de esta misma especie y una cepa salvaje identificada como *A. denitrificans denitrificans*. Las cepas de *S. putrefaciens* poseían unos perfiles que se aproximaban al de los taxones identificados como *Alteromonas putrefaciens* y *S. putrefaciens* por Mölin y Ternström (1982) y Sternström y Mölin (1990), respectivamente. Entre las características más sobresalientes de las cepas contenidas en este agrupamiento destacan su incapacidad para producir pigmentos fluorescentes, la producción de H₂S a partir de la cisteína, la incapacidad de producir ácido a partir de los azúcares empleados (incluso de la glucosa), el crecimiento en Agar Citrato de Simmon y el reducido número de compuestos que emplea como única fuente de carbono. Por el contrario, su actividad proteolítica y, sobre todo, su actividad lipolítica estaban bastante extendidas entre las cepas contenidas en el presente taxón. Lo mismo cabe decir de su capacidad para hidrolizar el ADN y de su actividad reductora del óxido de trimetilamina. Por otro lado, ninguna de estas cepas presentó actividad arginina dihidrolasa, mientras que la actividad descarboxilante sobre otros aminoácidos fue variable. El perfil del HMO (organismo hipotético medio) de este agrupamiento se corresponde con la descripción del taxón 11 de Sternström y Mölin (1990), adscrito a la especie *S. putrefaciens*, excepto en lo referente a la asimilación de la sacarosa y la maltosa como fuentes de carbono, así como hidrólisis de la caseína y descarboxilación de la ornitina. Por estas razones, y por contener la cepa tipo de *S. putrefaciens*, adscribimos este agrupamiento a dicha especie.

Todas las cepas agrupadas en el taxón seis fueron identificadas como *P. fluorescens* siguiendo la descripción de Palleroni (1984). Concretamente, dos pertenecían al biovar III, cuatro al biovar I y seis al biovar V. Las cepas 1331 y 1335, identificadas como *P. fluorescens* biovar V, se asemejaban mucho a la descripción del taxón número 46 de Allen y col (1983b) y a la del agrupamiento de *P. fluorescens* de Gillespie (1981). Por otro lado, la cepa 648, también *P. fluorescens* V, estaba muy próxima a la descripción del taxón III de Shaw y Latty (1982). Las cepas contenidas en este taxón eran capaces de crecer a pH 4.5, de producir ácido a partir de varios azúcares, entre los que se encontraba la glucosa, y de utilizar un elevado número de compuestos como única fuente de carbono. En cuanto a su capacidad para degradar compuestos de naturaleza lipídica y proteica hay que mencionar que eran bastante activos, mientras que su actividad desoxirribonucleasa era prácticamente nula. Como buena parte de las especies de pseudomonas fluorescentes (Palleroni, 1984), hidrolizaron la arginina y no fueron capaces de descarboxilar la ornitina ni la lisina. La adscripción del centroide (HMO) de este taxón a nivel de especie se basó en las consideraciones que detallamos a continuación. En primer lugar, el perfil fisiológico y bioquímico de este HMO se ajustaba con bastante precisión, excepto en la utilización de glicerol y trealosa, al del biovar I de la especie *P. fluorescens* (NS=0.99), si bien también era cercano a los de los taxones de *P. fluorescens* biovar I y *P. fluorescens* biovar V descritos por O'Connor y col (1986). En segundo lugar tuvimos en cuenta que se agrupaba a un 80% de semejanza (S_{SM}) con el taxón número V que, como veremos más adelante, fue adscrito al biovar I de la especie *P. fluorescens*. Finalmente, consideramos la identificación de las cepas individuales contenidas en este taxón y concluimos en asignarlo a *P. fluorescens*, biovar intermedio entre el I y el V.

El taxón siete comprendía un total de 28 cepas, dos de ellas no identificadas a nivel de género, dos identificadas como *P. putida* biovar A, una de las cuales (2076) estaba muy

relacionada con la descripción del taxón número dos de Shaw y Latty (1982), y 24 como *P. fluorescens* (una adscrita al biovar I, nueve al biovar III, trece al biovar V y una que permaneció sin clasificar a este nivel). A diferencia del grupo anterior, las cepas incluidas en el presente agrupamiento no mostraron una gran actividad fermentadora de los azúcares pero, sin embargo, sí utilizaron un gran número de compuestos como única fuente de carbono. Sus actividades proteolíticas y lipolíticas se manifestaron entre moderadas y altas. Sin lugar a dudas, la característica diferenciadora principal de este taxón fue su capacidad para hidrolizar la tirosina (característica única en el conjunto de los grupos formados en este estudio). El HMO de este agrupamiento se encontraba más próximo a *P. fluorescens* biovar III (NS=0.84) que a *P. fluorescens* biovar V (NS=0.10). De ambos difería en la utilización de glicerol y de trealosa como única fuente de carbono. A tenor de estos resultados decidimos clasificarlo como *P. fluorescens* biovar intermedio entre el III y el V.

Tal y como observamos en la figura V.13, este taxón se subdivide, a un nivel de semejanza del 86%, en cuatro subgrupos. El primero de ellos es intermedio *P. putida* A-*P. fluorescens* III, el segundo es *P. fluorescens* III, mientras que el tercero y el cuarto contenían mayoritariamente cepas de *P. fluorescens* biovar V.

El taxón ocho fue uno de los grupos más heterogéneos de todos los analizados. Contenía un total de treinta y tres cepas, de las cuales una no pudo ser identificada a nivel de género, otras tres fueron identificadas como como *P. syringae*, *P. putida* y *P. putida* biovar A, respectivamente, una como *P. fluorescens* (biovar sin determinar), dos como *P. fluorescens* biovar III y trece como *P. fluorescens* biovar V. Las trece cepas restantes se clasificaron como pertenecientes al género *Pseudomonas*, pero sin asignar a ninguna especie descrita. El perfil fenotípico de muchas de éstas se aproximó bastante a la descripción del taxón número tres de Shaw y Latty (1982), taxón que contenía, entre otras, cepas productoras de fluoresceína, y al perfil de *P. lundensis*, especie fluorescente y gelatinosa positiva que no utiliza un elevado número de compuestos como única fuente de carbono, a pesar de lo cual no los adscribimos a nivel de especie. Los organismos agrupados en el presente taxón presentaban grandes similitudes, en cuanto a su comportamiento fisiológico y bioquímico, con las del agrupamiento anterior (Taxón siete), si bien no fueron muy vigorosos desde el punto de vista nutricional. Así, únicamente cuatro de los veintiocho compuestos ensayados fueron utilizados como única fuente de carbono por todas las cepas, mientras que diecisiete no fueron metabolizados en absoluto por ninguna de ellas. Sin embargo, un mayor porcentaje de cepas que en el taxón siete manifestaron actividades lipo y proteolíticas. El HMO de este agrupamiento se ajustó satisfactoriamente (NS=0.90) a la descripción del taxón III de Shaw y Latty (1982), excepto en lo referente a la utilización de galactosa y trealosa como únicas fuentes de carbono. Al ser comparado el perfil de este HMO, únicamente, con los datos recopilados por Palleroni (1984), el programa informático utilizado (Prieto, 1994) lo asignó al género *Pseudomonas*, mientras que a nivel de especie lo relacionaba con las especies *P. fluorescens* biovar I (NS=0.64), *P. putida* biovar A (NS=0.19) y *P. putida* biovar B (NS=0.10). Debido a que estos resultados no fueron excesivamente concluyentes, finalmente lo denominamos como *Pseudomonas* spp. al observarse una gran heterogeneidad en la composición específica del taxón.

El taxón doce contenía doce cepas, de las cuales seis se identificaron como *P. fragi*, cinco como *P. putida* y una *Pseudomonas* no identificada a nivel de especie. En una identificación preliminar observamos que cinco de las seis cepas de *P. fragi* mostraron bastante similitud con la descripción del taxón I de Shaw y Latty (1982). Once de estas cepas

exhibieron su capacidad para fermentar la glucosa, la galactosa, la manosa y la D-xilosa, así como de utilizar un número relativamente elevado (en comparación con otros taxones) de compuestos como única fuente de carbono. En ambas propiedades se asemeja mucho al taxón cinco (identificado como *P. fluorescens* biovar I y que veremos más adelante), pero difiere de éste en que las cepas contenidas en el taxón doce presentan una actividad extracelular, así como frente a la arginina, restringida a unos pocos organismos. Todas las cepas agrupadas en el presente taxón desarrollaron una pigmentación rosa-marrónácea alrededor de la zona de crecimiento en el medio con tirosina. Para la designación específica del HMO de este agrupamiento consideramos únicamente el perfil de las cepas contenidas en él, de modo que lo identificamos como intermedio *P. fragi*-*P. putida*, a pesar de que el análisis informático de dicho HMO reveló que estaba más cercano a la descripción de *P. putida* biovar B (NS=0.94) que a cualquiera de las cepas individuales de nuestro agrupamiento. A esto podía haber contribuido el hecho de que un elevado número de “tests” correspondientes al perfil del HMO eran variables.

De las cincuenta y tres cepas incluidas en el taxón trece, ocho no pudieron ser identificadas a nivel de especie. Otras once se adscribieron a *P. fluorescens* (siete al biovar III y cuatro al biovar V) y una a *P. fragi*. Las restantes treinta y tres se identificaron como *P. putida*, de las cuales diez presentaron un fenotipo intermedio entre los biovars A y B, veintidós se adscribieron al biovar A y la cepa restante al biovar B. A un nivel de semejanza del 85% este taxón se subdividió en tres grupos, conteniendo dos la mayor parte de las cepas. Uno de estos subgrupos englobaba al 90% de las cepas asignadas a *P. fluorescens* en este taxón, mientras el segundo contenía, mayoritariamente, cepas de *P. putida*. Aunque las cepas constitutivas de este taxón eran capaces de fermentar la glucosa, no hicieron lo propio con el resto de los azúcares ensayados. Por el contrario, utilizaron un rango amplio de compuestos como fuente de carbono, entre los cuales se encontraba la D-arabinosa. La actividad proteolítica y lipolítica, por otro lado, fue característica de, únicamente, una cuarta parte de las cepas contenidas en el presente taxón. El perfil del HMO de este agrupamiento se aproximó al del biovar A de *P. putida* (Palleroni, 1984), presentando un NS=0.97. Este mismo patrón se aproximó, asimismo, al del taxón de *P. putida* (NS=0.87) descrito por Ternström y col (1993), por lo que finalmente acabamos asignándolo a esta especie.

En el taxón quince, constituido por setenta y tres cepas, la especie componente mayoritaria es *P. putida* (64 cepas), treinta y cinco pertenecientes al biovar intermedio A-B, veintiuna al biovar A y ocho al biovar B. Asimismo, se identificaron cuatro cepas como *P. fragi* y una como *P. fluorescens* biovar III. Otras dos cepas, únicamente pudieron ser identificadas a nivel de género (*Pseudomonas* spp.), mientras las dos restantes permanecieron sin identificar. Como en los otros taxones que contienen *P. putida*, la capacidad fermentadora de azúcares se circunscribe a la glucosa siendo, todas las cepas, capaces de utilizar, al menos, un 33% de los compuestos empleados como única fuente de carbono pero, al contrario que aquéllas, un porcentaje relativamente alto de cepas no daban lugar a pigmentos fluorescentes. Algunas de ellas presentaron actividad proteolítica, pero muy pocas manifestaron actividad proteolítica. Algo hemolíticas (un 7% fueron -hemolíticas), no actuaron sobre ninguno de los aminoácidos ensayados. El perfil del centroide de este taxón se encontraba entre las descripciones de *P. putida* A y *P. putida* B, con NS semejantes en ambos casos (NS=0.49). También se encontraba próximo a la descripción del taxón 1 de Shaw y Latty (1982).

Dentro de los siete subgrupos en que se podría dividir este agrupamiento, a un nivel de semejanza del 86%, dos de ellos, el primero y el cuarto, no estarían constituidos mayoritariamente por cepas de *P. putida*, sino por *Pseudomonas* no identificadas a nivel de especie (el primero) y por *P. fragi* (el cuarto). Este último subgrupo incluiría, además, al 60% de las cepas de *P. putida* biovar B.

TAXONES MINORITARIOS

El taxón dos incluía cepas pertenecientes al género *Alcaligenes*, cuatro de ellas identificadas como *A. faecalis*, las cuales tenían un perfil fenotípico que se correspondía con bastante exactitud con el recogido en el Manual de Bergey (Kerstens y De Ley, 1984). De todos modos, la cepa tipo de esta misma especie se agrupó con este taxón a un nivel de semejanza relativamente bajo, del orden del 72%. La cepa restante fue identificada como *Alcaligenes* spp. Por otro lado, las cepas 1976 y 2541 también presentaron una gran similitud con las cepas clasificadas por Gillespie (1981) en el taxón tres de su estudio y con la especie *P. testosteroni* (Palleroni, 1984). Las cepas contenidas en este agrupamiento mostraron una actividad nula en lo referente a la producción de ácido a partir de los azúcares empleados en los correspondientes “tests” (excepto en la glucosa), una muy reducida utilización de compuestos carbonados y unas actividades extracelulares prácticamente inexistentes. Asimismo, ninguna de las cepas contenidas en el presente taxón fue capaz de desarrollarse a 4°C. El HMO de este agrupamiento presentaba un perfil bioquímico que se aproximaba al del taxón de *A. faecalis* de Allen y col (1983b), a excepción de los “tests” de crecimiento a 42°C, las actividades caseinasa y amilasa, y a la asimilación de la L-arabinosa y la maltosa. Sin embargo, se ajustaba con bastante más precisión (NS=0.99) a la descripción de *A. faecalis* del Manual de Bergey (Kerstens y De Ley, 1984) con excepción de los resultados obtenidos en el Agar Citrato de Simmon. Por esta razón, y por las apuntadas anteriormente, a este taxón lo adscribimos finalmente a la especie *A. faecalis*.

Las tres cepas contenidas en el taxón tres no pudieron ser adscritas a ninguna especie de las incluidas en la matriz o base de datos de identificación. Presentaban características intermedias entre *P. syringae*, *P. fluorescens* y algunas especies de *Flavobacterium*. Los rasgos dominantes de este grupo fueron la producción de pigmento amarillo, ser oxidasa negativas y su capacidad para hidrolizar la esculina. Por otro lado, mostraron una nula actividad fermentadora de azúcares y emplearon pocos compuestos como única fuente de carbono. Sin embargo, y dentro de una tónica general de poca actividad extracelular, las actividades gelatinasa y desoxirribonucleasa que desarrollaron fueron considerables. El perfil fenotípico del HMO de este agrupamiento presentaba, al ser comparado con los contenidos en la base de datos, unos NS bajos con respecto a *P. syringae* (0.61) y *F. breve* (0.22). A pesar de no haber incluido ningún perfil correspondiente al género *Xanthomonas* en la base de identificación, sí pudimos observar cierta semejanza entre este género bacteriano (Palleroni, 1984) y el perfil del HMO de este taxón (móviles, oxidasa débiles ó positivos y productores de pigmentos amarillos insolubles). También coincidía, el mencionado perfil, en algunas de sus características (excepto en la actividad gelatinasa) con la descripción de *P. maltophilia* ofrecida por Hendrie y Shewan (1979). Finalmente, y teniendo en cuenta que ninguna de las cepas incluidas había podido ser identificada previamente, optamos por no adscribirlo a

alguno de los géneros de bacterias Gram negativas aerobias móviles, ni al género *Flavobacterium*.

El taxón cuatro incluía dos cepas que fueron adscritas a *P. fragi*, mientras que la otra únicamente pudo ser identificada a nivel de género (*Pseudomonas* spp.). Ambas *P. fragi* presentaron un fenotipo muy similar al del taxón de *P. fragi* de Sternström y Mölin (1990). Las propiedades más destacables de este agrupamiento fueron su incapacidad para producir fluoresceína, su capacidad para fermentar varios azúcares (si bien en distinto grado), y la utilización de D-arabinosa, glicerol y maltosa como única fuente de carbono. De hecho un 35% (10 compuestos) de sustancias carbonadas fueron empleadas, en las correspondientes pruebas, por las tres cepas contenidas en el presente taxón. Por el contrario, su actividad extracelular fue escasa, con excepción de la capacidad de producir pigmento marrón en el medio que contenía tirosina. El análisis informático del centroide de este agrupamiento reveló su proximidad a la especie *P. fragi*. De hecho, el programa de identificación nos lo relacionó con el perfil del taxón que agrupaba a las cepas de *P. fragi* identificadas por Sternström y Mölin (1990), con un NS de 0.88. Con este mismo programa pudimos observar, asimismo, cierta similitud con la descripción del grupo I de Shaw y Latty (1982). Tras valorar estos resultados, optamos por adscribir este taxón a la especie *P. fragi*.

De las siete cepas agrupadas en el taxón cinco, seis de ellas se identificaron como *P. fluorescens* biovar I, mientras que la cepa restante, la única no productora de levano a partir de la sacarosa, se adscribió a esta misma especie, pero sin poder especificar el biovar al que pudiera pertenecer. Esta misma cepa presentaba ciertas similitudes, asimismo, con las cepas contenidas en el grupo 3 de Shaw y Latty (1982), que a su vez muestran características propias de *P. lundensis*. Todas las cepas contenidas en el presente taxón produjeron ácido aeróbicamente a partir de la glucosa y de la D-fructosa, crecieron a pH 4.5, hidrolizaron la urea y fueron muy vigorosas, ya que asimilaron un mínimo de 12 compuestos como fuente de carbono. Presentaron, asimismo, una actividad proteolítica muy marcada y una actividad lipolítica más débil. Todas las cepas hidrolizaron la arginina, pero no descarboxilaron ni la lisina ni la ornitina. El HMO de este taxón se correspondió, excepto en lo referente a la utilización de la trealosa como única fuente de carbono, con la descripción del biovar I de la especie *P. fluorescens* (NS=0.99). Por ello, y por ser mayoritaria la presencia de representantes de dicha especie en este taxón, fue finalmente identificado como *P. fluorescens* biovar I.

Cuatro de las seis cepas incluidas en el taxón nueve fueron identificadas como *P. fluorescens* biovar V y una como *P. putida*, mientras que la restante no pudo ser identificada a nivel de especie (2323). Este taxón presentaba unas características bastante similares a los taxones cercanos (siete y ocho). De hecho, tampoco fueron capaces de utilizar un elevado número de fuentes de carbono, como en el taxón ocho, lo cual podría habernos hecho pensar que se trataban de cepas de *P. lundensis* (Mölin y Ternström, 1986b). En cuanto al porcentaje de cepas lipolíticas y proteolíticas, su número disminuyó considerablemente con respecto a ese mismo taxón. La característica más sobresaliente, y que incluso podríamos considerar como discriminante con respecto a otros agrupamientos fue la actividad -hemolítica. En este caso, el centroide presentó un perfil que el programa de identificación empleado situó entre *P. putida* A (NS=0.66) y *P. putida* B (NS=0.33). Considerando lo expuesto anteriormente, el

hecho de que el 66% de las cepas fueron adscritas a la especie *P. fluorescens* biovar V y la escasa asimilación de fuentes de carbono (característico de *P. lundensis*), lo clasificamos como *Pseudomonas* spp.

El taxón diez contiene una cepa identificada como *P. fragi* y otras dos que no pudieron ser identificadas a nivel de especie. Ninguna de las tres desarrolló actividad proteolítica ni lipolítica (excepto en una de ellas, que hidrolizó el Tween 20). Todas ellas tuvieron actividad -hemolítica, pero utilizaron un número reducido de compuestos nutritivos. Sólo una de ellas presentó cierta actividad fermentadora de azúcares (en condiciones aerobias de crecimiento). El perfil fenotípico del HMO de este taxón se parecía ligeramente al de *P. fragi* (Sternström y Mölin, 1990) y al del taxón de *Pseudomonas* spp. (taxón II) descritos por Mölin y Ternström (1982). Asimismo, también se ajustaba bastante a la descripción del taxón 1 de Shaw y Latty (1982). Debido al hecho de que contenía una cepa identificada como *P. fragi*, a este taxón lo clasificamos como semejante a *P. fragi*.

El taxón once comprende un total de cinco cepas, de las cuales cuatro son *P. putida* (una de ellas perteneciente al biovar B) y una *P. fragi*. Sólo una de ellas fue capaz de fermentar la glucosa y algunos otros pocos azúcares. Ninguna de ellas toleraba concentraciones del 3% de sal. Por otro lado, utilizaron un elevado número de compuestos como fuente de carbono (doce de ellos fueron empleados por las cinco cepas). Sus actividades proteolíticas y desoxirribonucleasa fueron nulas, mientras que su actividad lipolítica fue meramente residual. Tampoco fue muy destacable su actividad sobre los aminoácidos ensayados. A pesar de que el análisis del HMO de este taxón lo situó cercano a la descripción del taxón número cuatro de *P. fluorescens* de Ternström y col (1993), se adscribió a la especie *P. putida* al contener mayoría de cepas pertenecientes a esta especie y tener, entre sus características más importantes, una muy baja actividad extracelular.

Las tres cepas incluidas en el taxón catorce fueron asignadas a la especie *P. putida*, dos de ellas al biovar A, mientras que la restante presentó un fenotipo intermedio entre los biovares A y B de esta misma especie. Estas cepas fueron capaces de crecer a un pH de 4.5 y mostraron poca capacidad formadora de ácido a partir de los azúcares. Por el contrario, sí que exhibieron cierta actividad lipolítica y sobre la yema de huevo como sustrato, dando lugar a proteo y lipólisis de la misma, característica que compartieron con los taxones seis y ocho. Todas ellas emplearon, al menos, un 33% de los compuestos nutritivos empleados. Igualmente presentaron actividad argininadhidrolasa. Finalmente, adscribimos este agrupamiento al género *Pseudomonas*, concretamente a la especie *P. putida*, pero sin asignarlo definitivamente a ninguno de los dos biovares que aparecen descritos en el Manual de Bergey (Palleroni, 1984). Así, al comparar el centroide de este taxón con las descripciones de ambos, se apreció que existía la misma semejanza entre aquél y cada uno de los dos por separado (NS=0.49). Por ello, los acabamos denominando *P. putida* biotipo intermedio A-B.

Los taxones cinco a nueve conformaron un superagrupamiento de *P. fluorescens*, si bien en los taxones VII y VIII no se detectó la producción de fluoresceína en un 30% de las cepas contenidas en ellos. Los taxones once a quince, por su parte, representan un superagrupamiento de *P. putida* a un nivel de semejanza del 78%. Estos grupos coinciden en ser mayoritariamente incapaces de hidrolizar la gelatina y el almidón, si bien no todos fueron capaces de hacer lo mismo con la arginina. En los taxones 11, 14 y 15, adscritos

definitivamente a *P. putida* a pesar de no ser fluorógenas todas las cepas en él contenidas (de hecho, el perfil fenotípico del taxón 15 se asemejaba al del taxón I de Shaw y Latty -1982- que estos consideraban cercano a *P. fragi*), se planteó la posibilidad de que dichas cepas supusiesen una especie intermedia entre *P. fragi* y *P. putida*, pero salvo en la producción de fluoresceína, en el resto de sus características generales se observó una mayor proximidad a *P. putida*. Al igual que en los taxones de *P. putida* obtenidos por Sternström y Mölin (1990), las cepas contenidas en nuestro taxón 15 no mostraron producción de ácido a partir de la maltosa ni hidrolizaron la arginina, características que podrían servir para diferenciar *P. putida* no fluorescente de *P. fragi*.

Algunas de las cepas contenidas en el taxón dieciseis fueron adscritas a distintas especies de pseudomonas (*P. solanacearum*, *P. pseudomallei*, dos a *P. fluorescens* y a *P. fragi*), pero presentaron perfiles que diferían sensiblemente de las descripciones de dichas especies recogidas en el Manual de Bergey (Palleroni, 1984). Las dos cepas restantes no pudieron asignarse a ninguno de los géneros introducidos en la base de datos. Este taxón (16) presentaba una características muy diferentes a las de los taxones uno a tres, por un lado, y a las de los taxones cuatro a quince, por el otro. Ninguna de las cepas fue capaz de crecer a pH 4.5 pero, por el contrario, dieron lugar a H₂S a partir de la cisteína, mostraron actividad denitrificante y, gran parte de ellas, redujeron el OTMA a TMA. A pesar de no producir ácido a partir de la glucosa, sí que lo hicieron a partir de un mínimo de seis azúcares. Por otro lado, asimilaron un número reducido de compuestos carbonados como fuente nutritiva. Todas las cepas mostraron actividades proteolíticas (incluyendo la hidrólisis de la elastina), lipolíticas, desoxirribonucleasa y -hemolítica, así como actividad descarboxilante de la lisina, por otro lado característica única de este taxón. El perfil del HMO de este agrupamiento se ajustó (NS=0.99) a la descripción de *P. solanacearum*, excepto en lo referente a la utilización de la celobiosa, la maltosa y la manosa como únicas fuentes de carbono, y fue próximo, asimismo, a la descripción del taxón de *P. fragi* de Ternström y col (1993). Sin embargo, el hecho de ser un taxón misceláneo constituido por varias especies determinó que lo asignásemos al género *Pseudomonas*, pero sin especificar una especie.

TAXONES NO SIGNIFICATIVOS

Cabe destacar el agrupamiento de las cepas tipo de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, que confluyeron a un nivel de semejanza del 84%. También es destacable el agrupamiento de la cepa tipo de *P. fragi* con una cepa salvaje de esta misma especie.

En la tabla V.8 podemos apreciar cómo habría resultado la asignación de los HMO a grupo microbiano si hubiéramos empleado el esquema de Shewan y col (1960b) teniendo en cuenta las características que aparecen en la tabla V.7.

TABLA V.8. Adscripción de los HMO a grupo de Shewan y col (1960b).

GRUPOS	TAXONES
<i>Pseudomonas</i> I	V, VI, IX, XIII
Intermedio Ps.I-Ps. II ⁽¹⁾	VII, VIII, XI, XII, XIV, XV*
<i>Pseudomonas</i> II	IV, X
<i>Pseudomonas</i> III	I, II
<i>Pseudomonas</i> IV	XVI
Enterobacteriáceas	III

⁽¹⁾, identificación intermedia entre los grupos I y II de *Pseudomonas* ;

*, las cepas contenidas en estos taxones eran variables en cuanto a la producción de fluoresceína.

DISCUSION

La extendida utilización de pruebas fenotípicas para realizar la identificación de pseudomonas se ha debido, principalmente, a la facilidad para llevarlas a cabo en laboratorios en los que se hacen análisis microbiológicos de rutina y en la correlación satisfactoria de sus resultados con los resultados obtenidos mediante análisis de ácidos nucleicos, ya que tanto la determinación de los valores G+C como las hibridaciones de ácidos nucleicos requieren un equipamiento y una preparación específicas, de modo que estas técnicas no se pueden llevar a cabo en todos los laboratorios de Microbiología de los Alimentos (Palleroni y Doudoroff, 1972; Palleroni, 1981). Champion y col (1980) observaron, asimismo, una gran congruencia entre los resultados fenotípicos y los resultados de los estudios genotípicos de las biovariedades de *P. fluorescens* al poder clasificar, mediante los primeros, a 81 de 87 cepas definidas a nivel genotípico.

Debido a que las claves dicotómicas (método de identificación secuencial -Sneath, 1978b-) empleadas en la identificación de este grupo microbiano son de uso limitado debido a la existencia de cepas aberrantes con características distintas (posiblemente modificadas por mutación) a las que poseen las cepas típicas (Palleroni y Doudoroff, 1972), en nuestro estudio empleamos matrices (método de identificación simultáneo y secuencial -Sneath, 1978b-) que, basadas en caracteres múltiples, nos permitieron identificar los microorganismos-problema mediante el uso de programas de identificación diseñados por Prieto (1994). De esta manera, se pretendió minimizar el efecto negativo que pudiera derivarse de la existencia de cepas con propiedades fenotípicas mutadas. En este sentido, Palleroni (1984) afirma que para la identificación de las pseudomonas se requiere considerar muchas características que debieran estar presentes en una cepa individual, hecho que tuvimos presente al diseñar este trabajo.

El género aislado mayoritariamente en el conjunto de las especies de pescado y muestras analizadas dentro de las bacterias Gram negativas aerobias (figura V.1) fue *Pseudomonas* (76.9%), mientras que *Shewanella*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium* (14.5, 2.6 y 0.3%, respectivamente) fueron los otros tres géneros identificados. De todas maneras, un 5.8% de las cepas no pudo ser adscrita a ninguna de las especies (ni siquiera a nivel de género) introducidas en la base de datos de la identificación. Especies asignadas a estos cuatro géneros, que en ocasiones aparecen con nombres distintos a los que actualmente están aprobados y reconocidos, han sido aislados en el hábitat acuático (Allen y col, 1983b) y a partir de pescado de distintos orígenes (Sternström y Mölin, 1990). A representantes de los dos primeros, se les ha responsabilizado de la alteración de dicho pescado cuando éste es mantenido a refrigeración. La importancia del primero de ellos (*Pseudomonas*) viene avalada por un gran número de estudios en los cuales se le ha asociado con la alteración del pescado (Shewan 1971; Gennari y Tomaselli, 1988; Sternström y Mölin, 1990).

Dentro de las pseudomonas, las especies aisladas en mayor número fueron *P. putida* (44.7%) y *P. fluorescens* (33.1%), mientras que *P. fragi* representó un porcentaje sensiblemente menor (8.3%). Como se puede apreciar en la figura V.2, la mayor parte de estas cepas (contenidas en las dos primeras especies) pertenecen al grupo de homología del ARNr de *P. fluorescens* (Palleroni, 1981). La suma de los porcentajes de estas tres especies representaría, asimismo, el porcentaje de pseudomonas aisladas pertenecientes a la rama *P. fluorescens* de la superfamilia II de ARNr (De Vos y col, 1989). Por tipo de pescado, las

especies más representativas en trucha común (figura V.3) fueron *P. fluorescens* (46.8%), *P. fragi* (19.1%) y *P. putida* (12.8%). En trucha arco iris (figura V.4) *P. putida* (48.7%) y *P. fluorescens* (28.7%) fueron mayoritarios, mientras en lucio (figura V.5) las especies más características fueron *S. putrefaciens* (32.2%), *P. putida* (25.9%) y *P. fluorescens* (15.4%). La existencia de un grupo microbiano mayoritario, entre una serie de grupos homogéneos, en cada una de las especies de pescado podría indicar la existencia de una presión selectiva debida al ambiente refrigerado, y estar relacionada con lo afirmado por Sternström y Mölin (1990) al observar la existencia de una relativa homogeneidad entre las cepas que aislaron a partir de pescado alterado. Se puede comentar, asimismo, que cada especie de pescado presenta un grupo microbiano mayoritario característico, pero no exclusivo, lo cual puede estar relacionado con el hábitat natural del pescado, por un lado, y con el diferente manejo del mismo desde su captura hasta el momento en que comienza su almacenamiento a bajas temperaturas.

La especie *P. fluorescens* se ha aislado en múltiples ocasiones en el hábitat acuático (Allen y col, 1983b; Chai y col, 1968; Gillespie, 1981; Sternström y col, 1990). Debido a su capacidad para crecer a bajas temperaturas y por su actividad proteolítica y lipolítica, juega un papel importante en la alteración durante el almacenamiento de los alimentos (Palleroni, 1981). García Armesto y col (1993) detectaron que un 50% de las cepas de *P. fluorescens* adscritas al biovar III y un 81% de las del biovar I, aisladas en leche de oveja, eran proteolíticas. Chai y col (1968) consideraban a *P. fluorescens* como el segundo grupo microbiano predominante en pescado alterado y observaron que un 31% de las cepas daban lugar a olores característicos de alteración. Gillespie (1981) detectó la capacidad, por parte de cepas pertenecientes a esta especie y aisladas en pescado, de dar lugar a olores a mohos, característicos, asimismo, de la alteración del pescado.

Se ha intentado subdividir *P. fluorescens* en distintas subespecies, que incluso algunos autores han considerado como especies propiamente dichas al estar separadas fenotípica y genotípicamente (Mölin y Ternström, 1986a), pero siempre se han encontrado formas intermedias entre ellas ya que se trata de una especie muy heterogénea (Palleroni, 1981). Nuestro estudio no es una excepción, y prueba de ello es que casi un 6%, niveles parecidos a los obtenidos por Mölin y Ternström (1986a) entre cepas alterantes de la carne, de las cepas adscritas a *P. fluorescens* no fueron asignadas a ningún biovar. La diferenciación entre los biovares de *P. fluorescens* se llevó a cabo de acuerdo con los criterios expuestos por Palleroni y Doudoroff (1972) y teniendo presente que a los biovares A, B, C, F y G les corresponden los biovares I, II, III, IV y V que aparecen en el Manual de Bergey (Palleroni, 1984). Entre estos criterios se encontraban la producción de levano a partir de la sacarosa, la denitrificación y otras características nutricionales. Mölin y Ternström (1986a) propusieron, además, que la utilización del xilitol como única fuente de carbono tenía valor potencial como criterio diagnóstico, hecho que comprobamos en nuestros taxones cinco a siete al ser característica de las cepas adscritas a los biotipos I y III la positividad en esta prueba. De entre los distintos biovares, el I es considerado como el típico de la especie (Palleroni, 1984). Por otro lado, el biovar V es muy heterogéneo en sus características nutricionales y podría corresponder a cepas que han perdido una o más propiedades consideradas de importancia diagnóstica entre los biovares mejor caracterizados (Palleroni, 1984; O'Connor y col, 1986). En nuestro caso, los biovares más frecuentes han sido el III y el V, mientras que el biovar I representa un porcentaje con respecto al total sensiblemente menor (tabla V.5). El biovar I ha sido aislado a partir de carne refrigerada y alterada en distintos trabajos (Mölin y Ternström,

1982, 1986a; Prieto y col, 1992a) y a partir de leche cruda, fresca y alterada, de distintas especies de mamíferos domésticos (Cox y McRae; 1989; García Armesto y col, 1993; O'Connor y col, 1986; Ternström y col, 1993). El biovar III también se ha detectado en alimentos proteicos refrigerados y alterados como carne (Mölin y Ternström, 1982; Mölin y Ternström, 1986a; Prieto y col, 1992a), leche (Cox y McRae, 1989; García Armesto y col, 1993; Ternström y col, 1993) y productos de la pesca (Sternström y Mölin, 1990). En cuanto al otro biovar de *P. fluorescens* aislado en nuestro trabajo (biovar V), su aislamiento a partir de alimentos diversos ha sido más escaso (O'Connor y col, 1986; Cox y McRae, 1989), al contrario que en nuestro estudio (tabla V.5). Llegados a este punto, cabe decir que Ternström y col (1993) detectaron un taxón de *P. fluorescens*, aisladas de leche alterada, cuyas propiedades eran similares a las del biovar V.

Entre las características bioquímicas que más destacan en los taxones constituídos por *P. fluorescens* en nuestro trabajo (tabla V.7), y en contraste con lo observado por otros autores (Cox y McRae, 1989; Mölin y Ternström, 1986a), están la incapacidad de utilizar la trealosa y el inositol como única fuente de carbono (si bien esta propiedad es variable para los biovars III y V -Palleroni, 1984-), de producir ácido frente a una gran variedad de azúcares, así como de hidrolizar el Tween 20 por la mayoría de nuestras cepas. Difieren del esquema de Hendrie y Shewan (1979) en que son α -galactosidasa negativas, al igual que las cepas identificadas como *P. fragi* y *P. putida*, de las cuales nos ocuparemos más adelante.

En general se puede afirmar que las cepas contenidas en los taxones V a VII pueden presentar una ventaja ecológica al ser capaces de competir y utilizar una gran variedad de sustratos para su desarrollo (tabla V.7), tal y como han observado, para cepas de *P. fluorescens* aisladas en carne, algunos autores (Mölin y Ternström, 1986a; Prieto y col, 1992a).

La especie *P. putida* se ha aislado con frecuencia a partir del suelo y del agua (Palleroni, 1984). Esta especie ha sido aislada, igualmente, a partir de diversos alimentos (si bien con menor frecuencia y niveles más bajos que en nuestro trabajo). Entre estos alimentos se encuentran productos de la pesca (Gillespie, 1981; Sternström y Mölin, 1990), productos cárnicos (Mölin y Ternström, 1986a; Prieto y col, 1992a) y leches cruda y pasteurizada (O'Connor y col, 1986; Ternström y col, 1993). Como en *P. fluorescens*, se ha visto implicada en la alteración de los alimentos mencionados pero, al contrario que *P. fluorescens*, su actividad alterante no parece muy importante, por ejemplo, en productos cárnicos (Prieto y col, 1992a), ya que sus actividades proteolíticas y lipolíticas se reducen a un número muy bajo de cepas tal y como han apreciado Sternström y Mölin (1990). Sin embargo, algunos autores (O'Connor y col, 1986), al igual que nosotros, han detectado la presencia de cepas de *P. putida* capaces de degradar la gelatina y la yema de huevo. Por lo que se refiere al pescado, su actividad alterante se podría reducir a la producción de olores anormales, tales como los descritos por Gillespie y McRae (1975) y Herbert y col (1971), que provocasen el rechazo de dicho pescado por parte del consumidor. Herbert y col (1971) observaron que algunas cepas de esta especie daban lugar a olores sulfurosos, característicos de alteración, cuando crecían en bloques de pescado estéril.

Un alto porcentaje de las cepas identificadas como *P. putida*, tal y como puede observarse en la tabla V.5, se asignaron a la biovariedad A, considerada como la definidora de la especie (Palleroni, 1981), más homogénea en cuanto a sus propiedades fenotípicas (Palleroni y Doudoroff, 1972) y que se aísla con relativa frecuencia a partir de alimentos (de

los que no hemos tenido noticia que se hayan aislado cepas de la biovariedad B). De todos modos, casi el 50% de las cepas de *P. putida* aisladas por nosotros no pudieron ser adscritas a ninguno de los dos biovares conocidos de esta especie debido, en primer lugar, a que presentaban propiedades intermedias entre ambos biovares y, en segundo lugar, a que los dos biovares se diferencian, únicamente, en unas pocas propiedades fenotípicas (Palleroni, 1981).

El conjunto de *P. putida* y *P. fluorescens* entre las bacterias alterantes del pescado (aisladas en los últimos recuentos microbianos, llevados a cabo al final del almacenamiento) representó cerca del 50% de la flora aerobia Gram negativa móvil (figura V.12). Este porcentaje fue muy superior al encontrado por Sternström y Mölin (1990), del orden del 13%, en muestras de pescado alterado.

A pesar de la escasa descripción que de *P. fragi* se hace en el Manual de Bergey (Palleroni, 1984), esta especie ha sido reconocida como una de las pseudomonas de mayor importancia en la alteración de los alimentos refrigerados por encima, incluso, de *P. fluorescens* (Shelley y col, 1987). Sin embargo, aún en 1982, la información taxonómica correspondiente a esta especie, frente a la de otras especies de *Pseudomonas* psicrotrofas, era muy limitada (Mölin y Ternström, 1982). *P. fragi* ha representado, en ocasiones, el porcentaje más elevado de la flora total de *Pseudomonas* (Mölin y Ternström, 1982; Prieto y col, 1992a), aunque en nuestro trabajo su porcentaje relativo dentro de las *Pseudomonas* fue claramente inferior al de las dos especies mayoritarias (figura V.2). Se trata de una especie de pseudomonas caracterizada por agrupar a cepas no fluorescentes (aunque algunos autores - Ternström y col, 1993- han clasificado cepas fluorescentes dentro de los taxones asignados a esta especie) y poco vigorosas desde el punto de vista nutricional. Como en los casos anteriores de *P. fluorescens* y *P. putida*, *P. fragi* se ha aislado a partir de productos cárnicos alterados (Mölin y Ternström, 1982, 1986a), de leche cruda (Cox y McRae, 1989; García Armesto y col, 1993; Shelley y col, 1987; Ternström y col, 1993) y en pescado (Castell y col, 1959; Sternström y Mölin, 1990). Gillespie (1981), estudiando pescado de origen marino, obtuvo un taxón que contenía a la cepa tipo de *P. fragi*, al cual consideró como un intermedio entre *P. fluorescens* y *P. putida*. Sternström y Mölin (1990) detectaron que un 33% de las cepas aisladas en el pescado alterado pertenecían a esta especie que parecía tener un nicho ecológico general en ambientes proteicos de baja temperatura y actividad de agua alta.

Castell y col (1959) observaron que a pesar de que las cepas de *P. fragi* no eran capaces de reducir el OTMA ni de hidrolizar proteínas, contribuían a la aparición de los olores asociados a la alteración temprana del pescado (olores afrutados y a cabolla) como consecuencia de su acción sobre los aminoácidos. Herbert y col (1971) reprodujeron los olores a fruta, característicos de la merluza y del bacalao alterados, al hacer crecer a *P. fragi* en bloques de pescado estériles. En este sentido, Gillespie (1981) afirmó que las cepas contenidas en el taxón que incluía a la cepa tipo de *P. fragi* podrían contribuir a la alteración del pescado al ser capaces de producir olores afrutados, aunque esta capacidad podría variar entre las especies de pescado analizadas.

P. lundensis (Mölin y Ternström, 1986b), especie no descrita en el Manual de Bergey (Palleroni, 1984) y que, en ocasiones, se ha confundido con *P. fluorescens* (Mölin y Ternström, 1986b), se caracteriza por producir fluoresceína, ser capaz de hidrolizar la gelatina y poseer un espectro limitado de asimilación de compuestos como fuente de carbono. Shaw y Latty (1982) detectaron cepas de pseudomonas fluorescentes, cuyos perfiles no correspondían con los de *P. putida* ni *P. fluorescens*, pero al no encontrar correspondencia entre sus perfiles

y las descripciones de las especies reconocidas en ese momento (Stanier y col, 1966; Doudoroff y Palleroni, 1974), tampoco se atrevieron a adscribir las a ninguna especie. Mölin y Ternström (1982) y Cox y McRae (1989) aislaron, a partir de carne alterada y leche de cabra, respectivamente, cepas de pseudomonas intermedias entre *P. fluorescens* y *P. fragi*, que los primeros afirmaron podrían constituir una nueva especie y que los segundos asignaron a la especie *P. lundensis*. En nuestro estudio no hemos detectado su presencia, si bien algunas de las cepas contenidas en el taxón ocho podrían corresponderse con esta especie por el hecho de producir fluoresceína y utilizar un número reducido de compuestos nutritivos, aunque no se ajustaron a ninguno de los perfiles introducidos en la base de datos. *P. lundensis* ha sido aislada también a partir de carne (Mölin y Ternström, 1986a; Prieto y col, 1992a) y leche alterada (Ternström y col, 1993). En pescado alterado han sido detectadas, representando un pequeño porcentaje de la flora alterante, por Sternström y Mölin (1990). El taxón III de Shaw y Latty (1982) podría corresponderse, asimismo, con esta especie, ya que al introducir el perfil fenotípico de este taxón en nuestro programa de identificación, se obtuvo como resultado una gran semejanza con el taxón de *P. lundensis* de Mölin y Ternström (1986b).

Mölin y Ternström (1986a) observaron que *P. fragi* y *P. lundensis* estaban muy relacionadas filogenéticamente con *P. fluorescens*, y que dentro de los biovares de esta última especie, los biovares I y IV estaban más relacionadas con aquéllas que con los biovares II y III.

Tal y como se aprecia en la figura V.2, encontramos una serie de cepas que, aún perteneciendo al género *Pseudomonas*, fueron adscritas a especies que resultaron ser minoritarias en el conjunto de los organismos identificados. Son, en general, representantes de especies de pseudomonas que pueden ser patógenas para plantas o animales y de las que, hasta la fecha, no tenemos noticia de su aislamiento a partir de los alimentos. *P. caryophili*, *P. syringae* y *P. solanacearum* son reconocidos agentes patógenos en plantas (Palleroni, 1984). La segunda de ellas está constituida por diferentes biovariedades, pero dado la reducida importancia de esta especie en el conjunto de las pseudomonas aisladas en nuestras muestras consideramos que no era necesario llegar a ese nivel de identificación. Otra de las restantes especies aisladas, *P. pseudoalcaligenes*, es una especie bastante heterogénea que en ocasiones se ha aislado en muestras clínicas y en otras naturales (Palleroni, 1984). Por lo que respecta a *P. pseudomallei*, éste es un reconocido agente accidental de enfermedades animales y humanas, provocando la melioidosis (Palleroni, 1984), pero consideramos que su importancia como patógeno en esta serie de alimentos es muy reducida, por su baja tasa de aislamiento y por el momento del almacenamiento en que fue detectado. La mayor incidencia de estas especies se dió en las muestras de lucio (figuras V.3 a V.5), las cuales fueron tomadas en cursos bajos de los ríos y que pueden estar más en contacto con contaminación procedente de áreas agrícolas.

S. putrefaciens (anteriormente *Pseudomonas putrefaciens* y *Alteromonas putrefaciens*) ha sido la única especie aislada perteneciente al género *Shewanella*. Mölin y Ternström (1982) ya detectaron la presencia de este organismo en carne alterada, el cual se caracterizaba por ser el único capaz de producir H₂S. Se ha detectado su presencia en diversos trabajos en los que se estudiaba la flora acuática y del pescado, principalmente de origen marino (Castell y col, 1949; Chai y col, 1968; Jorgensen y Huss, 1989; Ortigosa y col, 1992; Sternström y Mölin, 1990), aunque también de agua dulce (Gram y col, 1990).

S. putrefaciens se ha considerado como uno de los microorganismos que participan más activamente en la alteración del pescado refrigerado (Gram y col, 1989; Jorgensen y Huss, 1989). Castell y col (1949) apreciaron que esta especie (*P. putrefaciens* entonces) era uno de los microorganismos que más rápidamente penetraban en la piel del pescado. Herbert y col (1971) observaron, por su parte, que era capaz de dar lugar a olores propios de la alteración del pescado (olores sulfurosos) al crecer en pescado estéril. Van Spreekens (1977) lo relacionaban con la producción de malos olores (a berza, amoniacal, a H₂S). Sternström y Mölin (1990) observaron que el 44% de las cepas aisladas en muestras de pescado en proceso de alteración pertenecían a esta especie y consideraron que, debido a la producción de H₂S y a la reducción del OTMA, era el agente alterante más potente en este tipo de muestras. Por el contrario, Gram y col (1990) afirmaron que la alteración del pescado almacenado en hielo no se caracteriza por la producción de H₂S y por la reducción del OTMA. La importancia de este microorganismo como alterante de alimentos es mayor si tenemos en cuenta que es capaz de crecer en zonas a las cuales el oxígeno tiene poco acceso (Gennari y Tomaselli, 1988; Jorgensen y col, 1988). Por lo observado en nuestro estudio, esta especie únicamente habría tenido una participación importante en la alteración de los ejemplares de lucio refrigerados, si bien tampoco habría representado un porcentaje muy elevado con respecto al resto de las especies microbianas en su conjunto (figuras V.11 y V.12). Gillespie (1981) afirmaba en su trabajo que parte de las cepas capaces de producir olores característicos a alteración del pescado (olores a H₂S y mohosos) se englobaban dentro de ese mismo agrupamiento.

Hemos detectado la presencia de cepas adscritas a *S. putrefaciens* en muestras de agallas e intestino de pescado (tabla V.4), aunque no en el resto de muestras tomadas (agua y piel) en el primer muestreo tras su captura, lo cual puede indicar que durante la realización del eviscerado estas cepas se podrían liberar a la zona comestible del pescado y multiplicarse hasta constituir una parte importante de la flora alterante, a lo largo del almacenamiento a refrigeración y antes de establecerse los síntomas de alteración. En este sentido, Chai y col (1968) detectaron una población inicial de *P. putrefaciens*, que si bien era reducida tras la captura del pescado, se incrementaba mucho durante la conservación a bajas temperaturas. Todos estos datos contradicen la hipótesis de Sternström y Mölin (1990) que atribuyen a la manipulación del pescado la procedencia de *S. putrefaciens*.

La mayor parte de las cepas de *S. putrefaciens* aisladas presentaron una pigmentación rosácea-marrón tras incubaciones largas, coloración igualmente observada en otras ocasiones (Castell y col, 1949; Gram, 1992; Sternström y Mölin, 1990; Van Spreekens, 1977), lo cual pudiera haber llevado a su confusión con la especie *P. stutzeri*, pero esta última especie, a diferencia de *S. putrefaciens*, era amilasa positiva, gelatinasa negativa, crecía en Agar Citrato y producía ácido a partir de la glucosa (Palleroni, 1981). No todas las cepas adscritas a *S. putrefaciens* mostraron actividad ornitina descarboxilasa ni redujeron el OTMA, pero en el resto de características se asemejaron mucho a las descripciones anteriores de esta especie (en algunos casos, bajo otros nombres científicos), tales como la de Castell y col (1949), la de Levine y col (1968), la de Van Spreekens (1977), la del taxón E de Lee y col (1977) y la de Hendrie y Shewan (1979) y, entre las recientes, a las de Jorgensen y Huss (1989) y Sternström y Mölin (1990). Alguna diferencia más presentaban con las cepas contenidas en el taxón I de Gillespie (1981), y aisladas también a partir de pescado, que estos autores consideraban como semejantes a las cepas de *P. putrefaciens* atípicas descritas por Van Spreekens (1977), las cuales no daban lugar a H₂S, propiedad considerada como característica diferencial para este tipo de microorganismos (Sternström y Mölin, 1990). Sin embargo, Gillespie (1981) apunta a que el medio empleado por ellos (Agar Hierro Peptona) podría no

ser lo suficientemente sensible como para detectar la presencia del H₂S producido. Parece claro que dicho taxón I de Gillespie (1981) podría ser adscrito sin dificultad a la especie *S. putrefaciens*, teniendo en cuenta el resto de los criterios de Lee y col (1977). Otras de las características clásicas de esta especie y que hemos observado entre las cepas estudiadas han sido, en primer lugar, su escasa capacidad para utilizar un número elevado de compuestos como fuente de carbono (Gillespie, 1981; Mölin y Ternström, 1982; Sternström y Mölin, 1990) y, en segundo lugar, la producción escasa de ácido, e incluso nula actividad, a partir de los azúcares ensayados (Mölin y Ternström, 1982). Además de las características anteriores, Mölin y Ternström (1982), al igual que nosotros, observaron que *A. putrefaciens* y el género *Pseudomonas* se diferenciaban en que los primeros presentaban actividad desoxirribonucleasa y eran incapaces de hidrolizar la arginina.

Tal y como se puede apreciar en el número y en el tipo de muestras en las que fueron aislados los representantes del género *Alcaligenes* (figura V.1 y tabla V.4), su importancia relativa, desde el punto de vista de la alteración del pescado, parece ser reducida. Sin embargo, hay que mencionar que las cepas contenidas en el taxón III de Gillespie (1981), a cuya descripción se aproximan nuestras cepas de *A. faecalis*, a pesar de ser muy inactivas desde el punto de vista fisiológico y de utilizar un número reducido de fuentes de carbono, eran capaces de dar lugar a olores característicos de la alteración del pescado. Sin embargo, en distintos trabajos se ha apreciado que aunque representantes de este género se ha aislado a partir de pescado recién capturado (Allen y col, 1983b; Binta y col, 1982), sus niveles decrecen a medida que avanza el almacenamiento a refrigeración de dicho pescado (Acuff y col, 1984; León Fajardo y Marth, 1979).

Al igual que en los resultados obtenidos por nosotros en truchas arco iris procedentes de una piscifactoría, Allen y col (1983b) también detectaron la presencia de *A. faecalis* y *A. denitrificans* en distintas muestras tomadas de la misma especie piscícola.

Una única cepa que, entre otras propiedades, se caracterizaba por ser móvil, se asignó al grupo *Flavobacterium/Cytophaga/Sphingobacterium*. En cuanto a las cepas contenidas en el taxón III, por otro lado no adscritas a ninguna especie, según el esquema de McMeekin y Shewan (1978) pertenecerían a la sección II de *Flavobacterium*, es decir, a la que comprendía a cepas con pigmento amarillo, oxidasa negativas y móviles. Asimismo, también guardarían cierta similitud con las cepas, aisladas a partir de leche cruda de oveja, contenidas en el taxón XI (*F. breve*) de García Armesto y col (1993).

A pesar del aislamiento, en pescado recién capturado, de cepas pertenecientes a este grupo (Nedohula y Westhoff, 1993), no parece que, por sus propias características fisiológicas, pueda jugar un papel muy importante en la alteración del pescado (Castell y Mapplebeck, 1952). Además, habiéndose aislado únicamente en los primeros estadios del almacenamiento tampoco parece probable que participase en los fenómenos alterativos.

Un aspecto interesante que se puede apreciar en las figuras V.7 y V.8 es que las distintas especies de microorganismos (e incluso sus biovares, resultados no mostrados), representan porcentajes similares dentro de cada una de las floras aerobias, tanto entre la flora mesófila como en la psicrotrofa, en contraposición a lo observado por Prieto y col (1992a), en cuyo trabajo se apreciaba la mayor incidencia de *P. fluorescens* en los recuentos realizados a 30°C (cepas aisladas a partir de canales de cordero refrigeradas) y la distinta frecuencia de

aislamiento, a ambas temperaturas de incubación, de las distintas biovariedades de esta misma especie observadas.

En función de la zona morfológica del pescado, también se aprecia cierta variabilidad en cuanto al grupo mayoritario de microorganismos presentes (figuras V.6 a V.8). En las muestras de piel, en las cuales la variedad de especies presentes fue mucho mayor que en la cavidad abdominal, las especies mayoritarias fueron *P. putida* y *P. fluorescens*. En la superficie de la cavidad abdominal y en tejido muscular se aproximaron bastante, entre sí, los porcentajes relativos a la flora total de *P. fluorescens* (25% en ambas muestras), *P. putida* (25.6 y 35.5% respectivamente) y *S. putrefaciens* (23.8 y 16.8). Las pseudomonas no identificadas a nivel de especie apenas representaron niveles importantes en tejido muscular, en contraposición a lo ocurrido en las otras muestras, mientras que *P. fragi* y *S. putrefaciens* se aislaron en mucha menor medida en piel que en cavidad abdominal y músculo. El hecho de que estas dos especies presentaran niveles más elevados en aquellas muestras en las cuales la disponibilidad de oxígeno era menor (cavidad abdominal y tejido muscular) nos lleva a pensar en una mejor adaptación de ambas especies a estas condiciones, lo que unido a su reconocida capacidad alterante podría indicar que los estudios tendentes a retrasar la alteración del pescado habrían de centrarse en la inhibición de ambas.

ANALISIS NUMERICO

En el presente trabajo hemos empleado, como método de clasificación, un análisis numérico y los resultados obtenidos han sido satisfactorios. En los últimos cuarenta años ha sido uno de los sistemas más utilizados con ese fin (Grimes y col, 1993), si bien la distinta metodología empleada en cada estudio y los avances de la informática han aumentado y diversificado el caudal de datos obtenidos. Sneath (1957), uno de los pioneros en la aplicación de la taxonomía numérica, sugirió que el modo más lógico de clasificar bacterias era comparando las similitudes existentes entre los microorganismos teniendo en cuenta todas sus características. Colwell y Liston (1961) afirmaron que una dificultad añadida en la identificación, en este caso de un grupo concreto como son las pseudomonas, era la existencia de cepas presentes en ambientes naturales, posiblemente con alguna de sus características típicas modificadas, y proponían también el uso de un sistema consistente en comparar similitudes para facilitar la identificación de estos nuevos microorganismos. Gray y Stewart (1980) consideraron, de todos modos, que un análisis numérico de los datos fenotípicos creaba grupos que no necesariamente están relacionados genéticamente, ya que esto únicamente se puede conseguir mediante un análisis genotípico. Grimes y col (1993) apuntan que la taxonomía numérica es muy útil en la clasificación de los microorganismos, si bien solamente tiene en cuenta un 50 ó 60% de las relaciones totales entre las unidades taxonómicas operativas (OTU's, cepas) en contraste con los análisis de ácidos nucleicos, en los que se consideran hasta un 90% de esas mismas relaciones.

El crecimiento sobre distintos tipos de compuestos nutritivos como única fuente de carbono es considerado como un buen instrumento en el estudio de *Pseudomonas*, sobre todo si la siembra se realiza de modo automático, si bien puede presentar dificultades a la hora de puntuar los resultados (Mölin y Ternström, 1986a). De todos modos, no siempre es recomendable el empleo de un número elevado de fuentes de carbono para diferenciar, por

ejemplo, entre los biovares de *P. fluorescens*, y especialmente en aquellos casos en que las cepas analizadas posean unos vigores (versatilidad a la hora de utilizar diferentes fuentes de carbono) muy altos (Sternström y Mölin, 1990). En muchas ocasiones, por el contrario, un alto número de criterios fenotípicos aplicados a taxonomía numérica, especialmente las características nutricionales, pueden definir grupos que posteriormente se pueden confirmar como genespecies (Gavini y col, 1989). En nuestro estudio empleamos un total de veintiocho fuentes de carbono (ver material y métodos), algunas de las cuales no estaban relacionadas entre sí (tales como mono, di y polisacáridos, polialcoholes, aminoácidos, alcoholes y una sal), para aumentar el grado de resolución de los mismos, de acuerdo con lo recomendado por Mölin y Ternström (1986a). De este modo, cuatro de las siete pruebas con índices de separación entre taxones más elevados (por encima de 30) correspondieron a “tests” de asimilación de los siguientes compuestos carbonados (tabla V.7): tres aminoácidos (glicocola, arginina y lisina) y un alcohol (etanol), aunque algunos otros también presentaron valores medios de IS (entre 20 y 29). Para la asimilación de la arginina y, en menor grado, de la lisina (tabla V.7), se puede decir que sirve para diferenciar los taxones que contenían cepas fluorescentes y la mayor parte de *P. fragi* (*Pseudomonas* típicas) de los taxones que no contenían *Pseudomonas* (I a III) y del que contenía cepas de *Pseudomonas* con perfil atípico (XVI).

En cuanto al porcentaje mínimo de compuestos utilizados por todas las cepas contenidas en cada uno de los taxones (tabla V.7), hay que mencionar que existieron diferencias claras entre aquéllos que emplearon cerca de un 40% de los mismos (representados por los taxones 4 a 7 y 11 a 15) y correspondientes a *P. fluorescens* y *P. putida* en su mayoría, los que emplearon un mínimo del 15% (taxones 8 a 10) adscritos a *Pseudomonas* spp (conteniendo cepas cercanas a *P. lundensis*) y *P. fragi*, y aquéllos que utilizaron menos de un 8% (representados por los taxones 1 a 3) y correspondientes a *S. putrefaciens* y *A. faecalis*. Estos resultados están bastante en concordancia con los obtenidos por Mölin y Ternström (1982), que establecieron una escala en la que, de mayor a menor capacidad de asimilar compuestos de carbono, aparecían las especies *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. fragi* y *A. putrefaciens*. En esta línea, Gillespie (1981) observó que los taxones que contenían *Pseudomonas* utilizaban un número de fuentes de carbono sensiblemente superior a los taxones I (presumiblemente *S. putrefaciens*) y III (presumiblemente *Alcaligenes* spp) obtenidos en su estudio. Shelley y col (1987) encontraron diferencias, incluso, en la capacidad de asimilar fuentes de carbono por parte de distintos taxones de *P. fluorescens*, diferencias que no hemos apreciado en nuestro estudio.

Otros autores (Prieto y col, 1992a) observaron que los índices de separación más altos entre taxones correspondían a los “tests” basados en la producción de ácido a partir de azúcares. En nuestro estudio, sin embargo, únicamente seis de los veintitrés azúcares empleados en este tipo de prueba presentaron índices de separación medios (tabla V.7) y sirvieron, fundamentalmente, para diferenciar a algunos de los taxones de *Pseudomonas* que no contenían cepas fluorescentes (IV y XVI) del resto.

Siguiendo con las características nutricionales de las cepas estudiadas, cabe decir que, como norma general, la mayor parte de las cepas (tanto de *Pseudomonas*, como de los otros géneros relacionados) que eran capaces de producir ácido a partir de un determinado azúcar, también utilizaban esos mismos compuestos como fuente de carbono (tabla V.7). En un número reducido de casos, algunas cepas no utilizaron un determinado azúcar como fuente de

carbono y, sin embargo, sí que dieron lugar a ácido a partir de ese mismo compuesto, hecho puesto en evidencia por Mölin y Ternström (1982) al observar diferencias entre la capacidad de un organismo para asimilar un determinado compuesto y la capacidad para producir ácido a partir del mismo. En este sentido, Palleroni y Doudoroff (1972) afirmaron que el hecho de que algunas cepas no empleasen determinados hidratos de carbono como fuente de carbono no era óbice para que fuesen capaces de producir ácido a partir de esos mismos compuestos. De todas maneras, el fenómeno que de modo más general hemos observado es el inverso, es decir, que aunque una cepa fuese capaz de utilizar un determinado azúcar como fuente única de carbono, no necesariamente producía ácido a partir del mismo.

En este mismo orden de cosas, al igual que Palleroni y Doudoroff (1972) no hemos detectado la presencia de cepas de *Pseudomonas* capaces de hidrolizar la arginina e incapaces, al mismo tiempo, de crecer en un medio con este mismo aminoácido como única fuente de carbono (tabla V.7).

La detección de pigmentos fluorescentes tiene un valor taxonómico sustancial en los análisis de muestras de alimentos, ya que permite diferenciar los taxones adscritos a *P. fragi* de los que se asignan a especies fluorescentes. Pero esto no siempre es así ya que, de hecho, hemos observado que no todos los taxones adscritos a *P. fluorescens* (taxón 7) o a *P. putida* (taxones 11, 14 y 15) contienen más de un 85% de cepas productoras de fluoresceína (tabla V.7), porcentaje ampliamente utilizado para considerar que un taxón es positivo para una determinada prueba (Sneath, 1978b). Gillespie (1981) obtuvo un agrupamiento en el cual se encontraba la cepa tipo de *P. putida* y, sin embargo, ninguna de las cepas restantes daban lugar a pigmentos fluorescentes. En el estudio de O'Connor y col (1986) también se puede observar que tan sólo un 63% de las cepas incluidas en alguno de sus taxones adscritos a la especie *P. fluorescens* daban lugar a fluoresceína e incluso que algunas cepas eran capaces de crecer a 41°C. Por su parte, Sternström y Mölin (1990) apreciaron que no todas las cepas agrupadas en sus taxones del complejo *P. putida/P. fluorescens* poseían esa misma propiedad. En el estudio de Ternström y col (1993), aproximadamente el 20% de las cepas contenidas en los taxones con fenotipo fluorescente eran negativas para la producción de fluoresceína en el Agar King B por el método estándar. Esto pone de manifiesto lo expuesto al comienzo de la discusión del presente capítulo, en la que se comentaba la existencia de cepas que podían poseer algunas características modificadas con respecto a las de la cepa tipo de la especie a la cual pertenecían, sin duda, al tener en cuenta el resto de propiedades.

En cuanto a los “tests” correspondientes a la evaluación de las actividades extracelulares (lipolíticas, proteolíticas e hidrolíticas en general) de las cepas analizadas como factores discriminantes entre taxones (tabla V.7), hay que mencionar que, además de las reacciones sobre la yema de huevo (lipolítica), sobre la gelatina y sobre la arginina, todas ellas con IS superiores a 30, el aclaramiento de la yema de huevo, la actividad sobre la caseína y sobre el ADN tuvieron valores medios (entre 20 y 29). De todos modos, y a diferencia de las pruebas de asimilación de fuentes de carbono, ninguno de los “tests” mencionados fue capaz de establecer una separación tan clara entre taxones definidos, a pesar de que la hidrólisis de la arginina era característica de un grupo muy amplio de *Pseudomonas*. Lo que sí se puede afirmar es que los taxones que presentaban actividad gelatinasa (I, III, V, VI, VIII y XVI) podrían estar más relacionados con la alteración. La actividad desoxirribonucleasa, que para Gillespie (1981) fue característica de ciertos agrupamientos, ha

sido una de las características que más nos ha permitido diferenciar los taxones típicos del género *Pseudomonas*, de los agrupamientos III y XVI y, en menor medida, del I.

Otras prueba que podría considerarse como de cierto valor taxonómico ha sido la producción de un pigmento marrón en Agar Tirosina (tabla V.7), especialmente en los taxones IV (*P. fragi*) y XII (*P. fragi-P. putida*), lo cual podría habernos hecho pensar que era característico de la especie *P. fragi*. Sin embargo, se trata de una propiedad que también ha sido observada en algunas cepas de *P. fluorescens* cuando crecían en este mismo medio (O'Connor y col, 1986).

En cuanto a otros criterios de indudable valor taxonómico, como el número de flagelos y la acumulación de PHB (polihidroxibutirato), tienen el inconveniente de no ser útiles con el propósito de una identificación rutinaria (Gavini y col, 1989).

Dentro de los aspectos puramente taxonómicos de nuestro estudio se puede decir que se ha conseguido, mediante la aplicación de un análisis numérico, una apreciable separación entre los distintos géneros microbianos detectados (figura V.13). Así, los taxones conteniendo cepas de *Shewanella* y *Alcaligenes* aparecen claramente separados de los que contienen la inmensa mayoría de las *Pseudomonas*, con la excepción del taxón IV (constituído por cepas de *P. fragi*). El resto de las pseudomonas contenidas en taxones significativos, sin contar las incluidas en el taxón atípico (XVI), se agruparon a un nivel de semejanza del 76% y constituyeron un supertaxón de bacterias fluorescentes, semejante al obtenido por otros autores (Mölin y Ternström, 1982). Podemos afirmar, por tanto, que este método de clasificación es satisfactorio para diferenciar, a nivel de género, microorganismos Gram negativos aerobios móviles de interés alimentario.

Gray y Stewart (1980), además de observar que cepas de ambiente marino, de un mismo género pero de distinto origen geográfico, no se parecían mucho entre sí, obtuvieron una separación clara entre aquéllos microorganismos con valores G+C altos (correspondientes a los grupos I y II de Shewan y col -1960b-, es decir, pertenecientes al género *Pseudomonas*) y aquéllos con índices G+C bajos (correspondientes a los grupos III y IV de Shewan y col -1960b- con características semejantes a los géneros actualmente conocidos como *Shewanella* y *Alcaligenes*). Mölin y Ternström (1982) también obtuvieron una nítida separación entre *A. putrefaciens* y el superagrupamiento *P. fluorescens-P. putida-P. fragi*. En esta misma línea, Sternström y Mölin (1990) obtuvieron los taxones correspondientes a *S. putrefaciens* y a *Aeromonas* y los correspondientes a las especies de *Pseudomonas* (que se agruparon a un 61% de similitud -S_J-) claramente separados. En el trabajo de Allen y col (1983b) sobre cepas aisladas en una piscifactoría, se puede apreciar que los taxones de *Pseudomonas* se agrupaban a un nivel de similitud muy bajo con las cepas identificadas como *Alcaligenes*. Por el contrario, en el estudio de Austin (1982) sobre bacterias de origen marino se observa que las cepas adscritas a *Alcaligenes* y las pseudomonas se agrupan a niveles de semejanza más altos, lo cual podría indicar que las *Pseudomonas* de procedencia marina están más relacionadas con las cepas del género *Alcaligenes*, que las de origen continental.

Dentro del supertaxón de pseudomonas "típicas" (fluorescentes en su mayoría) se observó la existencia de dos grandes superagrupamientos definidos a un 77% (figura V.13), uno que contenía a la mayor parte de las cepas de la especie *P. fluorescens* (así como a cepas

semejantes a *P. lundensis*) y otro que agrupaba a la mayoría de *P. putida*. Sin embargo, al observar los agrupamientos definidos al 81% de semejanza (figura V.13) podemos apreciar la existencia de taxones cuyo fenotipo es intermedio entre dos especies o entre dos biotipos de una misma especie o, dicho en otras palabras, se han observado dificultades a la hora de establecer demarcaciones claras entre las especies y los biovares de *Pseudomonas*.

De este modo, el taxón IX presentaba un fenotipo a medio camino entre *P. fluorescens* y *P. putida* (a pesar de lo cual lo adscribimos a *Pseudomonas* spp), hecho observado, asimismo, por otros autores (Núñez y col -1984- en leche de oveja). Gillespie (1981) consideró que su taxón II, que se agrupaba a un 77% S_{SM} con el taxón que contenía *P. putida* y a un 79% S_{SM} con el de *P. fluorescens*, y que tenía, en este caso apreciando las propiedades del centroide del agrupamiento y no sus cepas por separado, propiedades típicas de *P. putida* (gelatinasa negativo y no denitrificante) y de *P. fluorescens* (asimilaba la trealosa), incluía a cepas no pigmentadas intermedias entre ambas especies y recomendaba que se identificase como *P. fragi* (contenía la cepa tipo de esta especie). Sin embargo, nosotros consideramos que nuestro taxón IX, a pesar de ser intermedio entre ambas especies, no guarda ninguna relación con el fenotipo de *P. fragi*. Mölin y Ternström (1986a) observaron que entre los diferentes biovares del complejo *P. fluorescens/P. putida* no existían unas líneas claras de separación. Advirtieron, por tanto, de la presencia de continuaciones (que podrían darse por transferencia de material genético entre microorganismos) entre dichos biovares. Concluyeron que cuantas más cepas de muy distintos ambientes se caracterizasen, esas continuaciones serían completadas gradualmente. Sternström y Mölin (1990) apreciaron, asimismo, la proximidad entre los taxones que obtuvieron de *P. putida* y *P. fluorescens*, con el establecimiento de taxones intermedios entre ambas especies y la creación de superagrupamientos a niveles de similitud ligeramente más bajos (70%), como en nuestro estudio. En algunos casos incluso (Ternström y col, 1993) alguno de los taxones obtenidos por análisis numérico fueron adscritos a la especie *P. fluorescens*, y no a *P. putida* (aunque coincidieran con esta especie en su nulas actividades proteolítica y lipolítica) debido a que se encontraban en el área de influencia de aquéllas.

Por otro lado, no hemos apreciado la existencia de taxones intermedios entre *P. fluorescens* y *P. fragi* (Shaw y Latty, 1982) caracterizados, principalmente, por ser activos frente a la gelatina, productores de fluoresceína, pero que utilizan un número reducido de fuentes de carbono (Mölin y Ternström, 1982), pero sí entre *P. putida* y *P. fragi* (taxón XII - figura V.13-). En el trabajo de Shelley y col (1987) se puede observar una relación más estrecha entre ambas especies (que se agruparon antes entre sí que con *P. fluorescens*) que en los estudios de otros autores (Mölin y Ternström, 1982; Prieto y col, 1992a) en los que la relación entre ellas era, más bien, laxa.

En cuanto a la existencia de taxones intermedios entre los distintos biovares de *P. fluorescens* detectados, cabe decir, en primer lugar, que no se ha encontrado una relación muy estrecha, como la encontrada por Ternström y col (1993) o por Cox y McRae (1989), entre las cepas identificadas como pertenecientes a los biovares I y III de esta misma especie, ya que confluyeron a niveles de semejanza del 77% (S_{SM}) dentro del superagrupamiento de *P. fluorescens* (figura V.13), ni tan lejana como la obtenida por Prieto y col (1992a). Estos últimos observaron que los taxones adscritos al biovar I de *P. fluorescens* se agrupaban antes con otras especies, especialmente *P. lundensis* y, en segunda instancia *P. fragi* y *P. putida*

biovar A, que con *P. fluorescens* biovar III. En segundo lugar, hay que mencionar la gran heterogeneidad mostrada por las cepas identificadas como *P. fluorescens* biovar V y que se ha manifestado, en este trabajo, al aparecer dichas cepas diseminadas en distintos taxones del superagrupamiento de *P. fluorescens* (figura V.13). Entre ellos, destacan los grupos adscritos como intermedios entre este biovar y otros biovars de *P. fluorescens*, como el I (taxón VI) y el III (taxón VII). En el estudio de Cox y McRae (1989), el taxón correspondiente a *P. fluorescens* biovar V confluyó con el resto de biovars de esta misma especie una vez que éstos ya se habían agrupado.

En cuanto a los dos biovars de *P. putida*, tradicionalmente se ha venido considerando que el biovar B de esta especie está más cercano a *P. fluorescens* (Palleroni, 1981) que al biovar A, fenómeno que no hemos observado en nuestro análisis taxonómico (figura V.13), probablemente debido a que no hemos empleado un número suficiente de fuentes de carbono para facilitar su discriminación. Por el contrario, hemos apreciado que, con las pruebas fenotípicas empleadas, se pone de manifiesto una íntima relación entre ambas especies, ya que ninguno de los taxones de *P. putida* se pudo adscribir a alguno de los dos biovars.

En concordancia con lo apreciado por otros autores, hemos podido observar la escasa relación existente entre las cepas de colección utilizadas en este estudio taxonómico y las cepas salvajes aisladas a partir de pescado de agua dulce (figura V.13), lo cual nos podría llevar a cuestionar la validez de dichas cepas como referencia interna en este tipo de estudios. Allen y col (1983b), en cuyo trabajo (taxonomía numérica de cepas de origen acuático) únicamente un número reducido de cepas patrón fueron capaces de agruparse en taxones definidos, ya apuntaban las dificultades que representaba la selección de cultivos “con nombre” para la identificación de los grupos obtenidos en análisis de poblaciones heterogéneas, así como el carácter atípico de cepas tipo al ser comparadas con aislamientos frescos. Mölin y Ternström (1986a) observaron que muchas cepas tipo y de referencia pertenecientes al género *Pseudomonas* aparecían muy alejadas de las pseudomonas ambientales agrupadas. En algunos casos, como el de Lee y col (1977) y el de O'Connor y col (1986), las cepas tipo de diversas especies de *Pseudomonas* constituían taxones independientes (y exclusivos, en el segundo de los trabajos) de este tipo de organismos. Cox y McRae (1989) únicamente obtuvieron agrupadas en taxones definidos a dieciséis de las veinte cepas tipo que emplearon en su estudio taxonómico. Finalmente, Sternström y Mölin (1990) apreciaron que algunas cepas tipo, incluida la de *S. putrefaciens*, y de referencia de fuentes distintas al pescado no se agrupaban en ninguno de los taxones que obtuvieron.

Si hubiésemos empleado el esquema simple de Shewan y col (1960b) el resultado de los análisis de los HMO (tablas V.7 y V.8) no habría sido muy diferente al aquí mostrado, ya que el grupo I de Shewan y col (1960b), tal y como ellos lo definieron, contenía cepas fluorescentes. El II contenía la cepa tipo de *P. fragi*, y el III y el IV posteriormente fueron reconocidos como grupos separados del género *Pseudomonas*. La existencia de taxones identificados como intermedios entre los grupos I y II se debe a que, a pesar de contener cepas productoras de fluoresceína, presentaban un perfil a medio camino entre ambos grupos. Las adscripciones nominación de los taxones XVI y, principalmente, III serían las únicas que no coincidirían con los resultados obtenidos por nosotros. En el taxón III (serían enterobacteriáceas para Shewan y col -1960b-) hay que tener en cuenta que como segundo criterio empleado en dicha clave dicotómica se encontraba la reacción de la oxidasa y no la

prueba de la producción anaeróbica de ácido a partir de la glucosa, propiedad que consideramos de igual valor taxonómico que la anterior. Lee y Harrison (1968) realizaron un estudio, durante el almacenamiento del pescado a bajas temperaturas, en el cual observaron la evolución de los distintos grupos microbianos y la importancia relativa de cada uno de ellos con respecto a la flora total. Así apreciaron que el grupo microbiano predominante en el pescado alterado (al final del periodo de almacenamiento) era el grupo II de *Pseudomonas* (según la descripción de Shewan y col, 1960b). El grupo I (*P. fluorescens*) representaba un porcentaje considerable de la flora inicial total, al igual que el grupo IV (*S. putrefaciens*), pero eran los grupos II y IV los que veían incrementados sus niveles durante el almacenamiento.

Como conclusión, habría que mencionar que las especies aisladas mayoritariamente en el transcurso de este estudio corresponden a aquellas consideradas de mayor importancia como alterantes de los alimentos refrigerados, en general, y del pescado en particular, si bien la especie *P. putida* se ha aislado en niveles apreciablemente más altos que en otros estudios, justo a la inversa de lo acontecido con *P. fragi*.

CAPÍTULO VI:

ESTUDIO TAXÓNOMICO DE LOS MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS INMÓVILES Y ANAEROBIOS FACULTATIVOS

INTRODUCCIÓN

El papel que, en la alteración del pescado, tienen las bacterias Gram negativas aerobias inmóviles y las Gram negativas anaerobias facultativas no parece ser tan importante como el desempeñado por el grupo constituido por el género *Pseudomonas* y otras bacterias relacionadas (ver capítulo V). No obstante, sí es importante hacer hincapié en que ambos grupos microbianos se han venido aislando con bastante frecuencia, no sólo a partir de pescado fresco, sino también de pescado alterado (Shewan, 1971). Esto podría inducirnos a pensar que, si bien su participación en dicha alteración no es muy activa, sí podrían desempeñar algún papel en el desencadenamiento de la misma durante los primeros estadios del almacenamiento a refrigeración.

Ya en el capítulo IV mencionábamos, de modo sucinto, cuales eran los principales géneros microbianos que se encontraban comprendidos bajo los epígrafes Gram negativos aerobios inmóviles y Gram negativos anaerobios facultativos y que incluyen especies que son importantes desde el punto de vista de la microbiología del pescado. Dentro de los primeros hay que distinguir dos subgrupos de interés:

1. Bacterias productoras de pigmento amarillo o anaranjado (no difusible) cuando crecen en un medio sólido: dentro de éstas se encuentran las cepas pertenecientes al género *Flavobacterium*.
2. Bacterias incapaces de producir pigmentos (no difusibles) en medio sólido: a este grupo pertenecen los géneros *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Psychrobacter*.

El género *Flavobacterium*, en la edición del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (Holmes y col, 1984), aparece constituido por siete especies, de las cuales *F. aquatile* y *F. balustinum* se han detectado en muestras distintas de las de origen clínico, especialmente en hábitats acuáticos. A pesar de compartir distintas características con los géneros comprendidos en el subgrupo 2, no parece que haya ninguna relación entre estos microorganismos (*Flavobacterium*) y las bacterias saprofitas inmóviles no pigmentadas (Bovre y col, 1974).

Durante mucho tiempo, y hasta los años sesenta (e incluso durante décadas posteriores), las bacterias no pigmentadas aisladas a partir de pescado fresco y refrigerado recibieron el nombre genérico de *Achromobacter* (Castell y Anderson, 1948; Ingram y Shewan, 1960; Kazanas, 1968; Laycock y Regier, 1970). Desde la década de los sesenta y sucesivas, la posición taxonómica de estos microorganismos se ha clarificado considerablemente hasta el punto de agruparlos dentro de géneros distintos, si bien relacionados en mayor o menor grado entre sí, y diferenciados de otros géneros, fenotípicamente próximos, de interés clínico pero de importancia nula en microbiología de los

alimentos. Shewan y col (1960a) definían al grupo *Achromobacter* como cocobacilos cortos, Gram negativos, inmóviles, que daban lugar a colonias blanco grisáceas y ligeramente opacas cuando crecían en medio sólido, sensibles a la penicilina, bioquímicamente inactivas y que se distinguían de *Pseudomonas* por su inmovilidad y por su morfología microscópica. Fue en las décadas de los cincuenta y sesenta cuando se empezó a estudiar en profundidad la microbiología del pescado y su relación con la alteración del mismo, tal y como hemos reflejado en los capítulos I y IV. Posiblemente debido a las dificultades existentes por aquel entonces en la identificación de estos microorganismos Gram negativos inmóviles algunos autores apreciaban que “cepas de *Achromobacter*” eran capaces de desarrollar olores pútridos en pescado almacenado a 3°C (Castell y Anderson, 1948) así como olores ligeros y pequeños cambios visibles en tejido muscular (Shewan y col, 1960a). Lerke y col (1963), por el contrario, observaron que crecían en jugo de pescado, pero que no producían alteración detectable organoléptica o químicamente. En este mismo sentido, Kazanas (1968) pudo ver que cepas de *Achromobacter* aisladas de pescado de agua dulce no desarrollaban ninguna actividad proteolítica, aunque Laycock y Regier (1970) observaron que daban lugar a cambios en la textura de pescado irradiado (puede que se tratase de un fenómeno similar al observado por Shewan y col -1960a-). A las cepas contenidas bajo el epígrafe *Achromobacter* se las relacionaba con el género *Moraxella*, incluido en la familia *Neisseriaceae* (Baumann y col, 1968a).

Previamente, Ingram y Shewan (1960) se hicieron eco del realojamiento de las cepas de *Achromobacter* dentro de un nuevo género microbiano, *Acinetobacter*, ya que a pesar de que mantenían cierta similitud fenotípica con el género *Neisseria*, no se consideraba recomendable el reconocer bajo este último nombre a cepas aisladas de los alimentos. Paralelamente, para acomodar a las bacterias inmóviles oxidasa positivas se comenzó a emplear el término “bacterias semejantes a *Moraxella*” o “*Moraxella-like*” (Shaw y Shewan, 1968; Van Spreekens, 1977). Dentro de este clima de confusión que reinaba alrededor de este grupo de microorganismos de origen alimentario Thornley (1967) arrojó un poco de luz al realizar un estudio taxonómico sobre cepas Gram negativas, no pigmentadas e inmóviles de diversos orígenes, en el que obtuvo, entre otros, dos taxones definidos, uno conteniendo bacterias oxidasa positivas y otro con oxidasa negativas, claramente diferenciados entre sí. Un tercer taxón, relacionado estrechamente con los anteriores, contenía cepas tanto positivas como negativas para esa misma característica. Al conjunto de estos agrupamientos los definió como *Acinetobacter* y describió sus características fenotípicas: cocobacilos Gram negativos o Gram variables, aerobios, catalasa positivos, que producían colonias blanquecinas a cremosas y que no hidrolizaban la arginina.

Baumann y col (1968a) propusieron reservar el nombre *Moraxella* para las cepas cocobacilares inmóviles, aerobias estrictas, no pigmentadas, sensibles a la penicilina y que eran oxidasa positivas (incluían a las entonces llamadas “falsas neiserias”). Entre otras características comunes se encontraban su incapacidad para crecer en presencia de polisacáridos, disacáridos, polialcoholes y glucosa, y para producir ácido a partir de este último azúcar. Paralelamente se propuso que bajo el nombre *Acinetobacter* se agrupase a las bacterias de características bioquímicas similares a las anteriores, pero que eran oxidasa negativas. Se aceptaba, dentro de este género, la existencia de tres especies: *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii* y *A. hemolysans* (Baumann y col, 1968b). Se caracterizaban por asimilar pentosas (poseían la aldosa-deshidrogenasa), siendo mayoría las que utilizaban glucosa como sustrato de crecimiento. Asimismo, observaron la existencia de una gran variabilidad nutricional entre

estos microorganismos oxidasa negativos y sugirieron que un análisis computerizado de sus propiedades fenotípicas podría ser de ayuda para el reconocimiento de subgrupos o especies. Apreciaron la existencia de dos grupos definidos, dentro de *Acinetobacter*, que se diferenciaban en función de su versatilidad nutricional (las cepas incluidas el grupo A asimilaban un mayor número de fuentes de carbono que las comprendidas en el grupo B). Henriksen (1973, 1976) contribuyó a la diferenciación entre ambos géneros, basándose no sólo en pruebas fenotípicas, sino también en sus hábitats característicos (*Acinetobacter* común en suelo y aguas, y *Moraxella* en muestras clínicas -si bien no consideraba los nichos ecológicos de *M. osloensis* y *M. phenylpiruvica* por no tener información de los mismos-), y afirmó que eran lo suficientemente distintos como para que no fueran considerados como un único género. En este sentido, Henriksen (1976) recomendaba que ambos géneros se incluyeran en la misma familia (*Neisseriaceae*), si bien no descartó la constitución de una nueva familia para alojar a *Acinetobacter* (*Acinetobacteriaceae*) debido a la diferencias de carácter fenotípico y ecológico entre ambos géneros en los distintos estudios genéticos llevados a cabo. En cuanto al hábitat de *Acinetobacter*, hay que mencionar que aparte de haberse aislado a partir de agua y del suelo, lo ha sido en diversos alimentos (leche, carne de pollo e incluso alimentos congelados) y en humanos, dónde puede llegar a ser un patógeno oportunista (Henriksen, 1973; Van Landschoot y col, 1986).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto con anterioridad es lógico pensar que, por tanto, las cepas Gram negativas inmóviles y oxidasa negativas aisladas a partir de pescado marino fresco y alterado, y de pescado de agua dulce se hayan identificado como *Acinetobacter*, mientras que las oxidasa positivas de ese mismo origen lo hayan sido como *Moraxella* o reconocidas como “bacterias semejantes a *Moraxella*” (Hendrie y Shewan, 1979; Gennari y col, 1989), a pesar de lo cual el término *Achromobacter* se siguió empleando durante una serie de años para referirse a bacterias saprofitas carentes de pigmento (Juni y Heym, 1980).

Bovre y col (1974) analizaron bacterias Gram negativas relacionadas con *Moraxella*, entre las cuales detectaron la presencia de bacterias psicrotrofas (procedentes de carne de aves y de pescado) que, al igual que las cepas de *Acinetobacter*, eran capaces de oxidar aldosas. Estos mismos autores postularon que dichos organismos podrían constituir un grupo intermedio entre *Acinetobacter* y *Moraxella*. Juni y Heym (1980) estudiaron “bacterias semejantes a *Moraxella*” aisladas a partir de diversos alimentos (pescado, carne de aves, alimentos irradiados) cuya principal característica era su carácter psicrotrofo. Estas cepas, por otro lado, no parecían estar relacionadas con las verdaderas moraxelas y concluyeron que estos organismos no eran miembros de ningún género conocido. Ito e Iizuka (1983) observaron las diferencias fenotípicas existentes entre las cepas de “*Moraxella*-like” aisladas de pescado, salchichas de Viena, kamaboko y carne de aves (y que respondían a las características que acabamos de enumerar), y las de *Acinetobacter* y *M. osloensis*. Juni y Heym (1986) propusieron el nombre de *Psychrobacter immobilis* para este grupo de cepas psicrotrofas, aerobias, cocobacilares, Gram negativas inmóviles, oxidasa positivas y asociadas a pescado, carne procesada de cerdo y vacuno y a carne de aves (en algún caso también aisladas a partir de muestras clínicas). Esta especie, aunque compartía propiedades con las moraxelas, difería de éstas, en general, en cuanto a su temperatura óptima de crecimiento, y a la producción de ácido a partir de diversos azúcares (entre los que se encontraba la glucosa). Estos mismos autores (Juni y Heym, 1986) determinaron, asimismo, que eran miembros de una única genoespecie y sugirieron su inclusión en la familia *Neisseriaceae*. Gennari y col (1989), en su estudio sobre la flora microbiana de sardinas del Mediterráneo, concluyeron que era obvio considerar, como miembro de *P. immobilis*, a la mayor parte de las cepas aisladas

entre la microflora de alimentos marinos que fueron identificadas anteriormente como *Moraxella* o “*Moraxella-like*”. En cuanto a su papel en la alteración, por lo general éste se ha ignorado debido, principalmente, a la pobre clasificación de estos organismos y a la inexactitud de su identificación (Gennari y Tomaselli, 1988), si bien podría estar relacionado con dicha alteración si se tienen en cuenta sus niveles elevados en carnes con la superficie alterada (Shaw y Latty, 1988).

Otro microorganismo Gram negativo inmóvil, pero cuyo hábitat característico es el medio acuático es *Mesophilobacter marinus*, especie que presentaba ciertas semejanzas con el género *Acinetobacter* (Nishimura y col, 1989).

En cuanto a la clasificación supragenérica de los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*, así como de otros organismos relacionados, como las falsas neiserias y las cepas de *Alysiella*, se propuso su salida de la familia *Neisseriaceae* y la creación de la familia *Moraxellaceae*, donde *Moraxella* sería el género tipo (Rossau y col, 1991). Esta nueva familia se incluiría en la superfamilia II de rRNA, dentro de la clase Proteobacteria (Stakebrandt y col, 1988), y se dividiría en dos grupos diferenciados:

- 1- *Acinetobacter*, por un lado, y
- 2- el resto de géneros incluidos en esta familia, por el otro.

Dentro de este segundo grupo, *Moraxella phenylpiruvica*, *P. immobilis* y otras bacterias relacionadas constituirían un subgrupo conteniendo cepas aisladas de alimentos diversos como carne de aves, pescado, productos irradiados y queso, así como de ambientes marinos y de material clínico. De acuerdo con la descripción de *P. immobilis* de Juni y Heym (1986) estos organismos deberían ser reconocidos bajo este último nombre, pero teniendo presente que presentarían una elevada heterogeneidad genética y fenotípica (Rossau y col, 1991). Fenotípicamente, son intermedios entre *Moraxella* y *Acinetobacter* al incluir cepas tanto mesófilas como psicrotrofas y con mayor o menor versatilidad nutricional (Rossau y col, 1991). Rossau y col (1991) y Enright y col (1994) propusieron, asimismo, que *M. phenylpiruvica* fuese excluida del género *Moraxella*. Henriksen (1976), ya advirtió que en los estudios genéticos que se habían llevado a cabo hasta esa fecha se había observado la poca relación entre *M. phenylpiruvica* y el resto de las moraxelas.

La taxonomía intragenérica del género *Acinetobacter* ha sido, también, objeto de estudio por parte de varios grupos de investigación. Pagel y Seyfried (1976) ahondaron en la diferenciación entre las cepas contenidas en el género *Acinetobacter*. Así sus cepas, de origen acuático, tenían poca actividad bioquímica, lo cual era indicativo de que su presencia podría estar relacionada con los niveles de contaminación fecal. Esto podía significar una relación entre taxón y fuente de bacterias. Juni (1984) sólo incluía a *A. calcoaceticus* dentro del género *Acinetobacter* en la primera edición del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana. Más tarde, Van Landschoot y col (1986) consideraron que este género microbiano era muy heterogéneo. Bouvet y Grimont (1986) manifestaron que la división de *Acinetobacter* en dos grupos o especies separadas en base a la producción de ácido a partir de la glucosa, tal y como se había venido produciendo, no era de ningún modo aceptable. Identificaron un total de doce grupos de hibridación y establecieron las diferencias entre ellos basándose en sus caracteres fenotípicos (temperatura máxima de crecimiento, producción de ácido a partir de la glucosa y patrón nutricional). A algunos de estos grupos de hibridación se les asignó un nombre específico: *A. calcoaceticus* (GH1), *A. baumannii* (GH2), *A. haemolyticus* (GH4), *A. juni* (GH5), *A. johnsonii* (GH7) y *A. lwoffii* (GH8-GH9). Las cepas de los GH 1 a 3 y 10-11 fueron

más versátiles nutricionalmente (correspondientes al grupo A de Baumann y col -1968b-). Bouvet y Jean-Jean (1989) elevaron el número de genoespecies a diecisiete, incluyendo a cepas proteolíticas. Soddell y col (1993), por su parte, propusieron que los grupos de hibridación 1 a 3 y 13 se agruparan en un complejo único.

Basándonos en su importancia como microorganismos presentes en los alimentos, y concretamente en el pescado, dentro de las bacterias Gram negativas y productoras de ácido a partir de la glucosa en condiciones anaerobias destacan, los representantes de la familia *Enterobacteriaceae* y de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* y, sobre todo, *Aeromonas*. Todos estos grupos microbianos se encuentran clasificados dentro de la subclase de las proteobacterias estando constituida, la familia *Vibrionaceae*, por los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* entre otros (Stackebrandt y col, 1988; Ruimy y col, 1994). En el trabajo de De Vos y col (1989) aparecen como ramas (rama *Vibrionaceae*, rama *Enterobacteriaceae* y rama *Aeromonadaceae*) dentro de la superfamilia I de ARNr.

Ya en los capítulos II y III se hizo una exhaustiva revisión de todos los aspectos relacionados con el hábitat de los representantes del género *Aeromonas*, de su aislamiento, y de la identificación a los niveles de género, especie y grupo de hibridación, así como de los factores de virulencia asociados con algunas cepas capaces de desencadenar procesos gastrointestinales en el hombre. Dentro del género *Aeromonas* se han descrito hasta trece grupos de hibridación, a algunos de los cuales se les ha asignado un nombre específico (Esteve y col, 1995c), que han mostrado un muy elevado nivel de homología en su ARNr (Martínez-Murcia y col, 1992a). Asimismo, esta especie ha sido considerada tradicionalmente como perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, pero, sin embargo, recientes estudios han mostrado que el género *Aeromonas* está lo suficientemente separado del resto de representantes de esta familia como para ser considerado ajeno a la misma (Martínez-Murcia y col, 1992a) y que, en consecuencia, merece rango de familia (McDonell y Colwell, 1985; Ruimy y col, 1994). Se propuso el epígrafe *Aeromonadaceae* para acomodar a las cepas pertenecientes al género *Aeromonas* (Colwell y col, 1986), a la vista de que el género *Aeromonas* poseía una historia evolutiva lo suficientemente diferente de las vibrionáceas como para garantizar su separación de esta familia. Este término (*Aeromonadaceae*) fue finalmente aceptado por el “International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*” (1992). Desde un punto de vista fenotípico, cabe mencionar que algunos autores han afirmado que el género *Aeromonas* posee características intermedias entre las familias *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* (Colwell y col, 1986). A pesar de estas consideraciones que acabamos de enumerar, en el capítulo IV, en el cual se estudiaron las sucesiones microbianas a lo largo del almacenamiento a refrigeración, con ánimo de simplificar incluimos a las cepas de *Aeromonas* dentro del agrupamiento *Vibrionaceae*.

En la familia *Vibrionaceae* se encuentra el género que da nombre a dicha familia microbiana, *Vibrio*, que se creó alrededor de microorganismos curvados, patógenos para animales (Ingram y Shewan, 1960). Baumann y col (1984a) reconocían la existencia de un total de veinte especies de *Vibrio* y recogían otras catorce que habían sido propuestas por diversos autores. McDonell y Colwell (1985) recomendaron que ciertas especies, anteriormente agrupadas como *Vibrio*, fueran realojadas en un nuevo género llamado *Listonella*. Así, dentro de los vibrios de interés, desde el punto de vista de los ambientes acuáticos de agua dulce, la especie *V. fluvialis* siguió siendo considerada como *Vibrio* “sensu

stricto” y *V. anguillarum* como *Listonella anguillarum* (McDonell y Colwell, 1985). Kaznowski y col (1989) manifestaron que la taxonomía dentro de la familia *Vibrionaceae* era confusa, por lo que existían grandes dificultades a la hora de identificar algunas cepas.

Otro de los géneros que se encuentra comprendido dentro de la familia *Vibrionaceae* es *Photobacterium*, que agrupa a cepas luminosas de origen marino (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992) y que en ocasiones ha sido aislado a partir de pescado (Abgrall y Cleret, 1990). En diversos estudios filogenéticos se ha puesto de manifiesto que el género *Photobacterium* se encuentra bastante próximo a *Vibrio* (McDonell y Colwell, 1985; Ruimy y col, 1994).

Por su parte, la especie *Plesiomonas shigelloides* aparece relacionada en diversos estudios con la familia *Enterobacteriaceae* (Ruimy y col, 1994), concretamente con el género *Proteus*, habiéndose propuesto la salida de esta especie de la familia *Vibrionaceae* y su inclusión en la familia *Enterobacteriaceae*. Los aspectos relativos a la ecología de este microorganismo y a su aislamiento en los alimentos, han sido discutidos en el capítulo I.

La familia *Enterobacteriaceae*, tal y como su nombre indica, agrupa a microorganismos cuyo hábitat primario es el tracto digestivo de los animales, aunque también se han encontrado con mucha frecuencia representantes de esta familia en alimentos de origen diverso, principalmente en aquéllos obtenidos a partir de animales domésticos, como la carne y la leche. Este grupo microbiano es, posiblemente, el más extensamente estudiado en la historia de la Microbiología, por lo que no vamos a discutir en profundidad la taxonomía interna de esta familia. Ésta sería una tarea interminable dado el número de géneros, especies, serogrupos y biovars actualmente establecidos. Por ello, trataremos este grupo microbiano a nivel de género con el fin de facilitar la discusión de los datos obtenidos.

En la tabla VI.1 se muestra la clasificación de las distintas tribus (ocho) y los géneros más comunes (catorce) de enterobacterias recogidas por Ewing (1986).

Tabla VI.1. División de Enterobacteriaceae en tribus y géneros.

TRIBU	GÉNERO	NÚMERO DE ESPECIES
Escherichieae	<i>Escherichia</i>	5
	<i>Shigella</i>	4
Edwarsielleae	<i>Edwarsiella</i>	3
Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	5
Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	3
Klebsielleae	<i>Klebsiella</i>	7
	<i>Enterobacter</i>	10
	<i>Hafnia</i>	1
	<i>Serratia</i>	9
Proteeae	<i>Proteus</i>	4
	<i>Morganella</i>	1
	<i>Providencia</i>	4
Yersinieae	<i>Yersinia</i>	8
Erwinieae	<i>Erwinia</i>	2

Entre los objetivos contemplados en nuestro estudio está la identificación de los microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles y Gram negativos anaerobios facultativos aislados durante el almacenamiento a refrigeración de pescado de agua dulce, haciendo especial hincapié en los representantes en aquellos géneros que pudieran tener una mayor importancia desde el punto de vista de la alteración de este tipo de alimentos (*Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Moraxella* y *Aeromonas*). Como en el capítulo V, hemos empleado soportes informáticos para la identificación microbiana de los microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles, la cual fue complementada con la realización de análisis de taxonomía numérica para establecer las relaciones fenotípicas entre los microorganismos investigados. También se procedió a la realización de la identificación clásica de los microorganismos Gram negativos anaerobios facultativos y a su posterior clasificación por métodos matemáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas objeto de estudio.

Las 106 cepas aerobias e inmóviles y los 209 microorganismos Gram negativos fermentadores de la glucosa en condiciones anaerobias (ver material y métodos del capítulo V) se sometieron a identificación clásica (siguiendo los esquemas que más adelante veremos) y a un estudio de taxonomía numérica. Con el objeto de establecer relaciones entre las cepas salvajes y microorganismos conocidos, utilizamos una serie de “cepas tipo” incluidas como patrones internos en el análisis numérico. Estos microorganismos corresponden a:

- . cepas de colección de especies reconocidas como alterantes del pescado,
- . cepas de especies que pudieran tener interés desde el punto de vista de la salud pública,
- . cepas relacionadas con el hábitat acuático.

A continuación se muestra el listado de los organismos tipo empleados en el presente capítulo:

Bacilos Gram negativos aerobios inmóviles:

Flavobacterium odoratum CECT 998
Moraxella osloensis CECT 460
Acinetobacter calcoaceticus CECT 441

Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos:

Proteus vulgaris CECT 484
Enterobacter aerogenes CECT 684
Hafnia alvei CECT 158
Serratia marcescens CECT 846
Escherichia coli ATCC 25922
Aeromonas sobria CECT 837
Aeromonas hydrophila ATCC 7966
Vibrio anguillarum ATCC 19234

Propiedades examinadas en el análisis numérico y empleadas en la identificación clásica.

GRAM NEGATIVOS AEROBIOS INMÓVILES

Las 106 cepas clasificadas previamente como bacilos y cocobacilos Gram negativos inmóviles y no productores de ácido a partir de la glucosa en condiciones anaerobias y tres microorganismos tipo de las mismas características bioquímicas y morfológicas fueron sometidas a un total de 108 pruebas fisiológicas, morfológicas, bioquímicas y nutricionales, que aparecen enumeradas a continuación. Las características de las pruebas realizadas y las condiciones de incubación empleadas en el transcurso del estudio de estos microorganismos aparecen descritos con detalle en capítulos previos (véase capítulos II y V).

Morfología en medio sólido.

Producción de pigmentos fluorescentes en Agar King A (piocianina) y King B (fluoresceína).

Crecimiento a distintas temperaturas (4, 37 y 42°C).

Tolerancia a distintas concentraciones de sal (3 y 6% de NaCl).

Crecimiento a pH 4.5.

Crecimiento en agar McConkey (Oxoid).

Crecimiento en agar TCBS (Difco).

Actividad citocromo-*c*-oxidasa.

Crecimiento en agar citrato de Simmon (Oxoid).

Producción de H₂S a partir de L-cisteína.

Actividades α y β -hemolítica.

Hidrólisis de la esculina.

Producción de indol.

Producción de levano a partir de sacarosa.

“Test” del rojo de metilo y producción de acetoina a partir de la glucosa (prueba de Voges-Proskauer).

Oxidación del gluconato.

Reducción del óxido de trimetilamina a trimetilamina.

Reducción de nitratos a nitritos.

Prueba de la hidrólisis del ONPG.

Hidrólisis del almidón.

Hidrólisis de la tirosina.

Hidrólisis del hipurato.

Hidrólisis de la urea.

Producción de ácido a partir de adonitol, almidón, L-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, glucosa, *meso*-inositol, lactosa, maltosa, manitol, D-manosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa D-ribosa, sacarosa, salicina, sorbitol, L-sorbosa, trealosa, xilitol y D-xilosa.

Producción de gas a partir de la glucosa.

Asimilación de compuestos carbonados como única fuente de carbono.

Descarboxilación de L-lisina y L-ornitina e hidrólisis de la L-arginina.

Hidrólisis del ADN.

Actividad lipolítica sobre distintos sustratos (Tween 20, Tween 80, tributirina y yema de huevo).

Aclaramiento de la yema de huevo.

Actividad proteolítica sobre distintos sustratos (gelatina, caseína y elastina).

Resistencia al agente vibriostático O-129.

GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS

En las 209 cepas clasificadas previamente como microorganismos Gram negativos fermentadores (productores de ácido de la glucosa en condiciones anaerobias), catalasa positivos y en las ocho cepas tipo incluidas en este apartado se estudiaron un total de 109 características fenotípicas, incluyendo propiedades fisiológicas, morfológicas, bioquímicas y nutricionales. Estas propiedades estudiadas han sido las mismas que las consideradas para las bacterias Gram negativas aerobias inmóviles (a las cuales nos referimos en el apartado anterior), además del “test” de la movilidad (en el medio GI), que aparece extensamente descrito en anteriores capítulos. Como para las bacterias aerobias inmóviles, las condiciones de realización de cada una de las pruebas ensayadas sobre estos microorganismos aparecen con detalle en capítulos previos (véase capítulos II, IV y V).

Análisis numérico de los datos.

Un total de 108 caracteres cuantitativos se codificaron, para las bacterias Gram negativas aerobias inmóviles, como: 0, negativo; 1, positivo y 2, prueba no realizada o resultado de difícil interpretación. Las 109 propiedades de las bacterias Gram negativas fermentadoras se codificaron de igual modo. El coeficiente de similitud S_{SM} (Sokal y Michener, 1958) se obtuvo entre cada par de cepas empleando programas en BASIC desarrollados por Prieto (1990). El agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) se llevó a cabo con el programa SPSS/PC+ V3.1 (SPSS Inc., Chicago).

También se calcularon el coeficiente de correlación (r) entre la matriz de similitud y los niveles en el fenograma derivados de los de la matriz (correlación cofenética) (Sneath, 1978a), empleando el programa NTSYS-pc V1.80 (Exeter Software, New York).

Las tablas de frecuencia se generaron mediante el programa LOTUS 1,2,3 V2.0 (Lotus Development Corporation, Texas) y fueron empleadas para determinar los caracteres más discriminantes entre taxones (Sneath, 1978a).

Reproducibilidad.

Todas las pruebas se repitieron en un 10% de las cepas (once en las bacterias Gram negativas aerobias y veintiuna en el da las Gram negativas fermentadoras). La probabilidad media de error (p) se calculó de acuerdo con lo especificado por Sneath y Johnson (1972).

Identificación clásica.

GRAM NEGATIVOS AEROBIOS INMÓVILES

Se tuvieron en cuenta las pruebas consideradas como más discriminantes por distintos autores (Bouvet y Grimont, 1986; Juni y Heym, 1986; Kämpfer y col, 1993; Prieto, 1990) y que aparecen señaladas a continuación: prueba de la oxidasa; producción de pigmento

amarillo; crecimiento a 4 y 37°C, en presencia de 3 y 6% de NaCl y en agar citrato de Simmon; producción de indol y de H₂S; hidrólisis de la urea, del Tween 80, de la gelatina, de la caseína, del ADN, del almidón y de la arginina; reducción de los nitratos a nitritos; producción de ácido a partir de glucosa, L- arabinosa, celobiosa, D-fructosa, galactosa, glicerol, maltosa, manitol, manosa, ramnosa, D-ribosa, sacarosa, almidón, trealosa y D-xilosa; asimilación de adonitol, L-arabinosa, D-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, galactosa, glicerol, glucosa, gluconato, maltosa, manitol, manosa, ramnosa, sacarosa, almidón, trealosa, D-xilosa, glicocola, L-arginina, cisteína, L-lisina, alcohol butílico, etanol y formiato sódico; reacción de la yema de huevo. Como en las bacterias Gram negativas aerobias móviles (ver capítulo V), empleamos el programa de identificación diseñado por Prieto (1994).

GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS

En primer lugar, y con el fin de realizar una clasificación preliminar, se tuvieron en cuenta las siguientes propiedades de acuerdo con Hendrie y Shewan (1979) y Shewan y col (1960b): prueba de la citocromo-c-oxidasa, producción de ácido a partir del manitol, utilización de este mismo polialcohol como única fuente de carbono y resistencia al compuesto vibriostático O-129. Así, las cepas oxidasa negativas se identificaron como *Enterobacteriaceae*; las oxidasa positivas, productoras de ácido a partir del manitol y resistentes al O-129 se adscribieron tentativamente a la familia *Aeromonadaceae*; Las cepas oxidasa positivas, fermentadoras del manitol y sensibles al O-129 fueron asignadas al género *Vibrio*; finalmente, se identificaron como *Photobacterium* aquellas cepas oxidasa positivas, sensibles al O-129 e incapaces de utilizar el manitol. Tal y como mencionamos en la introducción del presente capítulo, estos tres últimos géneros aparecían agrupados, en el capítulo IV, bajo el nombre de *Vibrionaceae*.

Enterobacteriaceae: para la identificación de las cepas contenidas en esta familia se emplearon las claves dicotómicas descritas por Koneman y col (1989), y los esquemas de identificación de Ewing (1986) y Hernández Haba y Dubón Pérez (1992). Para las cepas de este grupo se realizó la siembra en agar TSI (Oxoid) con el fin de determinar su capacidad de producción de H₂S a partir del tiosulfato sódico, ya que el uso de papel de acetato de plomo no es considerado como fiable en el estudio de enterobacterias (Ewing, 1986). La producción de H₂S en TSI no fue utilizada en el análisis numérico realizado.

Aeromonadaceae: la adscripción a especie de los miembros de esta familia se llevó a cabo teniendo en cuenta los esquemas de Abbot y col (1992), Esteve y col (1995c), Hänninen (1984) y Popoff (1984), claves que han sido discutidas con amplitud en el capítulo II.

Vibrio: en este caso se han empleado las características diagnósticas descritas por Hernández Haba y Dubón Pérez (1992) y, para las cepas capaces de crecer en el agar TCBS, las claves dicotómicas de Alsina y Blanch (1994).

Photobacterium: para este género microbiano se ha empleado el esquema de identificación de Hernández Haba y Dubón Pérez (1992).

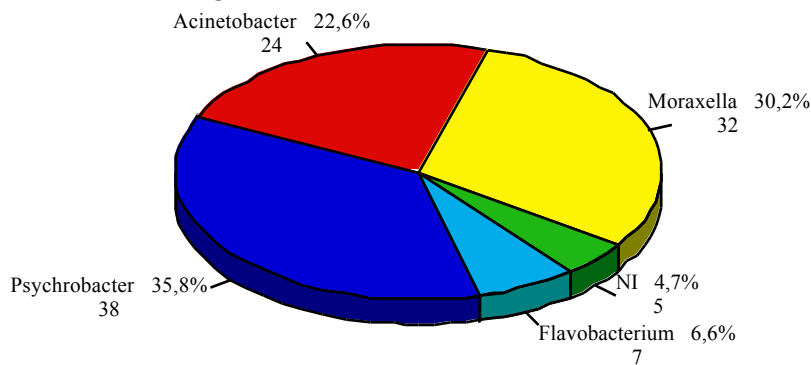
RESULTADOS

GRAM NEGATIVOS AEROBIOS INMÓVILES

Identificación clásica.

En la figura VI.1 se muestra la distribución porcentual de los géneros de microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles presentes en pescado de agua dulce desde el momento de su captura hasta el establecimiento de su alteración.

Figura VI.1. Distribución porcentual y número de cepas de cada género de microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles.



Las treinta y ocho cepas de *Psychrobacter* se adscribieron a la especie *P. immobilis*. De las treinta y dos cepas de *Moraxella*, veintitrés se identificaron como *M. phenylpiruvica*. Las restantes nueve no pudieron ser identificadas a nivel de especie. La especie mayoritaria dentro de *Acinetobacter* fue *A. johnsonii* (18 cepas), mientras que *A. lwoffii* (tres cepas) y *A. calcoaceticus* (dos cepas) fueron minoritarias. Dentro de las flavobacterias, se identificaron cuatro *F. balustinum* y una de cada de *F. breve*, *F. aquatile* y *F. odoratum*. Únicamente un 4.7% de las cepas no pudo ser asignado a ninguno de los géneros considerados.

En la tabla VI.2 se muestra la distribución de los distintos grupos de microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles entre las muestras de pescado analizadas.

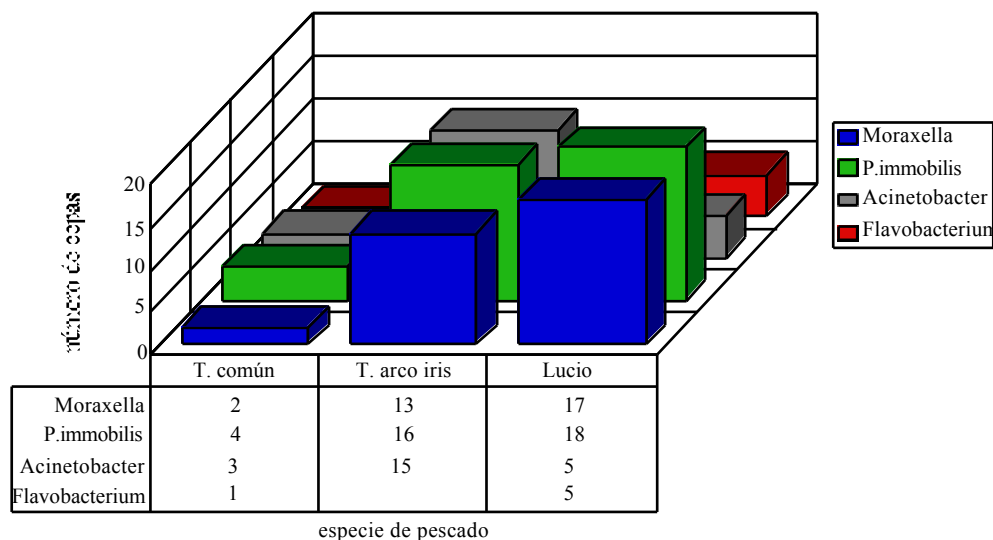
Tabla VI.2. Distribución de los grupos de bacterias Gram negativas aerobias inmóviles en función de su origen.

Muestras	Grupo microbiano				
	<i>Psychrobacter</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	NI ⁽¹⁾
Agua	3*	1	1		2
Agallas		3	3		1
Intestino	1				
Piel	15	8	9	5	1
Cavidad abdominal	10	9	8		
Tejido muscular	9	11	3	2	1

*; número de cepas; ⁽¹⁾NI, cepas no identificadas a nivel de género.

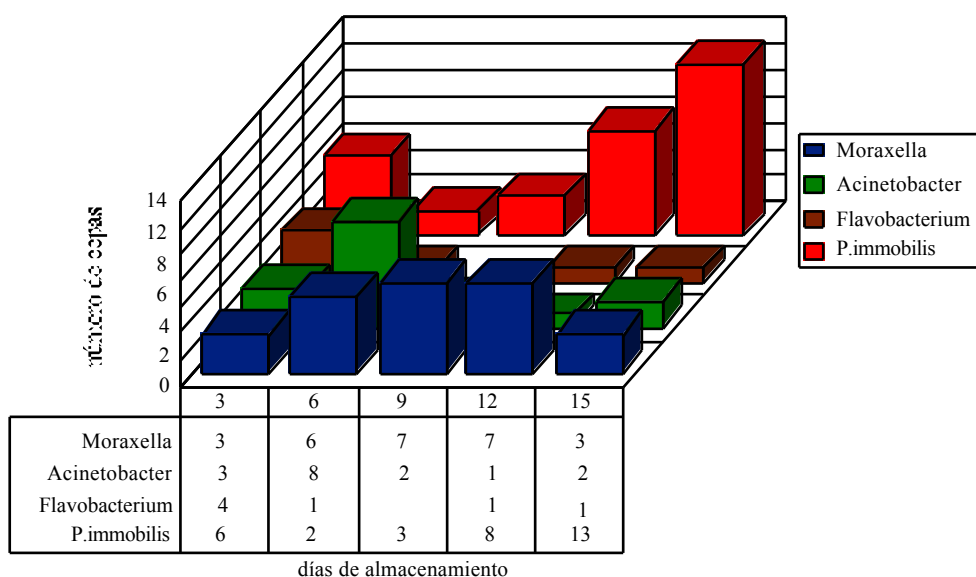
En la figura VI.2 se muestra la distribución de los géneros considerados entre las especies de pescado analizadas.

Figura VI.2. Distribución de los géneros de bacterias Gram negativas aerobias inmóviles entre las especies de pescado consideradas.



En la figura VI.3 se puede observar la evolución, durante el almacenamiento a refrigeración del pescado, de los mismos grupos microbianos expresada como el número de cepas aisladas en cada momento de dicho almacenamiento. En esta gráfica el número total de cepas de cada grupo microbiano en cada momento del almacenamiento corresponde a la suma de las halladas en las muestras de piel, cavidad abdominal y tejido muscular.

Figura VI.3. Evolución de las poblaciones de microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles a lo largo del almacenamiento a refrigeración.



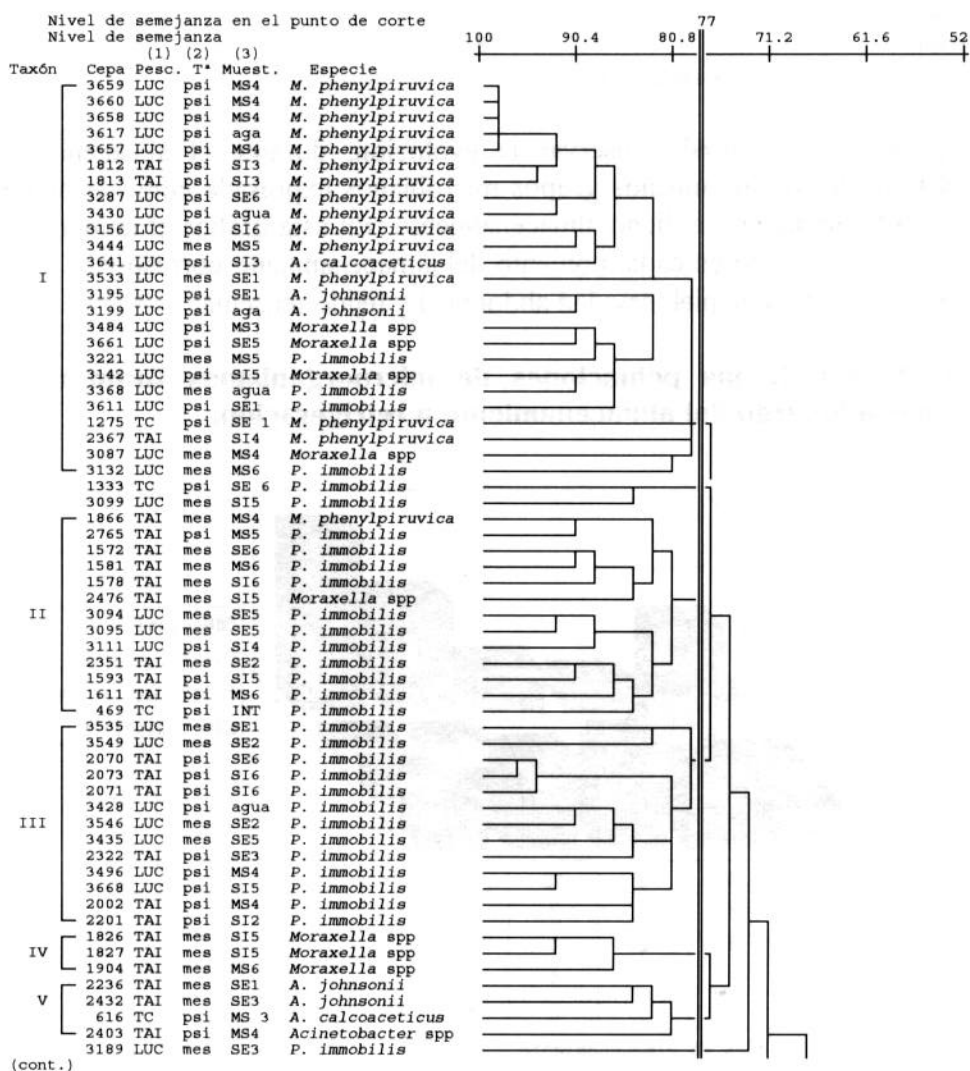
Taxonomía numérica.

En la figura VI.4 aparece el dendrograma obtenido al utilizar el coeficiente de similitud S_{SM} y el agrupamiento UPGMA. Se procedió a realizar un corte al 77% de similitud (S_{SM}) con lo que se obtuvieron un total de catorce taxones (incluyen dos o más cepas). De éstos, nueve fueron considerados como taxones significativos (constituidos por tres o más cepas), mientras que los cinco restantes lo fueron como no significativos. Diecisiete cepas, por otro lado, permanecieron sin agrupar.

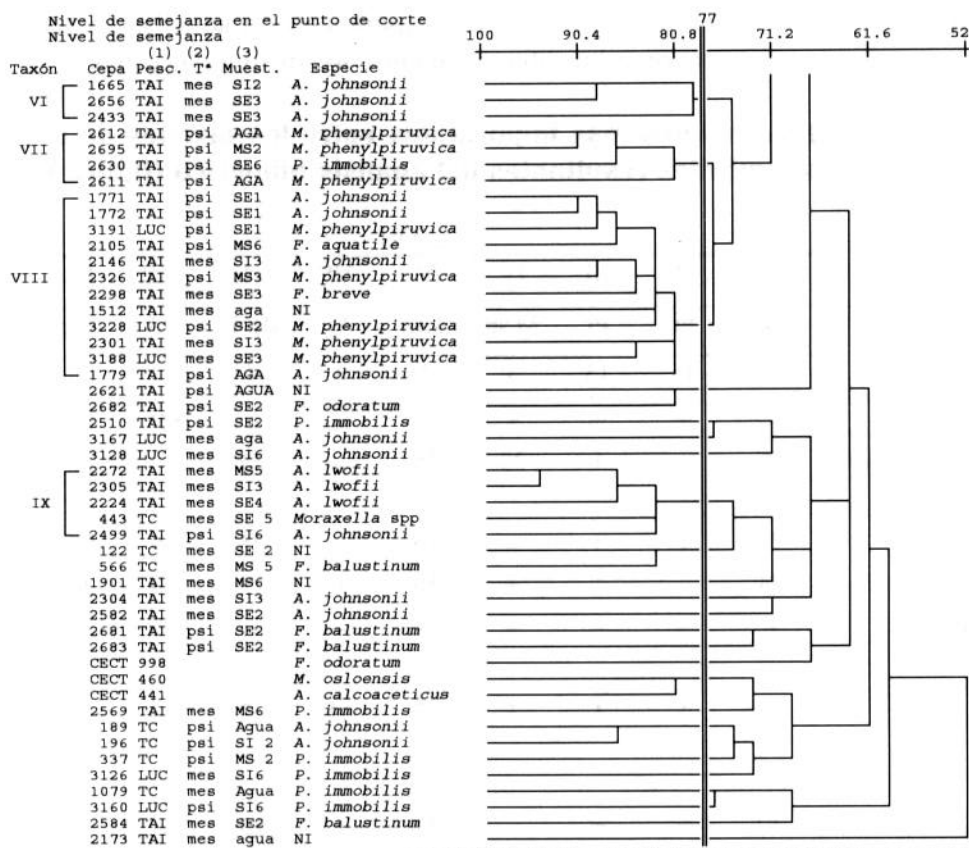
El coeficiente cofenético r fue 0.81612, valor que nos indica que no se produce una distorsión significativa de la matriz triangular de similitudes.

Ninguna de las cepas consideradas en este apartado (Gram negativas, catalasa positivas, no cocoides, no fermentadoras de la glucosa en condiciones anaerobias e inmóviles) fueron capaces de elaborar pigmentos fluorescentes en los medios King A y King B, de crecer en el Agar TCBS y de producir ácido a partir de la sorbosa.

Figura VI.4 Dendrograma resultante de aplicar el coeficiente S_{SM} y el agrupamiento UPGMA a las cepas Gram negativas, aerobias e inmóviles. Punto de corte: 77%.



(cont.)



(1) Pesc., especie de pescado en la que fueron aisladas (TC, trucha común; TAI, trucha arco iris; LUC, lucio). (2) T*, grupo del que fueron aisladas (mes, mesófilos; psi, psicrotrofos). (3) Muest., muestra (SE, piel; SI, cavidad abdominal; MS, tejido muscular).

En la tabla VI.2 se muestran los resultados correspondientes a aquellas características fenotípicas que se mostraron con mayor valor diferencial entre los distintos taxones.

Tabla VI.2. Caracteres diferenciales más importantes entre los taxones de bacterias Gram negativas aerobias inmóviles resultantes del análisis numérico (figura VI.4).

Especie†	TAXÓN								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	Mp	Pi	Pi	M.sp	A.sp	Aj	Mp-Pi	NA	A.sp
Nº de cepas	25	13	13	3	4	3	4	12	5
Oxidasa	+(¹)	+	+	+	-(²)	-	+	55*	20
Oxidación de la glucosa (aer.)	16	+	+	33	25	-	25	-	-
Morfología:									
bacilar	76	+	+	-	50	-	75	50	80
cocobacilar	24	-	-	+	50	+	25	50	20
Pigmento amarillo	-	-	-	-	-	-	-	25	-
Crecimiento a:									
4°C	+	+	+	+	25	33	75	45	+
37°C	16	-	-	-	25	-	-	17	80
Tolerancia a:									
3% NaCl	40	+	+	-	50	+	25	-	+
6% NaCl	20	-	-	-	-	67	25	17	50
pH 4.5	32	23	77	67	50	-	-	33	-
Pruebas misceláneas:									
Crec. en Agar McConkey	+	+	+	+	+	+	25	73	+
Agar Citrato de Simmon	+	+	+	67	50	33	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Voges Proskauer	-	38	23	67	25	+	-	17	20
Producción de indol	-	-	-	-	25	33	25	33	25
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	25	33	+	-	-
Hidrólisis de la urea	56	23	56	-	25	-	25	-	-
Reducción de nitritos	76	-	23	+	67	33	+	18	-
Reducción de OTMA	-	-	-	-	-	-	25	-	20
Producción ácido a partir de									
L-arabinosa	-	23	-	-	25	33	-	-	20
celobiosa	-	-	-	-	-	-	25	-	+
D-fructosa	-	-	-	-	-	67	-	-	+
galactosa	-	62	-	-	-	33	-	-	20
maltosa	-	-	17	-	25	33	+	-	+
manosa	-	54	17	33	-	33	-	-	+
ribosa	-	-	-	-	-	-	75	-	+
sacarosa	-	-	-	-	-	67	-	-	+
salicina	-	-	-	-	-	33	-	-	+
trehalosa	-	-	-	33	-	-	-	-	+

Tabla VI.2 (cont.)

Especie†	TAXÓN								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	Mp	Pi	Pi	M.sp	A.sp	Aj	Mp-Pi	NA	A.sp
Asimilación de:									
D-arabinosa	44	77	23	33	33	-	-	-	-
L-arabinosa	-	77	54	+	+	+	50	33	-
D-fructosa	+	54	+	-	33	67	25	25	60
glucosa	+	+	+	+	+	-	+	42	20
gluconato	+	+	+	+	+	-	+	-	-
maltosa	-	-	17	-	25	33	+	-	+
manitol	-	58	62	+	75	+	-	-	40
manosa	20	+	54	+	+	67	75	33	-
sacarosa	-	-	-	-	-	67	-	-	+
salicina	-	-	-	-	-	33	-	-	+
trealosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
xilitol	-	77	23	+	+	-	-	-	-
glicocola	56	+	69	33	75	-	25	-	20
arginina	73	+	+	+	+	-	-	-	20
cisteína	+	38	38	33	+	-	25	-	-
lisina	74	+	+	+	+	-	-	-	-
etanol	52	46	46	+	+	-	-	17	25
alcohol butílico	78	+	83	+	+	+	50	50	-
formiato sódico	44	50	23	+	+	-	-	-	-
Hidrólisis de:									
Tween 20	33	-	23	-	50	-	-	67	-
Tween 80	24	-	-	-	25	-	-	50	-
tributirina	36	54	+	67	+	33	25	58	60
lecitina	16	-	+	-	-	-	-	17	-
reacción yema de huevo	-	-	62	-	-	-	-	-	-
gelatina	16	-	+	-	-	-	25	33	-
caseína	-	-	77	-	-	-	-	17	-
elastina	-	-	17	33	-	-	-	-	-
DNA	-	-	-	-	50	33	-	-	-
tirosina	28	46	+	-	-	-	-	-	-
esculina	-	-	-	-	-	67	-	17	+
arginina	36	+	77	+	-	-	-	-	20
Hemólisis	32	62	62	+	25	33	-	42	-
Resistencia al O-129	+	+	+	+	50	-	75	36	+

†, adscripción a género o especie tal y como sigue: Mp, *M. phenylpiruvica*; Pi, *P. immobilis*; M. sp, *Moraxella* spp.; A. sp, *Acinetobacter* spp; Aj, *A. johnsonii*; MP-Pi, intermedio *M. phenylpiruvica*-*P. immobilis*; NA, no adscrito a ningún género. ⁽¹⁾, del 85% de las cepas son positivas para esa prueba; ⁽²⁾, del 15% de las cepas son positivas para esa prueba; *, porcentaje de cepas positivas para esa prueba. Ninguna de las cepas contenidas en los taxones significativos produjeron pigmentos anaranjados o pigmentos difusibles, ni gas a partir de la glucosa, no crecieron a 41°C. No produjeron ácido a partir del inositol, rafinosa, sorbitol, almidón y xilitol. No emplearon como única fuente de carbono inositol, sorbosa ni almidón. Igualmente, tampoco presentaron actividades amilasa, -galactosidasa y ornitina y lisina descarboxilasa.

El taxón I contenía un total de veinticinco cepas, dieciocho de las cuales se adscribieron mayoritariamente al género *Moraxella*, catorce de ellas a la especie *M. phenylpiruvica* mientras que las otras cuatro moraxelas no pudieron ser identificadas a nivel de especie. De las siete cepas restantes, cuatro se asignaron a la especie *P. immobilis*, dos a *A. johnsonii* y una a *A. calcoaceticus*. Entre las características más sobresalientes de este heterogéneo taxón destacan su incapacidad para producir ácido a partir de distintos azúcares y polialcoholes en condiciones aerobias (únicamente cuatro cepas fueron capaces de hacerlo a partir de la glucosa) y el reducido número de compuestos que emplearon como única fuente de carbono. Su actividad proteolítica y lipolítica se limitó a un número reducido de cepas. Todas fueron resistentes al compuesto antimicrobiano O-129. Este taxón, aún comprendiendo una gran variedad de especies incluidas en la familia *Moraxellaceae*, posee las características típicas que mostraron los taxones de *M. phenylpiruvica* obtenidos por Prieto y col (1992b). Por esto y por el elevado número de cepas identificadas como *M. phenylpiruvica*, finalmente lo asignamos a esta especie.

De las trece cepas incluidas en el taxón II, once se adscribieron a la especie *P. immobilis* (dos de ellas atípicas), una a *M. phenylpiruvica* y una a *Moraxella* spp. Las cepas eran mayoritariamente oxidasa positivas, daban lugar a ácido a partir de la glucosa, pero únicamente un grupo reducido era capaz de producir ácido a partir de otros azúcares. Crecieron a 4°C y en presencia de 3% de NaCl, pero no a 37°C y en presencia de 6% NaCl. No redujeron los nitratos a nitritos y asimilaron muy pocos compuestos como fuente de carbono. Su actividad hidrolítica fue casi nula, con excepción de la acción sobre la arginina. También mostraron resistencia frente al O-129. El perfil fenotípico del HMO (organismo hipotético medio) de este taxón se ajustó adecuadamente a la descripción de *P. immobilis* de Juni y Heym (1986) y al del taxón de *P. immobilis* de Prieto y col (1992b), si bien difería de este último en la producción de ácido a partir de algunos azúcares como manosa, xilosa, galactosa y arabinosa. Asimismo, las cepas contenidas en él también muestran cierto parecido a las cepas psicotrofas de Bovre y col (1974), excepto en lo referente a la hidrólisis de la urea.

El taxón III estaba compuesto, exclusivamente, por cepas de *P. immobilis* (un total de trece), ocho de las cuales mostraron un perfil atípico con respecto a las descripciones anteriores de otros representantes de esta especie, principalmente en lo relativo al empleo de un número elevado de compuestos utilizados como única fuente de carbono. Este taxón engloba a cepas que, microscópicamente, eran bacilos cortos. En el resto de sus propiedades se asemejaron mucho al taxón II, si bien mostraron una elevada capacidad para hidrolizar lípidos (tributirina y lecitina, principalmente) y proteínas (gelatina y caseína). A diferencia del taxón de *P. immobilis* de Prieto y col (1992b) fueron capaces de hidrolizar la gelatina. Algunas de las cepas, asimismo, lisaron eritrocitos de oveja en agar sangre e hidrolizaron la tirosina. También fueron resistentes al O-129. Al igual que en el taxón anterior, el HMO de este agrupamiento se asignó a *P. immobilis*.

Las tres cepas contenidas en el taxón IV no se adscribieron a ninguna especie en particular, si bien se asignaron tentativamente al género *Moraxella* aunque, al igual que en el taxón I, no fueron capaces de crecer a 37°C. Estas cepas estarían próximas a las descripciones de *M. phenylpiruvica* y *P. immobilis*, presentando características intermedias entre ambas. Entre sus rasgos más comunes destacan: su morfología cocobacilar, su capacidad para reducir

los nitratos a nitritos y para hidrolizar la arginina, así como su actividad α -hemolítica. A pesar de que, con respecto a los restantes taxones, las tres cepas utilizaron un número relativamente alto de compuestos como única fuente de carbono (un total de once de veintiocho), al igual que en aquéllos prácticamente no fueron capaces de fermentar de modo aeróbico ninguno de los azúcares ensayados. Tampoco desarrollaron actividades extracelulares notorias.

Las cepas incluidas en el taxón V fueron identificadas como pertenecientes al género *Acinetobacter*. Dos de ellas se adscribieron a *A. johnsonii* y una a *A. calcoaceticus*, mientras que la restante permaneció sin ser identificada a nivel de especie. Las cepas incluidas en este agrupamiento se caracterizaron por ser oxidasa negativas (propiedad única del género *Acinetobacter* dentro de los bacilos y cocobacilos Gram negativos aerobios estrictos), muy versátiles nutricionalmente desde el punto de vista nutricional (al igual que en el taxón IV emplearon once compuestos como fuente nutritiva exclusiva) y presentaron cierta actividad lipolítica, mientras que su restante actividad extracelular fue nula. A diferencia de la descripción dada por Bouvet y Grimont (1986) de las distintas especies de *Acinetobacter*, todas nuestras cepas fueron capaces de asimilar lisina, manosa, y xilitol, fueron variables para la utilización de adonitol, celobiosa, fructosa, maltosa y manitol, y también variables para la actividad desoxirribonucleasa, producción de H₂S, reducción de nitratos a nitritos y para la prueba del indol. La mayor parte no manifestaron crecimiento a 4°C o a 37°C (las cepas identificadas como *A. johnsonii*) y no produjeron ácido a partir de hidratos de carbono. Sólo una cepa lo hizo a partir de la glucosa. El HMO de este taxón presentó características intermedias entre las especies *A. johnsonii*, *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii*, si tenemos en cuenta el esquema de Bouvet y Grimont (1986), por lo que finalmente lo adscribimos al género *Acinetobacter* pero sin definir especie.

En el taxón VI, las tres cepas comprendidas y su HMO coincidieron con la descripción de *A. johnsonii*, excepto en lo referente a la utilización del etanol como única fuente de carbono. Como en el taxón V, todas las cepas fueron oxidasa negativas, incapaces de fermentar la glucosa y, en la mayor parte de las ocasiones, de producir ácido a partir de cualquiera de los azúcares ensayados. Su actividad extracelular fue incluso más reducida que en el taxón anterior aunque dos de las cepas hidrolizaron la esculina. Su rango de crecimiento a distintas temperaturas fue muy restringido, siendo todas incapaces de crecer a 37°C, mientras que sólo una lo hizo a 4°C. Asimismo, presentaron cierta tolerancia a crecer a concentraciones de 3 y 6% de sal y fueron positivas para la prueba del Voges Proskauer. Por lo que respecta a su perfil de asimilación de compuestos carbonados, hay que decir que difiere significativamente de los de los taxones anteriores, ya que globalmente (las tres cepas incluidas en este agrupamiento) sólo emplearon L-arabinosa, manitol y alcohol butílico como fuentes de carbono. Fueron variables para la utilización de adonitol, fructosa, manosa, salicina y sacarosa. Todas fueron sensibles al agente O-129. Una de las tres cepas dió lugar a H₂S, fue positiva para la prueba del indol y exhibió actividad desoxirribonucleasa, por lo que se separaba ligeramente de las características genéricas de este grupo microbiano.

El taxón VII contuvo cuatro cepas, tres adscritas a la especie *M. phenylpiruvica* (semejantes a las descritas por Prieto y col -1992b-) y una a *P. immobilis*. Todas las cepas fueron oxidasa positivas, y produjeron ácido a partir de la maltosa, pero únicamente una lo hizo a partir de la glucosa (la identificada como *P. immobilis*) y, excepto en la ribosa, no

fermentaron ningún otro azúcar. No crecieron a 37°C, pero fueron capaces de producir H₂S y de reducir los nitratos a nitritos. La cepa de *P. immobilis* redujo, asimismo, el OTMA a TMA, lo cual podría interpretarse como una cierta potencialidad de alteración del pescado. Su capacidad para desarrollarse empleando diferentes compuestos como fuentes de carbono fue muy limitada al utilizar (todas las cepas comprendidas en este taxón) sólo tres compuestos carbonados (glucosa, gluconato y maltosa). Su actividad extracelular a todos los niveles (frente a lípidos, proteínas, aminoácidos, eritrocitos de oveja, etc...) fue prácticamente nula. Por presentar características intermedias entre las dos especies anteriormente mencionadas, no fue adscrito a ninguna especie en particular, pudiendo considerarse como un taxón intermedio entre *M. phenylpiruvica* y *P. immobilis*.

El taxón VIII fue tanto o más heterogéneo que el taxón I. Contenía doce cepas, de las cuales cinco se adscribieron a *M. phenylpiruvica*, cuatro a *A. johnsonii* y dos al género *Flavobacterium* (una a *F. breve* y otra a *F. aquatile*). La cepa restante no pudo ser identificada a nivel de especie. Esta heterogeneidad se hizo visible en su respuesta frente a los distintos "tests" empleados para su caracterización. Así, poco más de la mitad de las cepas fueron positivas para la prueba de la oxidasa. La mayor parte de ellas fueron negativas para la producción de ácido a partir de distintos azúcares, entre los que se encontraba la glucosa. Igualmente, fueron incapaces de asimilar la casi totalidad de los compuestos empleados como única fuente de carbono. Por otro lado, algunas de las cepas presentaron cierta actividad lipolítica, siendo escasa su actividad proteolítica. Las dos cepas que desarrollaron pigmentación amarilla cuando crecían en medio sólido fueron adscritas al género *Flavobacterium*. Este taxón se asemeja mucho al taxón 4 de Thornley (1967), debido, entre otros factores, a que ambos contenían cepas oxidasa positivas y oxidasa negativas. Basándonos en su falta de homogeneidad fenotípica y en la multitud de características útiles para la diferenciación de microorganismos Gram negativos inmóviles para las cuales daban lugar a resultados intermedios, el HMO de este taxón no fue asignado, como en el caso anterior, a ninguna de las especies consideradas en este apartado del capítulo.

Por último, el taxón IX incluye tres cepas de *A. lwoffii*, una de *A. johnsonii* y una de *Moraxella* spp. Crecieron a 4 y a 37°C, pero no a 41°C. También lo hicieron en presencia de 3% de sal, fueron positivas para la prueba del rojo de metilo y dieron lugar a ácido a partir de distintos azúcares, excepción hecha de la glucosa. Como única fuente de carbono, asimilaron compuestos como maltosa, salicina, sacarosa y trealosa, sustancias que prácticamente no fueron empleadas por las cepas contenidas en los otros taxones, mientras que la glucosa y el gluconato, cuyo uso estaba extendido entre aquéllos, apenas fueron metabolizados por alguna de las cepas contenidas en el agrupamiento IX. Fueron variables para la asimilación de adonitol, celobiosa, fructosa, manitol y en la producción de indol, a diferencia de lo observado en el esquema de Bouvet y Grimont (1986). La principal característica diferencial de este taxón con respecto a otros fue su capacidad para hidrolizar la esculina. Las restantes actividades extracelulares estudiadas fueron inexistentes en este caso. El HMO de este agrupamiento coincide bastante bien con la descripción de *A. lwoffii*.

De los taxones no significativos hay que destacar a los siguientes:

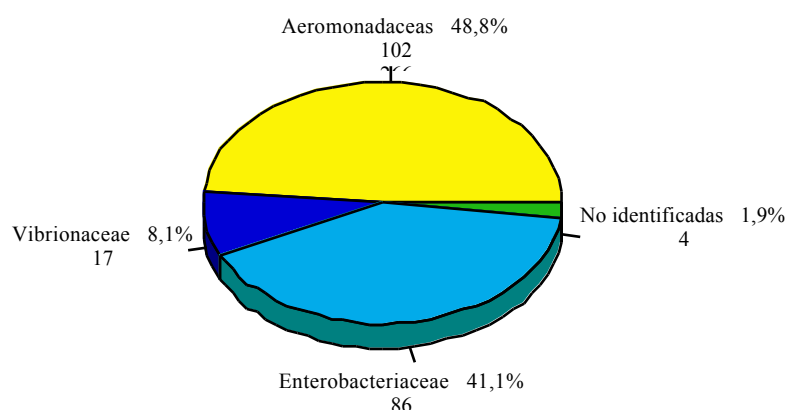
- el formado por las cepas 1333 y 99, identificadas como *P. immobilis*,
- el constituido por las cepas 189 y 196, identificadas como *A. johnsonii*, y
- el que incluye a las cepas tipo de *A. calcoaceticus* y *M. osloensis*.

GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES DE LA GLUCOSA (ANAEROBIOS FACULTATIVOS)

Identificación clásica.

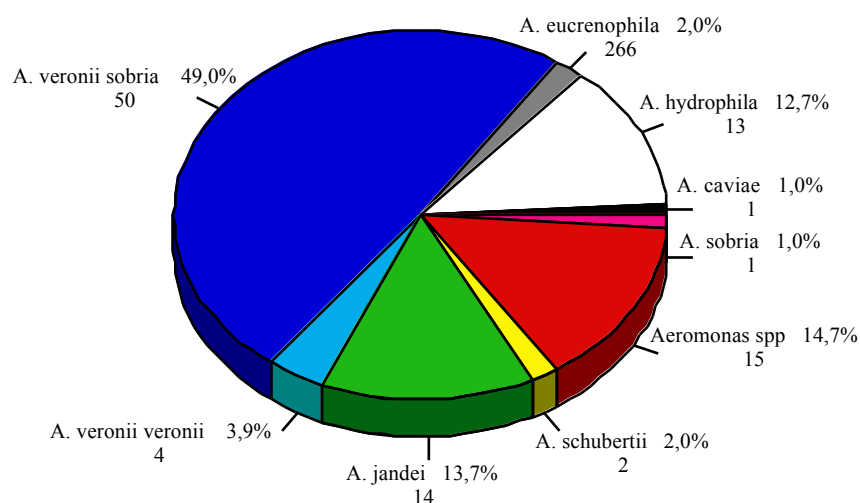
En la figura VI.5 se puede apreciar la distribución de cepas de bacterias Gram negativas fermentadoras aisladas en TSA (Oxoid) entre las distintas familias que comprenden a este tipo de microorganismos.

Figura VI.5. Distribución porcentual y número de cepas pertenecientes a cada una de las familias de microorganismos Gram negativos fermentadores.



En la figura VI.6 podemos observar el número de cepas aisladas correspondientes a las distintas especies de *Aeromonas* detectadas.

Figura VI.6 Distribución porcentual y número de cepas de cada especie de *Aeromonas* aisladas en los medios de cultivo de recuento general (mesófilos y psicrotrofos).



La distribución de especies de *Aeromonas* entre las distintas especies de pescado se presenta en la tabla VI.4.

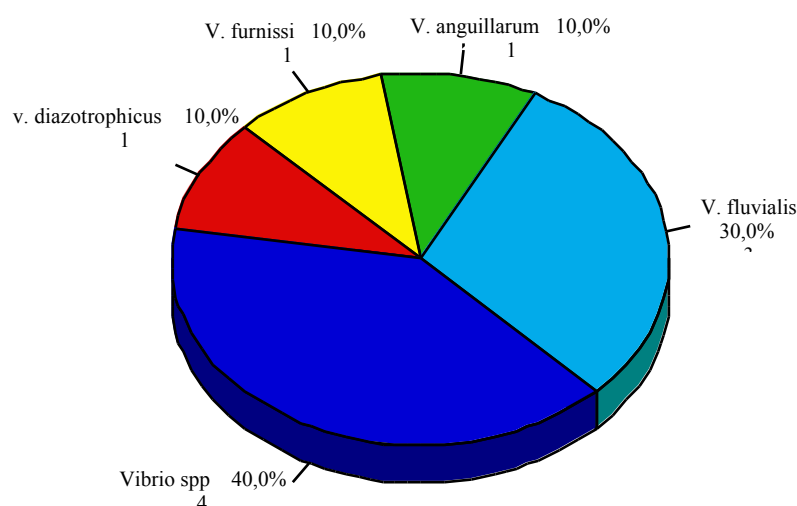
Tabla VI.4 Distribución de las especies *Aeromonas* entre las especies de pescado analizado.

Especie microbiana	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
<i>A. hydrophila</i>	6*		7
<i>A. eucrenophila</i>	2		2
<i>A. caviae</i>	1		
<i>A. veronii sobria</i>	6	1	43
<i>A. veronii veronii</i>	1		3
<i>A. sobria</i>		1	
<i>A. jandaei</i>	3		11
<i>A. schubertii</i>	2		
<i>Aeromonas</i> spp.	5	2	8

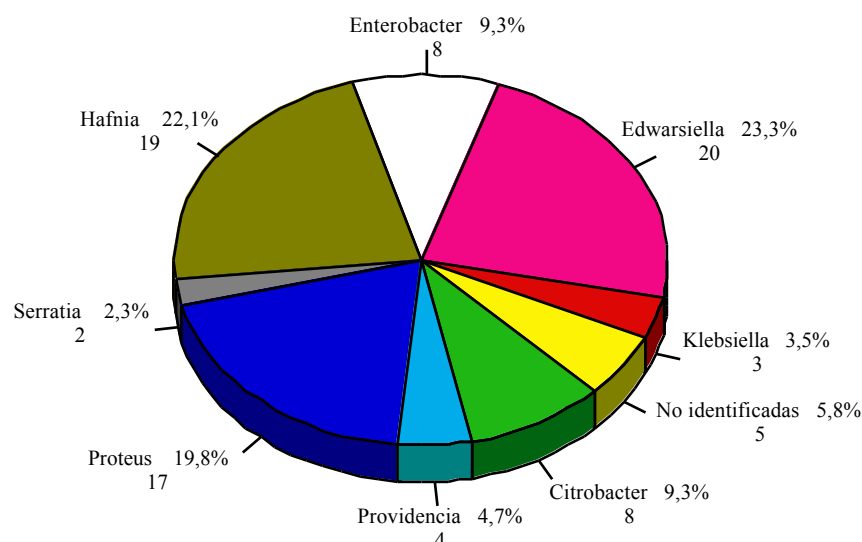
*, número de cepas.

En la figura VI.7 aparece la distribución porcentual de las diez cepas de *Vibrio* (consideramos a *L. anguillarum* como *V. anguillarum* a efectos de esta representación) aisladas en las placas de recuento general (flora mesófila y flora psicrotrofa). Todas las cepas, con excepción de tres (no identificadas a nivel de especie, encontradas en lucio) se aislaron a partir de muestras de trucha arco iris. Las otras siete vibrionáceas fueron adscritas al género *Photobacterium*.

Figura VI.7. Distribución y número de cepas pertenecientes a cada especie de *Vibrio*.



En la figura VI.8 aparece la distribución porcentual y número de cepas correspondientes a cada uno de los géneros de enterobacterias aisladas.

Figura VI.8. Géneros de enterobacterias detectados en muestras de pescado.

Todas las cepas adscritas a los géneros *Klebsiella*, *Hafnia*, *Serratia* y *Providencia* fueron identificadas, respectivamente, como *K. oxytoca*, *H. alvei*, *S. marcescens* y *Providencia stuartii*. Por otro lado, no nos fue posible adscribir las cepas de *Edwarsiella* a ninguna de las especies descritas. Del género *Proteus*, la especie predominante fue *P. mirabilis* (catorce cepas), siendo muy minoritaria *P. vulgaris*. Dentro de *Citrobacter*, *C. freundii* fue la especie aislada en mayor número (seis cepas) por delante de *C. diversus* y *C. amalonaticus*. *E. cloacae*, *E. intermedius* y *E. aerogenes* fueron las especies identificadas en el género *Enterobacter*.

Los géneros de enterobacterias predominantes en cada una de las especies de pescado se muestran en la tabla VI.5.

Tabla VI.5. Distribución de géneros de Enterobacteriaceae en las especies de pescado de agua dulce analizadas.

Género	Especie de pescado		
	Trucha común	Trucha arco iris	Lucio
<i>Klebsiella</i>	3*		
<i>Edwarsiella</i>			20
<i>Enterobacter</i>	2	1	5
<i>Hafnia</i>	4	1	14
<i>Serratia</i>	1		1
<i>Proteus</i>	13		4
<i>Providencia</i>	2	2	
<i>Citrobacter</i>	3	3	2
No identificadas	3	2	

*, número de cepas.

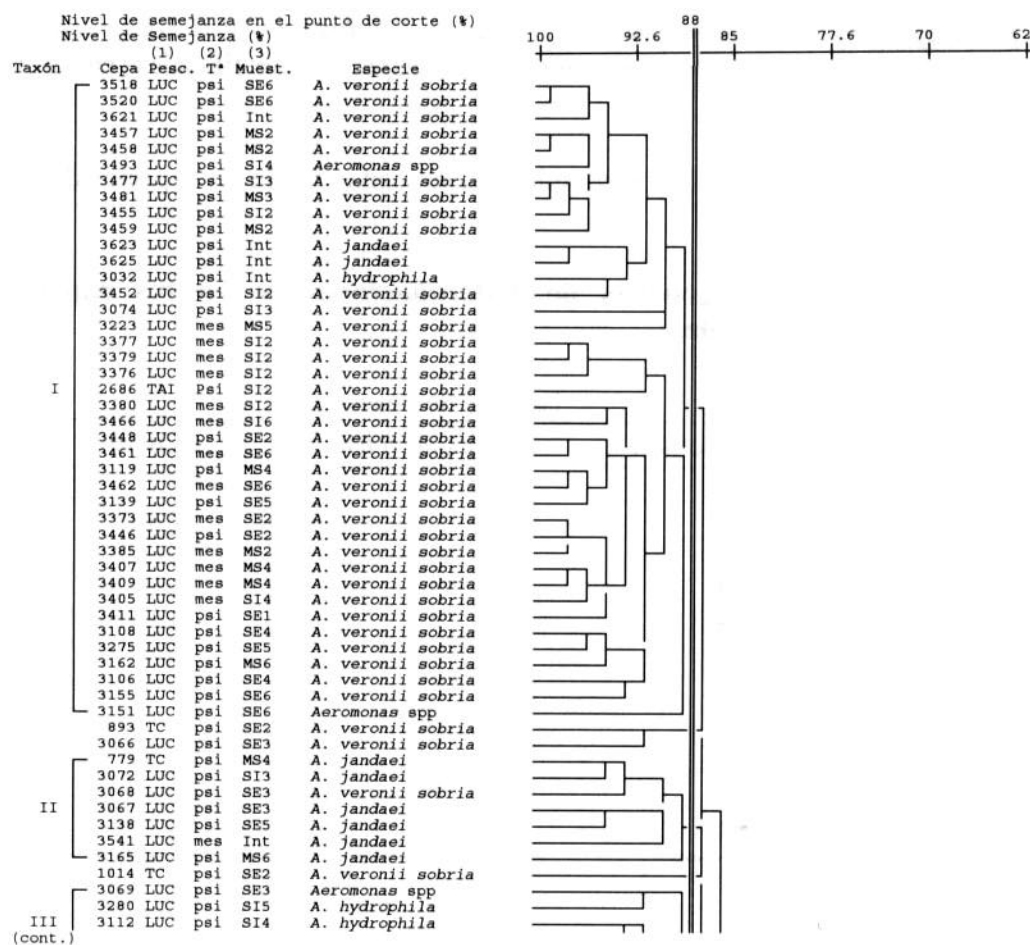
Taxonomía numérica.

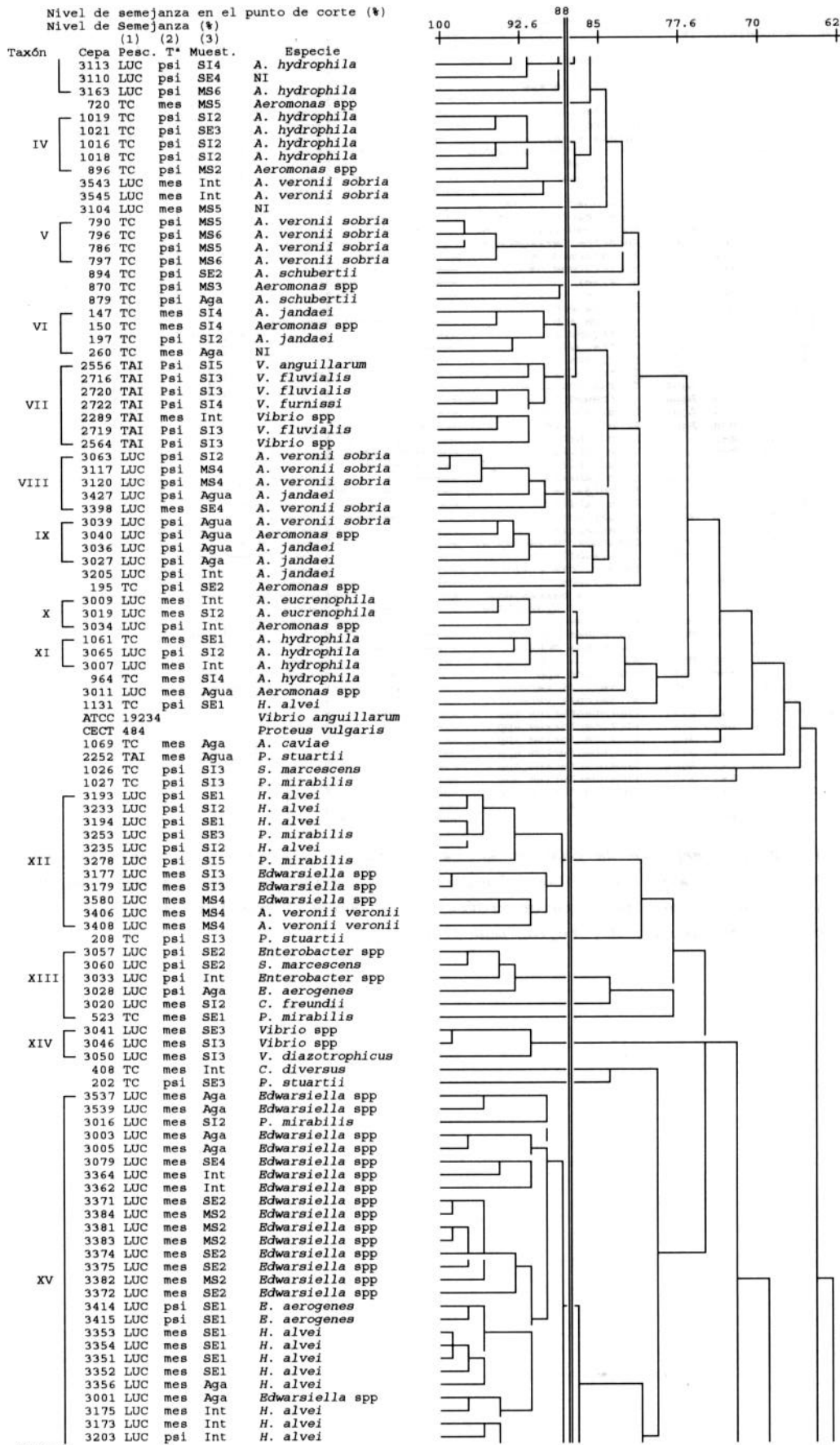
La figura VI.9 corresponde al dendrograma obtenido al aplicar el coeficiente S_{SM} a las 217 cepas de bacterias Gram negativas anaerobias facultativas. Como resultado de realizar un corte al 88% de semejanza se obtuvieron un total de 19 agrupamientos significativos (que contenían 3 cepas) y nueve no significativos (constituidos por dos cepas). De los taxones significativos, únicamente tres contuvieron más de diez cepas. Las restantes 46 cepas no se agruparon al anteriormente mencionado nivel de semejanza. En la figura VI.10 se muestra la representación gráfica simplificada del dendrograma que aparece en la figura VI.9. En la tabla VI.6 se muestran las características fenotípicas que fueron de mayor utilidad a la hora de adscribir cada uno de esos taxones a una especie microbiana definida, género o familia (en su defecto) y de diferenciar unos taxones de otros.

En este caso, el coeficiente cofenético $r=0.83989$ también se encontró dentro de los valores considerados como aceptables para los estudios que emplean el agrupamiento UPGMA. Como consecuencia, al realizar el dendrograma no se produce una distorsión significativa de la matriz de similitudes.

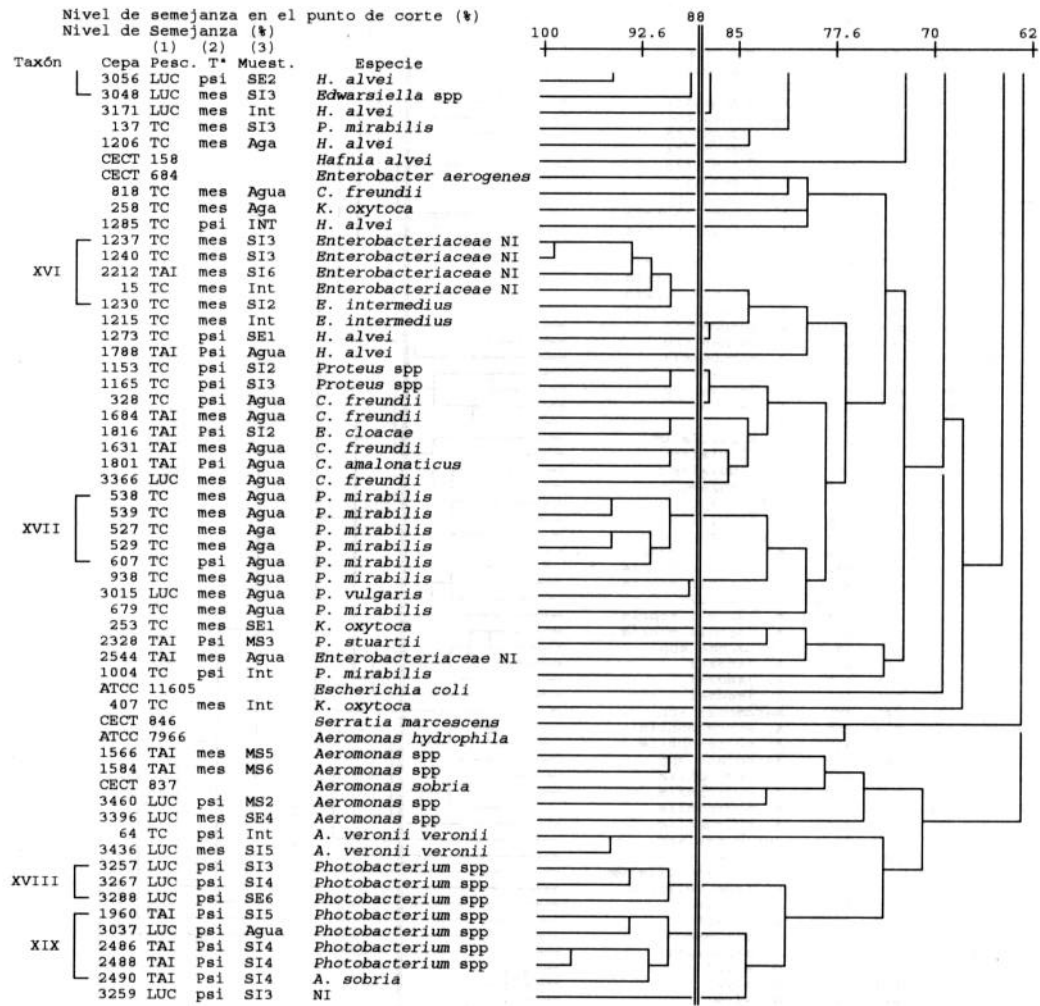
Ninguna de las cepas presentó morfología cocoide, ni pigmentos de color naranja así como tampoco pigmentación difusible.

Figura VI.9. Dendrograma resultante de aplicar el coeficiente de similitud S_{SM} , (agrupamiento UPGMA) a un total de 217 cepas de bacterias Gram negativas anaerobias facultativas. Punto de corte: 88%.





(cont.)



(1) Pesc., especie de pescado en la que fueron aisladas (TC, trucha común; TAI, trucha arco iris; LUC, lucio). (2) T*, grupo del que fueron aisladas (mes, mesófilos; psi, psicrotrofos). (3) Muest., muestra (SE, piel; SI, cavidad abdominal; MS, tejido muscular).

Figura VI.10. Dendrograma simplificado correspondiente al análisis "cluster" llevado a cabo sobre microorganismos Gram negativos anaerobios facultativos aislados de pescado de agua dulce.

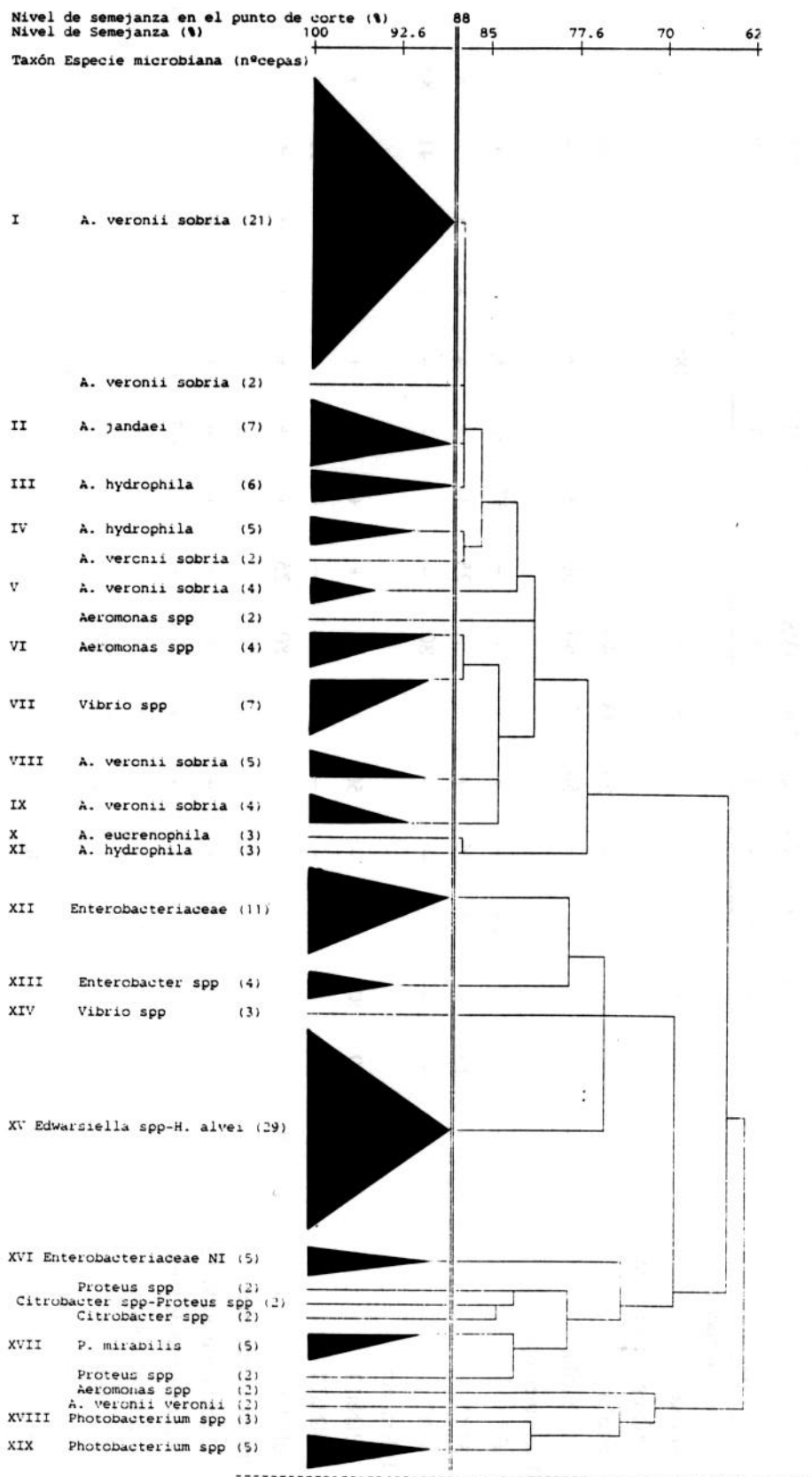


Tabla VI.6. Propiedades fenotípicas de mayor utilidad en la diferenciación de los taxones de bacterias Gram negativas anaerobio-facultativas (figura VI.9).

	TAXÓN																		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX
Especie †	AVS	AJ	AH	AH	AVS	Aer.	Vibr.	AVS	Aer.	AE	AH	EB	Ent.	Vibr.	E-H	EB	PM	Phot.	Phot.
Número de cepas	40	7	6	5	4	4	7	5	4	3	3	11	4	3	29	5	5	3	5
Pruebas realizadas:																			
Oxidasa	+(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18*	-(2)	+	-	-	-	+	+
Morfología microscópica:																			
bacilar	+	-	+	+	-	50	43	40	50	-	-	-	+	-	66	+	60	+	60
cocobacilar	-	+	-	-	+	50	57	60	50	+	+	+	-	+	34	-	40	-	40
Crecimiento a:																			
4°C	+	+	+	40	+	+	+	+	+	67	67	+	+	-	+	+	+	+	80
37°C	-	29	-	20	25	+	+	+	25	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
42°C	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-	+	41	80	+	-	-
Tolerancia a:																			
3%NaCl	64	29	83	-	-	50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33	60
6%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	59	+	-	-	-
pH 4.5	20	-	-	-	-	-	-	80	25	+	+	+	+	+	+	+	80	-	20
Pruebas misceláneas:																			
Crecimiento en McConkey	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Agar Citrato de Simmon	63	57	17	-	-	+	+	+	+	+	67	-	+	-	-	80	60	-	-
Gas de glucosa	+	+	+	80	+	-	29	+	-	+	+	-	-	-	+	80	20	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	25	71	20	-	-	33	+	-	-	-	+	+	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	25	-	60	+	-	+	64	+	-	41	20	+	-	40
Producción de indol	68	43	83	-	50	75	+	+	-	+	+	-	-	+	68	-	+	-	20
Hidrólisis de la urea	21	50	67	-	-	-	-	40	+	33	33	27	+	-	-	-	+	66	-

Tabla VI.6 (cont.).

Especie †	TAXÓN																		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX
	AVS	AJ	AH	AH	AVS	Aer.	Vibr.	AVS	Aer.	AE	AH	EB	Ent.	Vibr.	E-H	EB	PM	Phot.	Phot.
Reducción del OTMA	50	29	50	-	-	-	-	60	-	+	67	-	-	-	+	+	-	-	-
Oxidación del gluconato	73	57	50	20	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Pigmento en Agar Tirosina	-	-	-	-	-	-	-	20	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Actividad -galactosidasa	-	-	-	40	-	50	+	-	-	-	67	-	-	+	22	+	20	-	-
Prod. de ácido a partir de:																			
adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	33	+	+	80	66	-
celobiosa	+	71	+	-	75	-	-	-	-	-	-	-	-	33	50	-	80	-	-
D-fructosa	+	+	+	80	+	+	+	+	+	+	+	+	-	33	+	+	+	+	-
galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	67	+	64	+	+	+	+	+	-	-
glicerol	+	+	+	40	+	-	67	+	-	-	-	82	-	33	+	+	20	-	-
lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
maltosa	+	+	+	40	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
manitol	+	+	+	+	+	75	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	20
manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20
melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
rafinosa	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	80	-	-
ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	80	-	-
sacarosa	+	-	17	+	+	-	-	80	25	-	+	-	-	-	-	60	+	+	-
salicina	-	-	40	-	25	25	-	-	-	+	+	55	+	-	-	+	+	-	-
sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	-	-	-	+	+	-	-
D-sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
trealosa	+	+	83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	33	-

Tabla VI.6 (cont.).

Especie †	TAXÓN																		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX
	AVS	AJ	AH	AH	AVS	Aer.	Vibr.	AVS	Aer.	AE	AH	EB	Ent.	Vibr.	E-H	EB	PM	Phot.	Phot.
Hidrólisis de:																			
Tween 20	+	+	+	+	+	+	71	+	+	+	+	-	-	-	-	80	-	66	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	33	-
tributirina	+	+	+	80	+	+	+	+	+	+	+	-	-	33	-	-	60	33	-
lecitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	82	-	-	-	+	-	-	-
reacción yema de huevo	+	+	67	+	+	+	+	80	+	+	+	82	-	-	-	+	-	-	-
gelatina	+	+	+	+	-	+	57	+	+	+	+	-	50	-	-	-	-	-	-
caseína	+	+	+	+	-	+	+	+	25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	25	-	-	-	-	-	-
elastina	+	+	+	+	-	25	+	60	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
arginina	+	+	83	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	67	-	-	-	-	-
esculina	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
hipurato	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis:																			
	+	+	67	80	+	25	+	+	+	+	+	27	50	-	52	60	60	33	-
	23	-	67	20	-	-	-	+	-	33	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilación de :																			
lisina	60	+	+	+	50	-	-	80	-	33	67	64	75	+	+	80	-	-	-
ornitina	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	50	+	+	80	+	-	-
Sensibilidad al O-129	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	33	60

(1), del 85% de las cepas son positivas para esa prueba; (2), del 15% de las cepas son positivas para esa prueba; †, adscripción a familia, género o especie microbiana tal y como sigue: AVS, *A. veronii sobria*; AJ, *A. jandaei*; AH, *A. hydrophila*; Aer., *Aeromonas* spp; Vibr., *Vibrio* spp; AE, *A. eucrenophila*; EB, *Enterobacteriaceae*; Ent., *Enterobacter*; E-H, *Edwardsiella-Hafnia*; PM, *P. mirabilis*; Phot., *Photobacterium*. *, porcentaje de pruebas positivas para esa prueba. Todas las cepas contenidas en estos taxones dieron lugar a colonias de consistencia cremosa y produjeron ácido a partir de la ribosa. Ninguna de las cepas contenidas en los taxones significativos produjeron pigmentos amarillos o de cualquier otra coloración, ni pigmentos fluorescentes en King A o King B. No produjeron ácido a partir del inositol y xilitol. No emplearon como única fuente de carbono al inositol y al etanol. Igualmente, tampoco dieron lugar a levano a partir de la sacarosa.

El taxón I, que contenía cuarenta cepas, estaba compuesto mayoritariamente por representantes de la especie *A. veronii sobria* (treinta y cinco aislamientos), por lo que su adscripción a especie no resultó dificultosa empleando el esquema de Abbott y col (1992). El resto de cepas se adscribieron a *A. jandaei* (dos), *A. hydrophila* (una) y *Aeromonas* spp (dos). Entre las características más discriminantes (con respecto al resto de los taxones) que presentó el centroide (o HMO) de este taxón se destacaron su incapacidad para hidrolizar la esculina, la producción de ácido a partir de la celobiosa y de la sacarosa y la asimilación de estos mismos azúcares. Poseía, asimismo, un perfil netamente proteolítico y lipolítico.

De las siete cepas contenidas en el taxón II, únicamente una no fue adscrita a la especie *A. jandaei* (lo fue a *A. veronii sobria*). Como en el caso anterior, la adscripción a especie de este taxón no presentó ningún tipo de problemas, asemejándose mucho al perfil fenotípico del taxón I, excepto en lo referente a la producción de ácido y asimilación de la sacarosa, característica diferencial entre *A. veronii sobria* y *A. jandaei*. Las cepas de este taxón mostraron también características proteolíticas y lipolíticas. No crecieron a 42°C (a diferencia de lo observado en el esquema de Esteve y col, 1995c).

Los taxones III y IV (que incluían seis y cinco cepas respectivamente) se asignaron al “complejo *A. hydrophila*”. Teniendo en cuenta las características de los grupos de hibridación que aparecen reflejadas en los trabajos de Abbot y col (1992) y Hänninen (1994), la mayor parte de estas cepas, por el hecho de ser incapaces de fermentar la salicina y el sorbitol, podrían adscribirse al grupo de hibridación 2 de *Aeromonas*, dentro del “complejo *A. hydrophila*”. Ambos agrupamientos se diferenciaron entre sí, únicamente, en virtud de la asimilación y la producción de ácido a partir de la sacarosa y la celobiosa, y del crecimiento en presencia de 3 % de sal. El número de azúcares a partir de los cuales se originó ácido fue sensiblemente menor en las cepas del taxón IV, ninguna de las cuales dió lugar a indol a partir del triptófano.

Las cuatro cepas incluidas en el taxón V se identificaron como *A. veronii sobria*. Globalmente, mostraron pocas diferencias con respecto a las cepas contenidas en el taxón I. Entre estas diferencias destacamos las siguientes: su incapacidad para asimilar la celobiosa, su asimilación de la arginina; su actividad proteolítica nula y su capacidad para hidrolizar el hipurato.

El taxón VI, a pesar de contener dos cepas identificadas como *A. jandaei*, no fue asignado a ninguna de las especies de *Aeromonas* en particular, si bien su adscripción a género resultó ser clara. Las cepas comprendidas en este agrupamiento mostraron las menores versatilidades nutricionales y actividades acidificantes de entre todos los taxones de *Aeromonas*, así como una actividad elastinolítica baja y nula capacidad para producir gas a partir de la glucosa. Teniendo en cuenta las características consideradas en los esquemas de identificación disponibles, el HMO de este taxón se aproximaba a la descripción clásica de la especie *A. sobria* y cercano a *A. jandaei*. Por otro lado, el hecho de no ser capaces de producir gas a partir de la glucosa podría habernos llevado erróneamente a pensar que se trataría de *A. caviae* o *A. media*, de acuerdo con el esquema de Esteve y col (1995c).

Las siete cepas contenidas en el taxón VII se adscribieron al género *Vibrio*, asignándose tres cepas a *V. fluvialis*, una a *V. furnissi*, otra a *V. anguillarum* (*L. anguillarum*).

Las dos restantes no se pudieron identificar a nivel de especie. Si tenemos en cuenta los resultados de la tabla VI.6, podemos apreciar que estas cepas conformaron un taxón bastante homogéneo. Su perfil de asimilación de compuestos carbonados y producción de ácido a partir de distintos azúcares fue bastante parecido al de los taxones asignados al género *Aeromonas*. Del mismo modo, sus actividades lipo y proteolíticas fueron equivalentes a las de las cepas contenidas en los taxones de *Aeromonas*. Sin embargo, las cepas en él contenidas resultaron sensibles al agente O-129, característica tenida en cuenta para la diferenciación entre los representantes del género *Vibrio* y los del género *Aeromonas*. Asimismo, manifestaron actividad α -galactosidasa. Considerando todas estas características, a este taxón lo asignamos finalmente al género *Vibrio*, sin definir especie.

Cuatro de las cinco cepas del taxón VIII fueron identificadas como *A. veronii sobria*. La restante lo fue como *A. jandaei*. Este agrupamiento presentó características intermedias entre los taxones I y V, también identificados como *A. veronii sobria*. Así, las cepas contenidas en este taxón no fueron capaces de asimilar la celobiosa (a diferencia del taxón I), pero manifestaron actividad proteolítica (a diferencia del taxón V). A diferencia de ambos, poseyeron actividad α -hemolítica y crecieron a 42°C (característica de esta especie que aparece en el esquema de Esteve y col, 1995c). El perfil fenotípico de su HMO fue bastante similar al del taxón 14 de Sternström y Mölin (1990), que ellos identificaron como *A. sobria*.

El taxón IX, identificado como *Aeromonas* spp al contener cepas de *A. veronii sobria* y *A. jandaei*, poseía características muy parecidas a las del VI, si bien era ligeramente más versátil que aquél, desde el punto de vista nutricional, y con actividad elastinolítica marcada y caseinolítica débil. Teniendo en cuenta su similitud con el taxón VI, podríamos concluir del mismo modo que en aquel caso, afirmando que este taxón mostró características del “complejo *A. sobria*”, con algunas características propias de otras especies (ausencia de producción de gas a partir de la glucosa).

Los taxones X y XI, que contenían cepas de *Aeromonas* capaces de hidrolizar la esculina, fueron identificados, respectivamente, como *A. eucrenophila* (negativos para la prueba del Voges-Proskauer) y *A. hydrophila* (positivas para esta misma prueba). Como características más significativas de ambos taxones podemos destacar que eran levemente más vigorosos que el resto de agrupamientos de *Aeromonas* desde el punto de vista nutricional. Las cepas del taxón X fueron capaces de reducir el OTMA a TMA y de producir un pigmento rosado en el Agar Tirosina. Las del taxón XI, por su parte, manifestaron actividad α -hemolítica. Las cepas de *A. hydrophila* (taxón XI), a diferencia de las contenidas en los taxones III y IV, fueron capaces de fermentar la salicina y de asimilar la arginina como fuente de carbono, por lo que correspondían al grupo de hibridación 1 del “complejo *A. hydrophila*”.

El primero de los taxones que agrupaba a un número significativo de cepas adscritas a la familia *Enterobacteriaceae* (taxón XII) fue muy heterogéneo. Contenía un total de once cepas de las cuales nueve eran enterobacterias (cuatro *H. alvei*, tres *Edwardsiella* spp y dos *P. mirabilis*). Las dos restantes fueron identificadas tentativamente como *A. veronii sobria*. Se mostraron tan versátiles, nutricionalmente, como las cepas contenidas en los taxones de *Aeromonas*. Sin embargo fueron menos activas que aquéllas a la hora de dar lugar a ácido a partir de los azúcares ensayados. Entre sus actividades extracelulares solamente destacaron su

acción sobre la yema de huevo y sobre la ornitina. Por lo demás, no mostraron ninguna otra actividad lipolítica ni proteolítica. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de este taxón no fuimos capaces de asignarlo a ninguno de los grupos microbianos considerados, pero lo encontramos intermedio entre las tribus Klebsielleae, Proteeae y Edwarsielleae. Las cepas de *P. mirabilis* contribuían a que la prueba de la descarboxilación de la ornitina no fuera enteramente positiva y las cepas de *Edwarsiella* a que el signo de la prueba del Voges-Proskauer no fuese positivo, de tal modo que este taxón no pudo ser asignado a una de estas tres tribus mencionadas.

El taxón XIII, que contenía únicamente cuatro cepas fue más sencillo de tratar, ya que tres de ellas se identificaron como *Enterobacter* y una como *Serratia*. Entre sus características destacaban que las cepas contenidas en él eran capaces de hidrolizar la urea, de crecer en el agar citrato de Simmon y de hidrolizar la esculina, pero incapaces de producir indol y de fermentar la lactosa, propiedades características de las cepas de *Enterobacter*. Este agrupamiento, presentó, asimismo, un perfil de fermentación de azúcares y de asimilación de compuestos de carbono bastante similar al del taxón XII. Sus actividades extracelulares se circunscribieron a la hidrólisis de la gelatina por parte de algunas cepas. Así, teniendo en cuenta las características fenotípicas diagnósticas más importantes (conforme a Ewing -1986-) y atendiendo a la identificación preliminar, mediante claves diagnósticas, este taxón se identificó como *Enterobacter* spp.

El taxón XIV incluía tres cepas que se identificaron presuntivamente como *Vibrio*, si bien únicamente una de ellas se pudo asignar a alguna de las especies actualmente descritas dentro de este género, concretamente a *V. diazotrophicus*, empleando la clave de identificación de Alsina y Blanch (1994). Las cepas fueron oxidasa positivas, sensibles al compuesto vibriostático O-129 y mostraron una actividad fisiológica reducida, a pesar de que eran capaces de hidrolizar el hipurato (propiedad que presentaron muy pocas cepas en este estudio taxonómico), de descarboxilar la ornitina y de utilizar el adonitol como única fuente de carbono. No presentaron actividad proteolítica ni lipolítica. No fueron capaces de utilizar el manitol como fuente de carbono, por lo cual se desmarcaron de la descripción general de este género (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992). A pesar de ello, por su baja actividad metabólica (un número reducido de cepas fueron capaces de fermentar azúcares o asimilar compuestos de carbono) y por su reducida actividad hidrolítica de compuestos de naturaleza lipídica y proteica, podrían corresponder a la especie *V. diazotrophicus*.

De las veintinueve cepas contenidas en el taxón XV, 17 se adscribieron al género *Edwarsiella*, nueve a *H. alvei*, dos a *E. aerogenes* y una a *P. mirabilis*. Todas las cepas fueron móviles, incapaces de hidrolizar la arginina, la urea, la gelatina o alguno de los compuestos de naturaleza lipídica estudiados, pero sí descarboxiladoras de la ornitina y de la lisina, todas ellas características comunes a *Edwarsiella* spp y *H. alvei* (Ewing, 1986). Sin embargo, resultaron ser variables en la prueba del Voges-Proskauer, "test" para el cual las cepas del género *Edwarsiella* son universalmente negativas (Ewing, 1986). Por lo demás, se mostraron con una mayor capacidad para utilizar compuestos carbonados y para producir ácido a partir de once de los azúcares ensayados. Teniendo en cuenta las especies contenidas mayoritariamente en este grupo taxonómico y las características intermedias entre las dos especies mayoritarias en este taxón, concluimos en identificarlo como intermedio entre *Edwarsiella* spp y *H. alvei*.

El taxón XVI resultó ser el más problemático desde el punto de vista de su adscripción a género, dado que cuatro de las cinco cepas (que indudablemente pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*) contenidas en este agrupamiento no pudieron ser adscritas a ninguno de los géneros de enterobacterias conocidas. Fueron positivas para la prueba del rojo de metilo, la hidrólisis de la esculina y la fermentación de la lactosa, así como mayoritariamente crecieron en agar citrato de Simmon y descarboxilaron la ornitina y la lisina, pero no dieron positivo en la prueba del Voges-Proskauer. Manifestaron actividad frente a sustratos lipídicos (Tween 20 y 80), a diferencia de los restantes taxones de *Enterobacteriaceae* y fueron activos frente a la yema de huevo, al igual que las cepas contenidas en el taxón XII. También utilizaron un gran número de azúcares para dar lugar a ácido (dieciocho) y crecieron a partir de múltiples compuestos como únicas fuentes de carbono (un total de diecisiete). Empleando la clave de identificación de enterobacterias (Koneman y col, 1989), este taxón se habría de asignar a la especie *E. cloacae*, pero según las características de la tribu Salmonelleae (Ewing, 1986), excepción hecha de la producción de H₂S en el medio TSI para la que fueron negativas, se podrían haber atribuido a este último grupo microbiano. Finalmente, decidimos no adscribirlo a ningún grupo descrito con anterioridad.

El taxón XVII fue uno de los agrupamientos más homogéneos de los correspondientes a las enterobacterias, no sólo en cuanto a las características fenotípicas del HMO, sino en cuanto a su composición específica, ya que las cinco cepas incluidas en él fueron identificadas como *Proteus mirabilis* mediante las claves de Koneman y col (1989). De hecho, el perfil de este agrupamiento correspondía muy bien a la descripción de esta especie, a pesar de ser incapaces de hidrolizar la gelatina y de presentar actividad lipolítica variable. Cuantitativamente, este taxón presentó un patrón de fermentación de azúcares y de asimilación de compuestos de carbono intermedio entre los taxones XV y XVI.

Los taxones XVIII y XIX agruparon a cepas que, siendo oxidasa positivas, no fueron resistentes al O-129. Entre éstas, siete cepas se identificaron tentativamente como *Photobacterium* spp y una como *A. sobria*, si bien las primeras no precisaron de NaCl para su crecimiento y no fueron bacterias luminosas (características tenidas por universales para estas especies -Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992-). Entre las propiedades bioquímicas típicas de *Photobacterium*, que hemos podido apreciar en las cepas identificadas como tales, se encontraban su incapacidad para utilizar el manitol (las especies de *Vibrio* sí lo utilizan), el no crecer por encima de los 40°C y la sensibilidad al compuesto O-129 (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992). Otras características interesantes y comunes a ambos taxones fueron su escasa, e incluso nula (taxón XIX), actividad proteo y lipolítica. En contraste con el resto de agrupamientos considerados en este trabajo, ambos presentaron una baja actividad fisiológica, escasa capacidad para fermentar azúcares y escaso vigor a la hora de asimilar compuestos como única fuente de carbono (sobre todo el taxón XIX). Las cepas contenidas en ellos fueron psicrófilas, al crecer a 4°C pero no a 37°C. De todos modos, no nos atrevemos a asignar, con total certidumbre, estas cepas al género *Photobacterium*, por lo que se requerirán investigaciones posteriores para aclarar su situación taxonómica.

A la vista de estos resultados, podemos observar que todos los taxones identificados como pertenecientes al género *Aeromonas* aparecen en la zona superior del dendrograma (figuras VI.9 y VI.10), claramente separados de los taxones de enterobacterias. Ambos

superagrupamientos confluyen a un 63 % de similitud. Entre este punto y un 77 % de similitud se sitúan un número reducido de cepas no agrupadas y que se adscribieron a géneros o especies pertenecientes a uno u otro grupo.

En la zona del dendrograma correspondiente a la mayoría de las cepas de enterobacterias (zona inferior, figura VI.9) se puede observar, con respecto a la zona de *Aeromonas*, la existencia de un mayor porcentaje de cepas no agrupadas, en relación con las que sí fueron agrupadas, a un nivel de semejanza del 88 % S_{SM} . Si este nivel lo hicieramos descender hasta un 80 %, en la representación gráfica nos resultaría un nuevo taxón, intermedio entre el XVI y el XVII, que agruparía a las cepas identificadas como pertenecientes al género *Citrobacter*. Se puede apreciar, asimismo, que a este último nivel de semejanza no varía mucho la estructura del dendrograma en lo que se refiere a los taxones que contienen enterobacterias, observándose una diáfana separación entre el supertaxón que agrupa a *Edwardsiella* y la mayor parte de las cepas de *Hafnia* (incapaces de crecer a 37°C, de asimilar la L-arabinosa y de producir ácido a partir de la xilosa) y el que agrupa a la mayoría de *Proteus*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (capaces de crecer a 37°C, de asimilar la L-arabinosa y fermentadores de la xilosa).

La última porción del dendrograma (figuras VI.9 y VI.10) se caracterizó por contener cepas oxidasa positivas entre las cuales se encontraron las cepas de colección de *A. sobria* y *A. hydrophila*, varias cepas salvajes de *Aeromonas* y, como acabamos de mencionar, cepas de *Photobacterium*.

DISCUSIÓN

GRAM NEGATIVOS AEROBIOS INMÓVILES

La prueba de la oxidasa fue utilizada en primer lugar para la diferenciación, a nivel de género, entre aquellas cepas inmóviles que no mostraron ningún tipo de pigmentación en medio sólido. Así, la identificación de *Acinetobacter* a nivel de género no supuso un gran problema, ya que es el único género caracterizado por ser oxidasa negativo dentro de la familia *Moraxellaceae*. Para la adscripción al género *Psychrobacter* se tuvo en cuenta, en primer lugar, la capacidad que tenían las cepas para crecer a bajas temperaturas, de manera que aquellas cepas que no crecían a 4°C fueron asignadas al género *Moraxella*. Para distinguir *Psychrobacter* de las cepas de *M. phenylpiruvica*, única especie de este género que es capaz de crecer a bajas temperaturas, consideramos la producción de ácido a partir de la glucosa en condiciones aerobias, de modo que aquellas cepas capaces de hacerlo eran adscritas automáticamente a *Psychrobacter*. Sin embargo, Gennari y col (1989) diferenciaban las cepas de “bacterias semejantes a *Moraxella*” entre sacarolíticas y no sacarolíticas (productoras de ácido y no productoras de ácido a partir de la glucosa respectivamente), pero las adscribieron todas ellas a la especie *P. immobilis*. En este mismo sentido, Shaw y Latty (1988) asignaron a *P. immobilis* cepas que no fueron capaces de producir ácido a partir de la glucosa y consideraron, consecuentemente, que esta propiedad no era de valor para diferenciar *P. immobilis* de otros microorganismos próximos y que también fueran oxidasa positivos. Moss y col (1988), además de considerar las pruebas fenotípicas a las que acabamos de hacer referencia para la distinción entre estos tres géneros microbianos, tienen en cuenta la hidrólisis de la urea, si bien se ha detectado la existencia de cepas de *Psychrobacter* que son capaces de dar lugar a dicha hidrólisis (Shaw y Latty, 1988).

En nuestro estudio, al igual que en el de Gennari y col (1989), hemos detectado la presencia de cepas de *Psychrobacter* con características cercanas a *M. osloensis* o *M. phenylpiruvica*, que sin embargo las hemos identificado como *P. immobilis*. Tal y como se aprecia en la figura VI.1, no todas las cepas aisladas de pescado con características similares a *Moraxella* fueron identificadas como *P. immobilis*, al contrario de lo afirmado por Gennari y col (1989) en referencia a las cepas identificadas como “semejantes a *Moraxella*” y aisladas en pescado de origen marino.

Debido a que durante muchos años no existía una separación clara entre las cepas del género *Moraxella* y las “bacterias semejantes a *Moraxella*”, cuya principal característica era la de crecer a bajas temperaturas, en la bibliografía existente se puede observar que distintos autores agrupan, bajo el nombre genérico *Moraxella*, a todas las cepas aisladas a partir de alimentos diversos con características propias de las moraxelas, lo cual hace complicada la comparación entre los resultados de dichos estudios y los obtenidos por nosotros. Así, Lee y Harrison (1968) y Acuff y col (1984) observaron la disminución de *Moraxella* (en conjunción con *Acinetobacter*), en porcentaje con respecto a la flora total, a medida que avanzaba el almacenamiento a refrigeración del pescado que estudiaron. Horsley (1973), por su parte, detectó la presencia de *Moraxella* en piel y agallas de salmónidos, donde representaban un porcentaje elevado de la población. De todos modos, pensamos que no sería erróneo el afirmar que dichas cepas, o la mayor parte de dichas cepas, identificadas como *Moraxella* en realidad pertenecían bien a *P. immobilis* o bien a *M. phenylpiruvica*, especies de interés desde el punto de vista alimentario y de escasa importancia desde el punto de vista clínico.

M. phenylpiruvica y microorganismos parecidos a esta especie han sido detectados en carne de aves, pescado y material clínico siendo, su característica principal, como en *P. immobilis*, su capacidad para crecer a bajas temperaturas. Prieto y col (1992b) han aislado *M. phenylpiruvica* a partir de como canales de cordero. Otros autores han detectado la presencia de representantes del género *Moraxella* a partir de diversos alimentos (Prieto y col, 1992b) y en piscifactorías (Allen y col, 1983b), pero no pudieron conseguir su identificación a nivel de especie. Por otro lado, alguna de las cepas no sacarolíticas de “*Moraxella-like*” estudiadas por Gennari y col (1989) bien podrían haber sido adscritas a *M. phenylpiruvica* en virtud de sus características fenotípicas, pero no lo fueron en base a los ensayos de transformación que realizaron y que determinaron su identificación como *P. immobilis*.

Las cepas de *M. phenylpiruvica* estudiadas en el presente trabajo se asemejan mucho, en aspectos tales como la incapacidad de producir ácido a partir de distintos azúcares, en la hidrólisis de la urea, en la reducción de nitratos y en la actividad sobre la gelatina, a la descripción dada por Henriksen (1973), la cual ha sufrido pocas variaciones desde entonces. La actividad sobre la urea es una de las principales características que hemos tenido en cuenta para diferenciar *M. phenylpiruvica* de *M. osloensis*.

Desde que se definió *P. immobilis* como especie han sido numerosos los hábitats en los que ha sido detectado. Así, tenemos noticias de su aislamiento en canales de cordero (Prieto y col, 1992b), en leche de oveja (García-Armesto y col, 1993), en pescado fresco y alterado (Gennari y col, 1989; Sternström y Mölin, 1990) y en alimentos proteicos en general (Shaw y Latty, 1988).

Las cepas identificadas como *P. immobilis* (contenidas en los taxones II y III principalmente -figura VI.4-) se asemejan, desde el punto de vista fenotípico, a la descripción de especie dada por Juni y Heym (1986) y a la de las cepas de Gennari y col (1989). Además, el patrón de producción de ácido a partir de los azúcares ensayados fue bastante similar al de las cepas contenidas en los taxones de *P. immobilis* de Sternström y Mölin (1990). Sin embargo, algunas de ellas difieren de dichas descripciones en características puntuales como la no producción de ácido a partir de ramnosa y de xilosa y la no actividad sobre Tween 80 (positivas en el esquema de Juni y Heym -1986- y en el de Gennari y col -1989-), la actividad gelatinasa de las cepas contenidas en el taxón III y la variabilidad en la reducción de nitratos. A diferencia de las de Gennari y col (1989) y de Shaw y Latty (1988) no todas nuestras cepas de *P. immobilis* manifestaron crecimiento en presencia de un 6 % de sal. Otros autores (Nishimura y col, 1989) han observado, de hecho, que algunas cepas de *P. immobilis* no toleran esas mismas concentraciones salinas. Al contrario que las cepas de *P. immobilis* estudiadas por Shaw y Latty (1988), algunas de nuestras cepas fueron capaces de crecer sobre hidratos de carbono y polialcoholes y no manifestaron actividades lipolíticas. Podríamos encontrarnos, por tanto, frente a alguna variedad dentro del género *Psychrobacter*, diferente de *P. immobilis*. Tal y como afirmaron Juni y Heym (1986) esta especie ha evolucionado considerablemente al estar presente en una gran variedad de ambientes, lo cual podría haber resultado en cambios en su estructura del ADN, en contraposición a las moraxelas, que residen en un ambiente muy constante (animales de sangre caliente) y, presumiblemente, evolucionan menos. Por otra parte, Gennari y col (1989) postularon que el género *Psychrobacter* podría estar compuesto por una sola especie, pero que estudios fenotípicos y genéticos podrían llevarnos a una subdivisión diferente de este género. Por ello pensamos que estas cepas de *Psychrobacter*, adaptadas al ambiente del tipo de pescado refrigerado objeto de nuestro estudio, podrían constituir una nueva biovariedad o especie dentro de este género

microbiano, teoría que habría de ser contrastada mediante la realización de análisis de ácidos nucleicos.

Diversos autores, como Shaw y Latty (1988), Prieto y col (1992b) y García-Armesto y col (1993) han descrito la presencia de una variedad inmóvil de *Pseudomonas fragi* en diversos alimentos proteicos. Estas cepas diferían de *P. immobilis* en que utilizaban un mayor número de compuestos como única fuente de carbono. En el análisis taxonómico de los primeros (Shaw y Latty, 1988) obtuvieron un agrupamiento que contenía cepas tipo de *Pseudomonas* y en el que la mayoría de las cepas salvajes eran semejantes a las del taxón I de Shaw y Latty (1982). Afirmaron que podían haber sido relevantes en la alteración de los alimentos proteicos a partir de los cuales se habían aislado y que podrían haber sido identificados como “*Moraxella*-like” al ser oxidasa positivas e inmóviles. En este sentido, Prieto y col (1992b), al adscribir algunas de sus cepas a *P. fragi*, consideraron que el utilizar esquemas taxonómicos clásicos podría llevar a realizar identificaciones erróneas. En ese mismo trabajo (Prieto y col, 1992b) se observó que, en contra de lo acontecido con el resto de cepas inmóviles estudiadas, las cepas identificadas como *P. fragi* veían que sus niveles, con respecto a la flora total, aumentaban a medida que avanzaba el almacenamiento a refrigeración de las canales de cordero. Algunas de las cepas contenidas en los taxones II y III (las consideradas como *P. immobilis* atípicas -figura VI.4- y cuyos niveles aumentaban a medida que avanzaba el almacenamiento) se aproximaron, por su versatilidad nutricional, a la descripción de este taxón de Shaw y Latty (1988), pero no a la del taxón de *P. fragi* obtenido por Prieto y col (1992b). Además, en un estudio preliminar en el que se incluyeron las cepas tipo de distintas especies de *Pseudomonas* se pudo apreciar que ninguna de dichas cepas de colección se agrupaba con las cepas contenidas en los taxones II o III (figura VI.4). Si nos basamos en el esquema que Shaw y Latty (1988) propusieron para diferenciar los taxones de *P. fragi* de los de *P. immobilis*, los taxones II y III (tabla VI.2) presentarían características intermedias entre ambas especies. Por todo ello, opinamos que nuestras cepas, más que corresponder a variantes inmóviles de *P. fragi*, pueden ser variantes de *Psychrobacter* no pertenecientes a la especie *P. immobilis*.

P. immobilis no parece desempeñar un papel importante en la alteración del pescado, al no hidrolizar compuestos proteicos ni producir H₂S, pero sí podría intervenir en el desarrollo de la alteración de la grasa del pescado por su acción lipolítica sobre diversos compuestos (Gennari y col, 1989), lo cual no parece muy probable en los peces sometidos a estudio, que no entran dentro de la categoría de pescados grasos. Sin embargo, algunas de nuestras cepas sí dieron lugar a actividad proteolítica, e incluso sus niveles se incrementaron a medida que evolucionaba el almacenamiento, pero no parece probable que puedan contribuir al desarrollo de malos olores al no actuar sobre compuestos de bajo peso molecular (OTMA) ni producir H₂S. Gillespie y McRae (1975) y Gram y col (1987) estudiando “bacterias semejantes a *Moraxella*” encontraron que eran incapaces de producir malos olores y sulfuros volátiles en muestras o en jugos de pescado. Sin embargo, Van Spreekens (1977), estudiando cepas de esa misma naturaleza, apreció que algunas de ellas eran capaces de reducir el OTMA y de producir malos olores, si bien se trataba de olores débiles. Otra de las razones por las cuales no se han considerado como microorganismos alterantes era que, en algunos casos, si bien durante los primeros estadios del almacenamiento a refrigeración de ciertos alimentos tenían cierta tendencia al incremento de sus niveles (Gennari y col, 1989), a continuación se daba un rápido descenso de los mismos con respecto a la flora total (Gennari y col, 1989; Prieto y col, 1992b). En nuestro caso hemos podido apreciar que no sólo no se producía este

descenso, sino que las proporciones relativas de estos microorganismos aumentaban a medida que avanzaba el almacenamiento (figura VI.3).

Se han encontrado representantes del género *Acinetobacter* en leche (García -Armesto y col, 1993; Ternström y col, 1993), en muestras de agua de una piscifactoría y en distintas muestras tomadas en salmónidos y otros peces de agua dulce (Abo, 1980; Acuff y col, 1984; Allen y col, 1983b; Austin y Al Zahrani, 1988; Horsley, 1973; Trust y Sparrow, 1974), ambientes marinos y en pescado de este mismo origen (Austin, 1982; Gennari y col, 1989) y en otros alimentos proteicos (Shaw y Latty, 1988). El aislamiento de miembros de este género en alimentos refrigerados no es extraño, ya que crecen bien a 7°C (Jay, 1987). A pesar de que su actividad alterante no parece ser muy importante (Gennari y col, 1989), algunos autores han constatado la formación de bases y ácidos volátiles en pescado como resultado de su actividad metabólica. En nuestro estudio hemos podido comprobar que la presencia de representantes de *Acinetobacter* se reducía conforme progresaba el almacenamiento (figura VI.3). Éste es uno de los motivos por los cuales no se ha considerado a *Acinetobacter* como alterante del pescado, ya que se ha observado con relativa frecuencia que sus porcentajes disminuyen de manera muy acusada, con respecto a la flora total, a medida que avanza el almacenamiento a refrigeración del pescado (Acuff y col, 1984; Lee y Harrison, 1968), si bien en los estudios de Wempe y Davidson (1992) se pudo apreciar que dichos niveles no se veían prácticamente reducidos con respecto a los obtenidos tras el fileteado del pescado. Otro fenómeno que se ha observado en varias ocasiones es que los niveles de *Acinetobacter* son más altos en pescado comercial que en pescado fresco recién capturado (Shewan, 1971), lo cual podría estar relacionado con un manejo higiénicamente deficiente. En este sentido, en la figura VI.2 se puede observar que la mayor parte de las cepas de *Acinetobacter* fueron aisladas a partir de las muestras de trucha arco iris, ejemplares en los que, asimismo (capítulo VII), se aislaron la mayor parte de las cepas de *Staphylococcus*. Estos microorganismos, cuyo hábitat principal son la piel y las mucosas del hombre y de otros animales de sangre caliente, son indicativos de prácticas higiénicas no aconsejables, de manejo poco cuidadoso.

Anteriormente hemos puesto de manifiesto que la identificación de *Acinetobacter* a nivel de género no supone un gran problema, ya que es el único representante oxidasa negativo dentro de la familia *Moraxellaceae*, si bien algunas de nuestras cepas, identificadas como *Acinetobacter*, son negativas para la producción del indol, característica común a los géneros incluidos en dicha familia (Rossau y col, 1991). Sin embargo, la diferenciación a nivel de especie (y de grupo de hibridación) es significativamente más complicada (Shaw y Latty, 1988). En este sentido, Van Landschoot y col (1986) observaron que los organismos incluidos en este género no eran fáciles de identificar porque las cepas, dentro de cada grupo que estudiaron, no mostraban características que permitiesen una identificación inequívoca.

Entre las características variables para algunas de nuestras cepas de *Acinetobacter* y que son negativas en los trabajos de algunos autores se encontraron: la reducción de los nitratos, la producción de indol, la prueba del Voges Proskauer, la producción de H₂S, la actividad desoxirribonucleasa y la utilización de arabinosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa y ramnosa (Bouvet y Grimont, 1986; Henriksen, 1973; Pagel y Seyfried, 1976), lo cual podría suponer que nos encontrásemos frente a microorganismos adaptados a un medio determinado y capaces, por tanto, de desarrollar ciertas actividades que no presentan organismos de este mismo género pero aislados en otros medios y hábitats diferentes. Soddell y col (1993) pusieron de manifiesto la falta de correspondencia entre los patrones fenotípicos de las cepas de *Acinetobacter* de origen no clínico y los esquemas tradicionalmente utilizados para la identificación de miembros de este género (basados en las características de cepas de

origen clínico). Estos autores (Soddell y col, 1993) observaron que ninguno de los sistemas que emplearon servían para identificar cepas aisladas a partir de aguas residuales. A pesar de ello, en nuestro trabajo hemos procedido a la identificación a nivel de especie de los representantes de este género microbiano, si bien teniendo en cuenta que dicha identificación se ha basado en un número reducido de pruebas fenotípicas que discutiremos a continuación. En otros trabajos (García-Armesto y col, 1993) también se puede apreciar que las cepas ambientales identificadas a nivel de especie no se ajustan del todo a las descripciones dadas en el esquema de Bouvet y Grimont (1986).

Kämpfer y col (1993) encontraron que *Acinetobacter johnsonii*, al igual que en nuestro caso, podía presentar respuestas diferentes frente al citrato como única fuente de carbono. Entre las características (del esquema de Bouvet y Grimont -1986-) que se tuvieron en cuenta para la adscripción a *A. johnsonii* se encuentran: su incapacidad de crecer a 37°C, frente al resto de grupos de hibridación de *Acinetobacter* que sí son capaces de hacerlo a esa temperatura, la incapacidad para dar lugar a ácido a partir de la glucosa, la ausencia de actividades gelatinasa y no ser hemolíticas. Las cepas identificadas como *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii* fueron capaces de crecer a 37°C. A diferencia de las primeras, las de *A. lwoffii* no utilizaron citrato como única fuente de carbono y no pudieron producir ácido a partir de la glucosa. Alguna de las cepas del taxón V (figura VI.4 y tabla VI.2) presentaba características comunes con la cepa 85 de Bouvet y Grimont (1986), que éstos no asignaron a ninguno de los grupos de hibridación que establecieron.

A. johnsonii ha sido la especie de *Acinetobacter* aislada con más frecuencia y en mayor número de muestras en nuestro trabajo. Esta especie ha sido aislada, también, a partir de muestras clínicas y en carne de aves, y puede ser agente de la aparición de viscosidad en la leche (Bouvet y Grimont, 1986). También se ha detectado en leche de oveja cruda (García-Armesto y col, 1993). Sin embargo, no fue detectada en las muestras tomadas de tejido muscular, a diferencia de *A. lwoffii* que sí lo fue. La mayor parte de las cepas de *Acinetobacter* que aislaron Gennari y col (1989) a partir de sardinas se adscribieron a la especie *A. lwoffii*. También se han aislado cepas en leche alterada que presentaron perfiles intermedios entre *A. johnsonii* y *A. lwoffii*, y que aunque lipolíticas eran poco vigorosas (Ternström y col, 1993).

Representantes del género *Flavobacterium* han sido aislados a partir de alimentos como la leche (Cox y McRae, 1989; García-Armesto y col, 1993) y a partir de pescado y ambientes acuáticos (Acuff y col, 1984; Adams y col, 1964; Allen y col, 1983b; Gennari y Tomaselli, 1988; Laycock y Regier, 1970). A pesar de que entre las cepas que seleccionamos para su posterior identificación no detectamos la presencia de *Flavobacterium* en las muestras de agua, intestino y agallas, sí las detectamos en muestras de piel al comienzo del almacenamiento a refrigeración y en muestras de tejido muscular cuando el pescado se encontraba ya alterado. En el estudio de Horsley (1973), *Flavobacterium* era uno de los grupos microbianos mayoritarios en piel y agallas de salmónidos. Sin embargo, y a diferencia de nuestro trabajo, Trust y Sparrow (1974) lo aislaron en muestras de intestino de salmónidos. En ninguno de estos casos se realizó la identificación a nivel de especie de las cepas aisladas. Esto tendría explicación si tenemos presente que, debido a las condiciones ambientales constantemente cambiantes, las cepas de origen no clínico no forman especies definidas y su adscripción a especie es más difícil (Holmes y col, 1984).

De las cepas de este género que asignamos tentativamente a especie destacan *F. balustinum*, *F. aquatile* y *F. breve*, especies que se han aislado en muestras no clínicas en

otras ocasiones (Holmes y col, 1984). Cox y McRae (1989) detectaron la presencia, en leche de cabra, de cepas inmóviles que daban lugar a pigmentaciones naranjas y que eran cercanas a *F. balustinum*.

En cuanto a la importancia de *Flavobacterium* como microorganismos alterantes, hay que destacar que, si bien en ocasiones se detectaron formas suaves de alteración debida a representantes de este grupo microbiano (Castell y Anderson, 1948), desde hace años se ha podido apreciar que en la mayor parte de las ocasiones no parecía que interviniesen en dicha alteración en condiciones comerciales, en contraste con otras bacterias que competían mejor (Castell y Mapplebeck, 1952). En este sentido, Lobben y Lee (1968) observó que no producían ni ácidos ni bases volátiles relacionadas con la alteración del pescado. En la figura VI.3 se puede observar que los niveles de *Flavobacterium* no son significativos durante el almacenamiento a refrigeración de los pescados de agua dulce analizados. Diversos autores (Acuff y col, 1984; Adams y col, 1964; Lee y Harrison, 1968) han constatado que, independientemente de los niveles iniciales de flavobacterias en productos de la pesca, su presencia se reduce drásticamente a partir del momento en que comienza la refrigeración de los mismos.

Por lo que se refiere al estudio taxonómico propiamente dicho, los mejores índices de separación entre taxones (tabla VI.3) correspondieron a la asimilación del gluconato (18), de la lisina (16) y de la arginina (12). Por otro lado, Prieto y col (1992b) obtuvieron que los mejores índices de separación entre taxones de bacterias Gram negativas aerobias inmóviles se debían a las pruebas de producción de ácido a partir de distintos azúcares (concretamente de melibiosa, L-arabinosa y celobiosa) en contraposición a lo que advirtieron para la diferenciación entre taxones conteniendo *Pseudomonas* (Prieto y col, 1992a), en los cuales la mejor separación entre grupos la proporcionaban las pruebas de asimilación de compuestos de carbono.

En nuestro estudio hemos podido observar la gran proximidad (basándonos en propiedades fenotípicas) existente entre las cepas de *P. immobilis* y de *M. phenylpiruvica*. Así, la mayor parte de las cepas identificadas como tales se agruparon a niveles de semejanza del 76% (taxones I a III). La proximidad entre ambas especies, desde un punto de vista fenotípico, ya fue puesta de manifiesto por Rossau y col (1991). En este sentido, en el trabajo de Prieto y col (1992b) también se puede observar que los taxones que contenían a ambas especies estaban muy próximos entre sí y se agrupaban a un nivel de semejanza más alto que con los taxones que contenían cepas de *Moraxella* spp y de *P. fragi* inmóviles.

Los taxones conteniendo cepas de *Acinetobacter* (taxones V, VI y IX -figura VI.4-) se encontraron mucho más dispersos en el dendrograma que los de *P. immobilis*, revelando cierta heterogeneidad o variabilidad fenotípica dentro de dicho género (Van Landschoot y col, 1986). Las cepas de *Flavobacterium*, por su parte, se mostraron más próximas a *Acinetobacter* que a *Moraxella* o *P. immobilis*.

El taxón VIII, constituido por cepas de distintos géneros microbianos, pone de manifiesto el gran parecido (similar al que encontraron Juni y Heym, 1980) entre las cepas Gram negativas aerobias inmóviles, tanto oxidasa positivas como oxidasa negativas. Comparando nuestros taxones adscritos al género *Acinetobacter* (V, VI y IX -figura VI.4-) con los de Baumann y col (1968b), podemos apreciar que difieren en varios de los compuestos utilizados como única fuente de carbono dando valores variables, en nuestro caso, para la mayoría de dichas sustancias. Sin embargo, podemos observar que el taxón V

(figura VI.4) corresponde al grupo A de Baumann y col (1968b), muy versátil nutricionalmente (concretamente al subgrupo A₂) mientras que los taxones VI y IX (figura VI.4) serían más parecidos al B₁ o al B₂. Los HMO de los tres taxones considerados poseyeran, por su parte, características intermedias entre los taxones 1 y 2 de Pagel y Seyfried (1976), que correspondían a cepas de origen acuático y a cepas clínicas respectivamente. Debido a su mayor versatilidad nutricional, el taxón V (figura VI.4) se asemeja al subtaxón 1b de Pagel y Seyfried (1976), aunque difiere en el crecimiento en Agar Citrato de Simmon y en la tolerancia a 3% de sal.

Como en las cepas tipo empleadas en el estudio de las bacterias Gram negativas aerobias móviles, en el presente análisis numérico, las cepas de colección utilizadas no han sido de utilidad para la adscripción de alguno de los taxones a género o a especie, ya que, incluso, las cepas de *M. osloensis* y *A. calcoaceticus* conformaron uno de los taxones no significativos. En todo caso, la cepa tipo de *F. odoratum* se agrupó, a un 70% de semejanza, con las cepas 2683 y 2684, identificadas como *F. balustinum*.

En definitiva, podríamos decir que en este ejercicio de taxonomía numérica no se ha obtenido una separación clara entre los distintos grupos de microorganismos Gram negativos aerobios inmóviles, si bien sí se han podido obtener algunos grupos o taxones bien definidos que han contenido a la mayor parte de las cepas de *P. immobilis*, de *M. phenylpiruvica* y de las especies *A. johnsonii* y *A. lwoffii*. Esta deficiente separación puede haberse debido a la baja actividad bioquímica y fisiológica que presentaron la mayor parte de los microorganismos estudiados, lo cual habría amplificado las pequeñas diferencias existentes entre cepas de una misma especie.

GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS

En primer lugar, nos referiremos al género *Aeromonas*. En el presente estudio se han conseguido identificar todas las especies y grupos de hibridación (todos móviles) obtenidos en el estudio recogido en el capítulo II, a excepción del grupo de hibridación 3. Además, se ha identificado una cepa de *A. sobria* (grupo de hibridación 7), especie que no fue aislada a partir de los aislamientos realizados en el medio selectivo (ver capítulo II). Básicamente, presentaron las características generales de *Aeromonas* móviles descritas por Popoff (1984).

La identificación de las especies, y de los taxones, correspondientes a *Aeromonas* fue satisfactoria empleando el sistema que aparece en la discusión del capítulo II de la presente memoria y que corresponde a la utilización de un número reducido de pruebas bioquímicas, si bien en este caso, el porcentaje de cepas que no pudieron identificarse a nivel de especie fue ligeramente superior al obtenido en el capítulo II (figura VI.6). Sin embargo, cabe hacer una pequeña salvedad: en el presente caso, si bien la prueba del Voges Proskauer fue útil para la distinción entre *A. hydrophila* y *A. eucrenophila*, no sucedió lo mismo con la prueba de la descarboxilación de la lisina, con la que se obtuvieron resultados muy variables (tabla VI.6). También se ha podido obtener la adscripción a nivel de grupo de hibridación, lo que es especialmente satisfactorio en los grupos de hibridación comprendidos en el “complejo *A. hydrophila*”, y caracterizados por presentar dificultades en dicha identificación (Kämpfer y Altwegg, 1992).

Como en las cepas estudiadas en el capítulo II, la producción de indol no ha sido un criterio útil para la distinción interespecífica (tabla VI.6), si bien en algunos esquemas de identificación, y en otros trabajos que utilizaron taxonomía numérica, aparece como universalmente positiva o mayoritariamente positiva para las especies consideradas en el presente estudio (Austin y col, 1989; Esteve y col, 1995c). La prueba del rojo de metilo tampoco resultó ser de mucha utilidad.

Las cepas de *A. veronii sobria*, que supusieron casi el 50% del total de cepas de *Aeromonas* aisladas (figura VI.6), se identificaron como tales en virtud de su positividad en la hidrólisis de la arginina y por ser capaces de producir ácido a partir de la sacarosa, mientras que las de *A. jandaei* fueron negativas para la primera de ambas características (tabla VI.6). Probablemente, el taxón 7 obtenido por Austin y col (1989) podría ser adscrito, teniendo en cuenta esta propiedad que caracteriza a *A. jandaei* y basándonos en criterios fenotípicos, a esta especie de *Aeromonas*.

Las cepas pertenecientes a las distintas especies y/o grupos de hibridación de *Aeromonas* presentaron unos perfiles muy similares a los obtenidos por Kämpfer y Altwegg (1992) en lo que se refiere a las pruebas de asimilación de compuestos de carbono y producción de ácido a partir de azúcares (tabla VI.6). Únicamente las cepas identificadas como *A. eucrenophila* presentaron un número reducido de diferencias con respecto al trabajo de Kämpfer y Altwegg (1992), principalmente en lo que se refiere a la utilización de celobiosa, lactosa, sacarosa y citrato como únicas fuentes de carbono, y de lactosa y sacarosa como sustrato susceptible de dar lugar a ácido como consecuencia de la acción de estos organismos. Las cepas identificadas como pertenecientes al grupo de hibridación 1 presentaron un perfil prácticamente idéntico a las de Kämpfer y Altwegg (1992). Algo similar se ha observado en las cepas de taxón VIII de *A. veronii sobria* (GH 8) con respecto al biogrupo 1 de la especie *A. veronii* y en las cepas del taxón I de este mismo grupo de hibridación (excepto en la asimilación de la salicina) con respecto al biogrupo 2 de *A. veronii* (Kämpfer y Altwegg, 1992). Las cepas del *A. veronii sobria* del taxón V presentaron características intermedias entre ambos biogrupos definidos por Kämpfer y Altwegg (1992). Las cepas identificadas como *A. jandaei* (GH 9, taxón II) únicamente diferían de las de Kämpfer y Altwegg (1992) en que eran capaces de utilizar celobiosa.

Al comparar nuestro estudio con el de Austin y col (1989) podemos apreciar que, básicamente, las características comunes de las *Aeromonas* móviles descritas por ellos difieren muy poco de las aisladas por nosotros. Estas diferencias se dan, principalmente, en la tolerancia a concentraciones de sal del 3%, en el crecimiento a 37°C, en la asimilación de ramnosa, en la fermentación de sorbitol y lactosa, y en la hidrólisis de tirosina. En otro orden de cosas, las cepas de *Aeromonas* móviles de Austin y col (1989) mostraron una considerable actividad -hemolítica y productora de indol (a diferencia de las nuestras en que ambas propiedades fenotípicas resultaron ser muy variables incluso dentro de cada especie fenotípica) y una baja actividad descarboxilante de la lisina y Voges-Proskauer. En cuanto a las características exhibidas por parte de las especies de *Aeromonas* móviles en ese mismo trabajo se observa que la prueba de la producción de ácido a partir de la celobiosa era positiva principalmente para *A. sobria*, así como la asimilación de salicina para *A. hydrophila*.

Como en el capítulo II, se puede apreciar que en los ejemplares de trucha arco iris se aisló un número de aeromonas significativamente inferior al obtenido en trucha común y, sobre todo, lucio (tabla VI.5). En esta última especie predominaron las aeromonas móviles pertenecientes al complejo "*A. sobria*", es decir, las especies *A. veronii sobria* y *A. jandaei*.

Representantes de distintas especies pertenecientes al género *Aeromonas*, principalmente *A. hydrophila* y *A. sobria*, han sido aisladas en muestras de intestino y superficie de salmónidos procedentes de piscifactorías (Allen y col, 1983b), en muestras de tiburones (Grimes y col, 1993) y en pescado alterado de distintos orígenes donde representaban un 6% del total de cepas aisladas de pescado alterado (Sternström y Mölin, 1990). En el estudio de Horsley (1973) en salmónidos, las *Aeromonas* fueron aisladas a partir de agallas y piel del pescado en bajos porcentajes con respecto a la flora total, lo que le llevó a pensar que este género microbiano podría verse inhibido por la acción del limo superficial de la piel, contrariamente a lo observado por Evelyn y McDermott (1961). En otros trabajos ha sido, asimismo, uno de los géneros predominantes en el intestino (Austin y Al-Zahrani, 1988; Trust y Sparrow, 1974), y en agallas de salmónidos de vida libre (Trust, 1975) así como en otras muestras analizadas en pescado (Nedohula y Westhoff, 1993; Sugita y col, 1985).

En cuanto a su importancia como agentes alterantes del pescado cabe decir que nuestras cepas de *Aeromonas* han sido capaces de dar lugar a H₂S y de manifestar actividad lipolítica y proteolítica, pero únicamente un reducido número de cepas redujeron el OTMA (tabla VI.6). Bacterias de este género se han asociado con la alteración de filetes de bacalao donde reducían el OTMA (Castell y Anderson, 1948), con la alteración de algunos pescados de agua dulce (perca del Nilo, *Lates Niloticus*) almacenados a temperatura ambiente (Gram y col, 1990) y con la alteración, en condiciones de anaerobiosis, de arenques (Strom y Larsen, 1979). Gram y col (1987) identificaron a las vibrionáceas (entre ellas se incluían *Aeromonas*) como las bacterias alterantes específicas del pescado mantenido a 20°C, siendo capaces de, entre otras propiedades, producir H₂S a partir de la cisteína. Estos mismos autores asociaron al género *Aeromonas* con la alteración de las agallas, por sus actividades hemolíticas y productoras de H₂S. Shaw y Shewan (1968), por el contrario, observaron que *Aeromonas* no eran capaces de producir malos olores. Sin embargo, Gillespie (1981) aisló bacterias semejantes a *Aeromonas* que eran reductoras del OTMA y que producían olores a aminas y de otros tipos característicos de alteración. En otros alimentos, como la leche, se ha considerado a *Aeromonas* como participante en la alteración de la misma como consecuencia de su actividad lipolítica (Ternström y col, 1993).

La diferenciación entre los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* se ha basado tradicionalmente, y entre otras propiedades, en la resistencia o sensibilidad al agente vibriostático O-129. En algunos de los trabajos científicos que hemos revisado en el presente estudio (Bryant y col, 1986; West y col, 1983), y que incluían a cepas de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*, hemos podido observar que la inmensa mayoría de las cepas identificadas como *Aeromonas* eran resistentes a dicho compuesto vibriostático, mientras que casi la totalidad de las cepas de las distintas especies de *Vibrio* eran sensibles a ese mismo compuesto a las concentraciones utilizadas en nuestro trabajo. Shewan y col (1960b) ya observaron la utilidad de dicha prueba para la diferenciación entre ambos géneros. Sin embargo, algunas cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. mimicus*, el primero de los cuales es de suma importancia desde el punto de vista de la salud pública (Varnam y Evans, 1991), se han mostrado resistentes a las concentraciones de 150 µg/ml de O-129 (Molitoris y col, 1989). Kaznowski y col (1989) utilizaron asimismo, y entre otros criterios (como la hidrólisis de la arginina), la resistencia al agente vibriostático O-129 para adscribir algunos taxones dudosos al género *Aeromonas*, aunque las cepas contenidas en dichos taxones fueran poco activas metabólicamente. Sin embargo, se ha descrito la existencia de

cepas de algunas especies de *Vibrio* (concretamente *V. cholerae*) resistentes a dicho compuesto vibriostático a las concentraciones comúnmente utilizadas en los análisis microbiológicos (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*, 1992). Otra de las propiedades fenotípicas que han servido para diferenciar al género *Aeromonas* de las especies de *Vibrio* halófilas es la incapacidad de aquéllas para crecer en presencia de una concentración del 6% de sal, fenómeno observado en los trabajos de otros autores (Kaznowski y col, 1989). Por otro lado, ni la morfología microscópica (característicamente curvada), ni el crecimiento en agar TCBS han sido de mucha utilidad a la hora de adscribir las cepas de *Vibrio* a nivel de género, ya que prácticamente ninguna de las cepas asignadas a dicho género poseían morfología microscópica curvada, ni crecían en agar TCBS (tabla VI.6). De hecho, no todos los vibrios que aislaron Allen y col (1983b) crecieron en este medio de cultivo, ni incluso fueron halófilos. Sin embargo, las cepas de *V. fluvialis* que detectaron Allen y col (1983b), a diferencia de las estudiadas por nosotros, sí crecieron en agar TCBS. El crecimiento en agar TCBS ha sido incluido en algunas claves de identificación de *Vibrio* (Alsina y Blanch, 1994) como una de las condiciones previas a la utilización de las mismas, de manera que aquellas cepas identificadas como presuntos vibrios e incapaces de desarrollarse en dicho medio de cultivo (todas menos la cepa 3050) no se han podido identificar empleando este sistema.

En concordancia con lo observado al revisar los trabajos de otros autores que estudiaron la microbiología de los alimentos de origen acuático (Laycock y Regier, 1970; Shewan, 1971), en el pescado de agua dulce que hemos analizado, el género *Vibrio* no representa un porcentaje significativo de la flora total del pescado (figura VI.5), ni incluso si únicamente consideramos el grupo de los microorganismos Gram negativos fermentadores de la glucosa y oxidasa positivos, donde el género *Aeromonas* es el claramente predominante. De ellos, únicamente seis cepas se pudieron adscribir a especie (principalmente *V. fluvialis*). La mayor parte de ellas se detectaron en las muestras de trucha arco iris, ejemplares en los que no se aisló un número grande de representantes de *Aeromonas*, fenómeno que pudimos observar al realizar los aislamientos de *Aeromonas* en medios de cultivo selectivos (ver capítulo II).

Las especies de *Vibrio* encontradas en las muestras de trucha arco iris podrían corresponder a las cepas detectadas en el medio agar almidón ampicilina (ver capítulo II), que eran resistentes a la ampicilina y capaces de hidrolizar el almidón, y que fueron consideradas como falsos positivos en dicho medio específico para el aislamiento de *Aeromonas*. Allen y col (1983b) encontraron *V. fluvialis* en muestras tomadas en una piscifactoría. West y col (1983) estudiaron cepas de *V. anguillarum* procedentes de muestras de agua dulce, así como de *V. diazotrophicus* de origen acuático (no especificaban si se trataba de organismos procedentes de aguas dulces o saladas). En otros trabajos (Acuff y col, 1984; Austin, 1982) se aislaron miembros de *Vibrio* a partir de muestras de aguas y de pescado, pero no se procedió a la realización de su identificación a nivel de especie. Grimes y col (1993) identificaron varias especies de *Vibrio* (*V. damsela*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. cholerae*, entre otras) en muestras de tiburones, así como Binta y col (1972) en pescado que se vendía en mercados de Kenia (*V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*), pero ninguna de dichas especies fue detectada en nuestro trabajo. Esto puede ser debido al carácter halófilo de algunas de ellas, lo cual hace que no sean capaces de crecer en agua dulce.

Desde el punto de vista de la alteración, no parece que este género microbiano (*Vibrio*) tenga mucha importancia, ya que se ha observado que sus niveles, con respecto a la flora total, disminuyen a medida que avanza el almacenamiento a refrigeración (Acuff y col, 1984)

y que no son capaces de producir olores fuertes asociados a la alteración del pescado (Shaw y Shewan, 1968). Sin embargo, y teniendo en cuenta sus actividades proteo y lipolíticas (tabla VI.6), las cepas que hemos detectado en nuestro trabajo podrían desempeñar cierto papel en los estadios finales de la alteración del pescado. En este sentido, Makarios-Laham y Traxler (1991) opinan que los vibrios, al ser capaces de producir proteasas extracelulares.

El género *Photobacterium* ha sido detectado en ambientes marinos (Austin, 1982; Grimes y col, 1993) y como microorganismo alterante en bacalao empaquetado (Dalgaard, 1993), pero no tenemos noticia de su aislamiento en agua dulce. Las cepas identificadas como *Photobacterium* lo fueron más como consecuencia de sus características bioquímicas que las diferenciaban de *Vibrio* que por coincidir plenamente con la descripción del género dada por Hernández Haba y Dubón Pérez (1992). Posiblemente se necesitarán estudios posteriores conducentes a esclarecer su posición taxonómica.

Van Spreekens (1977) pudo apreciar que las cepas de *Photobacterium* que estudió eran capaces de reducir el OTMA (al contrario que en nuestras cepas) y daban lugar a la formación de hipoxantina, propiedades características de microorganismos alterantes de determinados pescados.

La identificación de las cepas de enterobacterias hubo de realizarse teniendo en cuenta claves dicotómicas simples (Koneman y col, 1989) y otros esquemas complementarios (Ewing, 1986), ya que en ocasiones dicha identificación resultaba muy dificultosa, principalmente debido a que no todas las características tenidas en cuenta en ambos esquemas coincidían con las empleadas en nuestro estudio. Dentro de cada una de las tribus de enterobacterias, la identificación a nivel de género era igualmente complicada, como en las cepas de *Klebsiella* (tribu Klebsielleae), que se adscribieron a éste en virtud de su inmovilidad. Dentro de esta misma tribu, y para la diferenciación entre los géneros *Hafnia* y *Enterobacter*, se empleó la acción de estos microorganismos sobre la gelatina (positiva en los segundos). El hecho de que dos cepas de *Enterobacter* del taxón XIII fueran gelatinasa negativas nos podría haber hecho identificarlas como *H. alvei*, pero diferían de esta especie en otra característica clave como es la hidrólisis de la urea, por lo que finalmente las asignamos al género *Enterobacter*. Las cepas de *Providencia*, dentro de la tribu Proteeae, se diferenciaron del género *Morganella* en base a la producción de indol, a la descarboxilación de la ornitina y del crecimiento en el agar citrato de Simmon.

En ocasiones, como en las cepas de *Edwarsiella*, no se pudo llevar a cabo la adscripción a especie, debido a que los organismos tratados presentaban características intermedias (según el esquema de Ewing -1986-) entre las especies consideradas dentro de este género. Sin embargo, esto sí fue posible con *P. mirabilis*, que se diferenciaba de otras especies de *Proteus* en función de su capacidad para descarboxilar la ornitina, con *K. oxytoca*, capaz de licuar la gelatina a diferencia de otras klebsielas, y con *C. freundii*, caracterizada por ser incapaz de producir ácido a partir del adonitol.

Las cepas contenidas en el taxón XIII (*Enterobacter* -figura VI.9-) presentaron perfiles muy similares a los observados por Allen y col (1983b) en sus cepas de *E. aerogenes*, excepto en lo referente a su capacidad para crecer a 37°C y a la producción de ácido a partir de la L-arabinosa y la maltosa. Las cepas identificadas como *H. alvei*, contenidas en el taxón XV, también se mostraron prácticamente idénticas a las aisladas por Allen y col (1983b). El resto de las cepas comprendidas en el taxón XV, e identificadas como *Edwarsiella* spp, correspondieron fielmente a la descripción de la tribu Edwarsielleae dada por Ewing (1989)

Distintas especies de enterobacterias han sido detectadas a partir de pescado de agua dulce fresco y almacenado y de ambientes acuáticos (Austin y Al-Zahrani, 1988; Evelyn y McDermott, 1961; Horsley, 1973; Trust y Sparrow, 1974; Trust, 1975). Petit (1987) afirmaba que la presencia de especies de *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, entre otros géneros de enterobacterias, era consecuencia de la manipulación humana. En este mismo sentido, Okafor y Nzeako (1985) opinaron que la presencia de representantes de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Proteus* en pescado fresco de Nigeria era indicativo de malas condiciones higiénicas. Al igual que nosotros, Allen y col (1983b) encontraron cepas de *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia* y *Serratia*, así como también *E. coli*, *Yersinia* y *Erwinia* en superficie e intestino de salmónidos procedentes de una piscifactoría. También se ha detectado su presencia en ambientes marinos (Austin, 1982; Koburger y Wahlquist, 1979). Por lo que se refiere a los géneros de enterobacterias, se ha aislado *Providencia* en intestino de salmónidos y en otros peces de agua dulce (Austin y Al-Zahrani, 1988; Youseff y col, 1992), *Enterobacter* en intestino y filetes de carpa y tilapia (Sugita y col, 1985; Wempe y Davidson, 1992), *Citrobacter* en intestino de carpa (Sugita y col, 1985) y *Proteus* en diversas especies de pescado (Evelyn y McDermott, 1961; Youseff y col, 1992), géneros éstos que, como se puede ver en la figura VI.8, también han sido aislados en el presente trabajo. *Edwardsiella*, *Hafnia* y *Proteus*, representaron el 65 % del total de enterobacterias aisladas en las muestras de pescado de agua dulce (figura VI.8). Las dos primeras se aislaron casi exclusivamente en muestras lucio (obtenidos en cursos bajos de los ríos -ver capítulo I-), mientras que la tercera fue característica de trucha común (tabla VI.5). La presencia de estos microorganismos en el pescado podría deberse no sólo a la manipulación a la que fueron sometidos, sino también a su presencia en el agua de los ríos donde fueron obtenidos, ya que en las muestras de agua se localizaron representantes de varias de estas especies (figura VI.9).

En la tabla VI.6 se puede apreciar, asimismo, que la inmensa mayoría de las cepas de enterobacterias agrupadas en taxones fueron capaces de desarrollarse a 4°C. Teniendo en cuenta que estos microorganismos, cuyo hábitat principal es el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, han sido tradicionalmente considerados como mesófilos e incapaces de crecer a bajas temperaturas, podría resultar chocante su aislamiento a partir de pescado almacenado a refrigeración. Sin embargo, Jay (1987) comprobó que diferentes especies de enterobacterias eran capaces de crecer bien a 7°C durante diez días, lo cual indicaba carácter psicrotrofo. Entre esas especies psicrotrofas se encontraron algunas de las aisladas en el presente trabajo, como *C. freundii*, *E. aerogenes*, *H. alvei*, *P. stuartii* y algunas especies de *Serratia*.

Debido a su ubicuidad en el ambiente y a que son capaces de crecer a bajas temperaturas, en algunos casos las enterobacterias se han visto involucradas en la alteración de alimentos refrigerados (Varnam y Evans, 1991). En este mismo sentido, hay que mencionar que su papel como microorganismos potencialmente alterantes de los alimentos en general, y del pescado en particular, ha quedado plasmado en una serie de trabajos de investigación que relacionamos a continuación. Castell y Anderson (1948) pudieron observar que algunas cepas de *Proteus* y *Serratia* desarrollaban malos olores (pútridos) y reducían el OTMA a 3°C en el curso de la alteración de filetes de bacalao. Strom y Larsen (1979) observaron que *Enterobacter* y *Proteus* podrían participar en la alteración anaerobia de los arenques (crecían en extractos de este mismo pescado). Gram y col (1987) detectaron enterobacterias que, si bien no producían H₂S en agar hierro, eran capaces de dar malos olores cuando crecían en medios diseñados para estudiar la capacidad alterante específica de los

microorganismos. En otros productos alimenticios distintos del pescado, como en leche cruda, Shelley y col (1987) asociaron a *P. mirabilis* con la alteración lipolítica de dicha leche.

En cuanto a su importancia como microorganismos patógenos vehiculados por alimentos cabe decir que algunos representantes de los géneros *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia* y *Serratia*, todos ellos aislados en el presente estudio, se han visto implicados como agentes causales en brotes esporádicos de toxiinfecciones alimentarias (Varnam y Evans, 1991), si bien esta patogenicidad estaría restringida a un número reducido de cepas dentro de cada género (Varnam y Evans, 1991). Algunas de las especies contenidas en los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* han sido reconocidas como patógenas oportunistas, siendo *C. freundii* y *E. cloacae* las especies que podrían tener algo de importancia como tales (Varnam y Evans, 1991). Su baja tasa de aislamiento en pescado de agua dulce, así como la de los representantes de los géneros *Serratia*, *Providencia* y *Klebsiella*, nos lleva a afirmar que su importancia como agentes de trastornos gastrointestinales en el consumidor de este tipo de productos debe ser escasa. En el género *Edwardsiella*, la especie *E. tarda* se ha visto reconocida, también, como agente causal de diarrea (Varnam y Evans, 1991), si bien en el presente estudio no hemos detectado la presencia de representantes de esta especie microbiana. *Proteus* (*P. mirabilis* y *P. vulgaris*) puede llegar a ser un agente causal de diarrea, pero únicamente los síntomas son producidos bajo ciertas condiciones poco comunes (Varnam y Evans, 1991). Por último, es importante hacer constar que en el libro de Varnam y Evans (1991) las especies *E. aerogenes*, *E. intermedius*, *P. stuartii*, *C. amalonaticus*, *H. alvei* y *K. oxytoca*, aisladas en el estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio, no aparecen reflejadas como importantes desde el punto de vista de la salud pública. Teniendo en cuenta todos estos datos podemos concluir que las enterobacterias detectadas a lo largo del almacenamiento a refrigeración del pescado de agua dulce no suponen un grave peligro para la salud pública siempre y cuando se lleve a cabo un tratamiento tecnológico mínimo que inactive a las bacterias potencialmente patógenas, dentro de las cuales únicamente podríamos considerar como importante a *Proteus mirabilis* (Varnam y Evans, 1991).

A pesar de que algunos autores consideraron que *Aeromonas* y enterobacterias eran muy similares (Colwell y Liston, 1961), lo cierto es que en el presente estudio han mostrado profundas diferencias entre sí que se aprecian bien en la figura VI.6. Allen y col (1983b), empleando el coeficiente de Jaccard (S_j) sobre bacterias aisladas a partir de muestras tomadas en una piscifactoría, obtuvieron agrupamientos de *Aeromonas* y *Vibrio* claramente separados de la mayor parte de las enterobacterias. Estos resultados (derivados del estudio de características fenotípicas) entran en contradicción con los estudios genéticos que ponen de relieve una mayor proximidad entre el género *Aeromonas* y los representantes de la familia *Enterobacteriaceae*, que entre *Aeromonas* y *Vibrio* (McDonell y Colwell, 1985). Por lo que respecta a *Vibrio* y *Photobacterium*, tanto en los estudios que empleaban técnicas genéticas como en los que se utilizaban propiedades fenotípicas, aparecen muy próximos entre sí y bastante separados de las enterobacterias (Austin, 1982; McDonell y Colwell, 1985; Ruimy y col, 1994). Por lo que hace referencia a los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observa que el taxón VII (figura VI.7), que contiene un grupo heterogéneo de especies de *Vibrio*, aparece muy próximo a los taxones correspondientes a distintas especies de *Aeromonas*, mientras que el taxón XIV se agrupa con *Aeromonas*, y los restantes vibrios, a un nivel de semejanza bastante bajo (rondando el 64%) y a un nivel del 62% con los taxones conteniendo cepas identificadas tentativamente como *Photobacterium*. En diversos trabajos

en los que se han tratado numéricamente poblaciones de *Vibrio*, *Photobacterium* y *Aeromonas* (West y col, 1983; Bryant y col, 1986), las *Aeromonas* móviles se agrupaban con los taxones que contenían cepas de *V. fluvialis*, *V. furnissi* y *V. anguillarum* a un nivel de semejanza alto, mientras que con *Photobacterium* lo hacían a niveles mucho más bajos. Al igual que nosotros, y a pesar de las similitudes fenotípicas existentes entre las especies *A. hydrophila* y *V. fluvialis* (en algunos casos cepas de *V. fluvialis* aparecen comprendidas en taxones correspondientes a *A. hydrophila* -West y col, 1986-), West y col (1983) apreciaron que la separación entre ambas especies era satisfactoria tanto en la identificación preliminar que realizaron como en el análisis taxonómico posterior.

Shewan (1971) señalaba la semejanza existente entre los representantes del género *Aeromonas* y del género *Photobacterium*, algo que no hemos visto reflejado en nuestro estudio al menos entre la mayor parte de las cepas de *Aeromonas* identificadas y las de *Photobacterium*.

Diversos autores han realizado análisis de taxonomía numérica sobre cepas pertenecientes al género *Aeromonas* (Austin y col, 1989; Kämpfer y Altwegg, 1992; Kaznowski y col, 1989; Lee y Bryant, 1984), obteniendo resultados bastante similares en tanto en cuanto podían apreciar el establecimiento de taxones que correspondían a especies definidas dentro de dicho género. En algunos casos, encontraron que existía una buena correlación entre sus estudios de taxonomía numérica y los de hibridación referidos al género *Aeromonas* (Kämpfer y Altwegg, 1992).

Austin y col (1989), además de obtener una buena separación entre las *Aeromonas* móviles y las inmóviles, observaron la existencia de grupos de *Aeromonas* con características intermedias entre las especies de *Aeromonas* móviles y postularon, desde sus estudios de taxonomía numérica, que estas cepas eran nuevos centros de variación en este género, afirmando que podrían estar relacionados con la posible existencia de otras especies de *Aeromonas* móviles que se pudieran definir por criterios fenotípicos. Esto se ha visto refrendado en diversos estudios en los que se han ido describiendo nuevas especies y grupos de hibridación (ver capítulo II).

En el estudio de taxonomía numérica de *Vibrio* y *Aeromonas* de Kaznowski y col (1989) los taxones conteniendo a las cepas adscritas a las especies *A. sobria*, *A. hydrophila* y *A. caviae* se agrupaban a niveles de semejanza muy altos (85% S_{SM}). Sin embargo, alguna característica tradicionalmente considerada como clave para diferenciar entre dichas especies de *Aeromonas* (hidrólisis de la esculina) resultó variable para cada uno de dichos agrupamientos.

Kämpfer y Altwegg (1992) obtuvieron una buena resolución en la diferenciación entre los diversos grupos de hibridación de *Aeromonas* descritos y que eran los más comúnmente encontrados en análisis microbiológicos. Cada uno de los distintos taxones contenía, casi exclusivamente, cepas de uno de dichos grupos. Sólomente en algunos casos observaron que las cepas de los grupos de hibridación 2 y 3 se alojaban en los mismos taxones. Al igual que en nuestro caso, la mayor parte de los taxones de *Aeromonas* se agruparon por encima de un nivel de semejanza del 76%. Kämpfer y Altwegg (1992) también pudieron apreciar una gran similitud fenotípica y homogeneidad fisiológica dentro del género *Aeromonas*, lo cual dificultó la identificación a nivel de grupo de hibridación de algunas de las cepas estudiadas. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos una separación tan definida como la que ellos obtuvieron entre los superagrupamientos que constituyen los complejos "*A. sobria*", "*A. hydrophila*" y "*A. caviae*". Tal y como se puede apreciar en las figuras VI.9 y VI.10, la

relación fenotípica obtenida entre los taxones de los grupos de hibridación 1 y 2 del “complejo *A. hydrophila*” es menor que entre cualquiera de ellos y otros grupos de hibridación distintos de los del “complejo *A. hydrophila*”. En este sentido, Kämpfer y Altwegg (1992) encontraron que era mayor la relación entre los grupos de hibridación 2 y 3 entre sí que con las cepas del grupo de hibridación 1, si bien las cepas de estos tres grupos de eran difíciles de separar fenotípicamente. En nuestro trabajo, las cepas de *A. hydrophila* del grupo de hibridación 1 (reconocidas como *A. hydrophila* “sensu stricto” - Kämpfer y Altwegg, 1992-) se agruparon con las del grupo de hibridación 6 (*A. eucrenophila*) y con la única cepa de *A. caviae* identificada como tal. Este superagrupamiento aparece relativamente separado de los taxones correspondientes al complejo “*A. sobria*” (figura VI.10).

En la figura VI.9, las cepas de *A. veronii* (correspondientes al grupo de hibridación 8) aparecían distribuidas en taxones (I, V y VIII) relativamente alejados unos de otros, así como incluidas en taxones en los que no eran la especie más representativa. Estos taxones podrían corresponder a variedades dentro de este biogrupo de *A. veronii* (GH 8). Kämpfer y Altwegg (1992) también pudieron observar la existencia de subgrupos (biogrupos), definidos por taxonomía numérica, dentro del grupo de hibridación número 8 de *Aeromonas*, así como cepas de estas mismas características que permanecieron sin agrupar en taxones significativos. Concluyeron que dentro del grupo de hibridación 8 existía una gran heterogeneidad bioquímica y que era apropiado establecer dos subespecies de *A. veronii*, si bien de sus resultados se desprende que habrían de ser dos biogrupos contenidos en el grupo de hibridación 8 de *Aeromonas* (actualmente conocido como *A. veronii sobria*) y no relacionados con el grupo de hibridación 10 (*A. veronii veronii*). En nuestro estudio, tal y como hemos mencionado con anterioridad, se puede apreciar una elevada homogeneidad fenotípica entre los taxones de *Aeromonas* analizados, si bien pueden plantearse diferencias, de las que resultan taxones como los de *A. veronii sobria*. Estas diferencias pueden deberse a la variabilidad existente en propiedades fenotípicas distintas de aquéllas consideradas como claves para la diferenciación entre especies y/o grupos de hibridación, como la hidrólisis de la esculina y otras que aparecen reflejadas en diversos artículos y revisiones (Abbot y col, 1992; Hänninen, 1994).

Por lo que respecta a *A. eucrenophila*, Austin y col (1989) consideraron que esta especie no merecía tal rango taxonómico al poseer muchas características comunes con *A. caviae*. Sin embargo, de nuestro dendrograma se desprende que las cepas identificadas como tales forman un taxón bien definido, si bien próximo a las cepas del grupo 1 de hibridación y a la cepa de *A. caviae*.

Como en el estudio de Lee y Bryant (1984), la cepa tipo de *A. sobria* empleada en nuestro estudio no se agrupó en ninguno de los taxones correspondientes a las cepas del “complejo *A. sobria*”. Austin y col (1989) encontraron que algunas cepas identificadas como *A. sobria* se agrupaban en taxones de *A. hydrophila*, lo que demuestra la gran heterogeneidad existente dentro de este género microbiano.

Al contrario que en el estudio de Kämpfer y Altwegg (1992), algunos de los taxones de *Aeromonas* definidos en nuestro estudio no fueron politéticos, es decir, un sólo carácter era suficiente para asignar una especie a un grupo de terminado. Así, las cepas del taxón X (*A. eucrenophila*) fueron las únicas *Aeromonas* capaces de asimilar la glicocola como única fuente de carbono, las del taxón V (*A. veronii sobria*) las únicas incapaces de hidrolizar la gelatina, etc.

Finalmente cabe decir que en el trabajo de Martínez-Murcia y col (1992a), en el que se estudiaron las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de *Aeromonas*, se pudo

observar que las especies *A. veronii sobria*, *A. schubertii* y *A. jandaei* formaban un grupo bien definido dentro de este género (conocido como “rama Schubertii”) y que estaba poco relacionado con la especie *A. sobria*.

Uno de los aspectos más relevantes observados en las figuras VI.9 y VI.10 es la existencia de un taxón identificado como *Vibrio* spp (taxón VII) compuesto por tres especies distintas de *Vibrio* y dos cepas de *Vibrio* que no pudieron ser identificadas a nivel de especie. *V. fluvialis* y *V. furnissi*, dos de las especies recogidas en dicho agrupamiento, son organismos que presentan una gran proximidad fenotípica y, tradicionalmente, son difíciles de distinguir entre sí (Dawson y Sneath, 1985). De nuestro estudio se desprende que existe un claro requerimiento para el establecimiento de características mínimas para la identificación de *Vibrio* spp, especialmente en aquellas cepas de origen acuático.

El uso de los porcentajes de semejanza entre las cepas de enterobacterias es uno de los métodos taxonómicos disponibles, de los basados en caracteres fenotípicos, cuyos resultados son más fácilmente comprensibles (Ewing, 1986), pero tal y como se aprecia en la figura VI.9, existe una gran heterogeneidad en el área del dendrograma correspondiente a las especies de enterobacterias. Este hecho podía ser un reflejo de la capacidad que tienen estos microorganismos para intercambiar información genética entre distintas especies, con el resultado de la existencia de cepas de una especie determinada que presentan muy poca similitud fenotípica con otras cepas de la misma especie y que, por lo tanto, se encuentran situadas en otras zonas del dendrograma. Este fenómeno contribuye a explicar las limitaciones de las técnicas de la taxonomía numérica para estudiar la sistemática dentro de esta familia microbiana. Entre los trabajos de taxonomía numérica, en los que se incluían cepas de enterobacterias aisladas a partir de alimentos diversos, que hemos consultado (García-Armesto y col, 1993; Ternström y col, 1993) tampoco hemos observado una separación clara entre las distintas especies de enterobacterias, ni incluso a nivel de género, si bien García-Armesto y col (1993) encontraron que *H. alvei* y *Klebsiella* spp, tras realizar un corte a un nivel de similitud más alto que el que definía claramente especies de otros grupos microbianos tanto Gram positivos como Gram negativos, conformaron taxones diferenciados con respecto a otras enterobacterias con las que confluían a un nivel de semejanza ligeramente más bajo.

CAPÍTULO VII:

IDENTIFICACIÓN CLÁSICA Y CLASIFICACIÓN MEDIANTE TAXONOMÍA NUMÉRICA DE *Micrococcaceae*

INTRODUCCIÓN

En la última edición revisada del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (1986) la familia *Micrococcaceae*, que agrupa a microorganismos Gram positivos de morfología cocoide y catalasa positivos, aparece compuesta por cuatro géneros microbianos: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus* (Kloos y Schleifer, 1986). Cada uno de estos géneros comprende a un número variado de especies, que se ha visto incrementado, como en el género *Staphylococcus*, desde la publicación del citado Manual. Actualmente, el género *Micrococcus* está constituido por las mismas nueve especies que aparecían en dicho Manual (Kocur, 1986), el género *Planococcus* por dos (Kocur y Schleifer, 1981) y el género *Stomatococcus* por una sola (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992). Por lo que respecta a *Staphylococcus*, en el trabajo de Kloos y Bannerman (1994) se recogen un total de treinta y una especies pertenecientes a este género, que se vienen agrupando en dos grandes bloques: las especies positivas para la prueba de la coagulasa, tradicionalmente consideradas como patógenas, y las negativas para aquella prueba, de importancia creciente desde el punto de vista clínico (Kloos y Bannerman, 1994; Kloos y Schleifer, 1975). En cuanto a la estabilidad de la composición de la familia *Micrococcaceae*, cabe decir que Alderson (1985) ya propuso la separación de *Micrococcus* y *Staphylococcus* en dos familias diferentes, teniendo en cuenta que los primeros están más relacionados con otros géneros, tales como *Arthrobacter*. Baird Parker (1990), por su parte, afirmó que ambos géneros no están relacionados filogenéticamente y, en consecuencia, postuló la salida del género *Staphylococcus* de la familia *Micrococcaceae* y su inclusión en una nueva familia llamada *Staphylococcaceae*.

La distinción entre *Micrococcus* y *Staphylococcus* ha sido objeto de atención por parte de muchos investigadores a lo largo de las cuatro últimas décadas. De hecho, la historia de esta familia microbiana se ha centrado, desde los años cincuenta y en muchas ocasiones, en la búsqueda de un método eficaz para conseguir dicha diferenciación. Evans y col, en 1955, observaron que la producción de ácido a partir de la glucosa en condiciones anaerobias por parte de cepas del género *Staphylococcus* podía ser el mejor criterio para distinguir las cepas adscritas a la familia *Micrococcaceae*. Más tarde, Cowan (1962) afirmaba que el uso de los azúcares podía ser útil para distinguir entre las especies de micrococos.

El “Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci” (1965) propuso el uso del medio OF (Hugh y Leifson, 1953) mejorado, con el que se detectaba la producción, aerobia o anaerobia, de ácido a partir de la glucosa, con el fin de distinguir con más precisión ambos géneros microbianos. Pero esta prueba no resultó del todo adecuada puesto que, a medida que se fueron describiendo nuevas especies asociadas a nuevos hábitats, y eran adscritas a uno u otro género, se vió que no siempre daban lugar a las reacciones características de cada uno de los géneros en este mismo medio. Schleifer y Kloos (1975),

entre otros, observaron que algunos estafilococos no producían ácido a partir de la glucosa anaeróticamente, mientras que algunos micrococos sí.

Años más tarde, Klesius y Schuhardt (1968) emplearon la prueba de la sensibilidad a la lisostafina (relacionada con la composición del peptidoglicano de la pared celular) para diferenciar a las cepas pertenecientes a cada uno de estos dos géneros de micrococáceas. Así, observaron que las cepas resistentes a la lisostafina poseían unos índices Guanina+Citosina (G+C) en sus ADN iguales a los característicos de los micrococos, mientras que los G+C de las cepas sensibles eran iguales a los de los estafilococos. Ya entonces, estos mismos autores afirmaron que esta prueba era la mejor aproximación a una característica bioquímica única para diferenciar a ambos géneros. También apreciaron que la prueba del OF, por sí sola, no servía para diferenciar los micrococos de los estafilococos y que, de hecho, algunas cepas identificadas como micrococos en virtud de la prueba del OF, producían ácido anaeróticamente tras ser subcultivadas varias veces en este mismo medio.

Evans y Kloos (1972) dieron otro paso con el fin de progresar en la identificación de estos microorganismos y hacerla más sencilla. Emplearon el medio del tioglicolato de Brewer, no como un nuevo criterio para separar ambos géneros, sino como un método mejorado para detectar la capacidad de los estafilococos de fermentar la glucosa anaeróticamente. Al igual que los anteriores, observaron la existencia de cepas que eran incapaces de producir ácido a partir de la glucosa en condiciones anaerobias (identificadas como pertenecientes a *Micrococcus*), pero que poseían características propias de los estafilococos (índice G+C) y eran capaces de crecer en condiciones anaerobias en el medio del tioglicolato. Este medio presentaba, entre otras, una serie de ventajas tales como que era más simple que el OF y que presentaba una mejor correlación que éste con la composición del ADN en bases nitrogenadas. Aún así, no se podía considerar como un “test” definitivo, puesto que había cepas de *Micrococcus* (aunque más tarde fueron reclasificadas como estafilococos) que podían crecer en condiciones anaerobias.

Schleifer y Kloos (1975) propusieron un nuevo esquema, que en este caso consistía en una combinación de varias pruebas, en el cual se evaluaban, conjuntamente, la sensibilidad a la lisozima y a la lisostafina, y la producción de ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina, propiedad, esta última, exclusiva de los estafilococos. En principio, el único inconveniente de este esquema residía en la existencia de cepas de micrococos sensibles a la lisostafina, problema que se obviaba al no ser capaces de producir ácido a partir del glicerol. Estos mismos autores, en 1976, destacaron la importancia del estudio combinado de la sensibilidad a la lisostafina con la producción de ácido a partir del glicerol en presencia de la eritromicina. Este esquema, con el paso de los años, se ha visto superado por la existencia de cepas de micrococos que no fermentan el glicerol (Schumacher y col, 1985).

El estudio de la presencia de hidrocarburos alifáticos en las grasas neutras de los micrococos y la capacidad de éstos para crecer en presencia de nitrofuranos también han venido siendo considerados como criterios para la diferenciación entre micrococáceas (Schleifer y Kloos, 1976).

Finalmente, hay que mencionar a Von Rheinbaben y Hadlock (1981) que diseñaron un medio que contenía furazolidona y que era útil para distinguir los micrococos de los estafilococos ya que mientras los primeros eran resistentes a este antibiótico, los segundos eran sensibles.

De todos modos, si bien la adscripción a género de la mayor parte de las cepas aisladas e identificadas como pertenecientes a esta familia se puede llevar a cabo empleando alguna de las pruebas bioquímicas propuestas durante las décadas de los años sesenta y setenta, y a las

cuales hemos hecho referencia anteriormente, sigue siendo todavía problemática la identificación del resto de las cepas empleando esos mismos métodos, especialmente en aquellos microorganismos que no tienen origen clínico (De la Rosa y col, 1990). Actualmente, el estudio de la composición del ADN y de la pared celular son las técnicas más empleadas para llevar a cabo la identificación de micrococáceas, pero para los laboratorios de análisis de rutina los “test” bioquímicos convencionales son todavía necesarios para realizar dicha identificación, aunque en algunos casos se trate de una identificación aproximada. Un sistema definitivo, basado en propiedades fenotípicas y diseñado con el fin de ser empleado en un laboratorio de análisis de rutina, no está todavía disponible.

El hábitat principal de los representantes de esta familia es la piel y las mucosas de los animales de sangre caliente, si bien se han aislado de una gran variedad de fuentes como aire, plantas, agua dulce y agua salada, etc... (Baird Parker, 1990; Kloos y Schleifer, 1981; Kocur y Schleifer, 1981; Schleifer y col, 1981). Como resultado de su presencia en los mencionados hábitats han sido detectados frecuentemente en una gran variedad de alimentos de origen animal, como carne y productos cárnicos (De la Rosa y col, 1990), y leche y productos lácteos (García y col, 1988; García Armesto, 1990). Ocasionalmente, también han sido aislados en pescado recién capturado y en productos derivados de la pesca (Abo, 1980; Acuff y col, 1984; Gram y col, 1990; Horsley, 1973; Kocur y Schleifer, 1981; Okafor y Nzeako, 1985), sobre todo procedentes de áreas tropicales (Gillespie y McRae, 1975; León Fajardo y Marth, 1979). Tal y como se apuntaba en el capítulo II, la presencia de microorganismos pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* en el pescado se asocia con su manejo tras la captura, bien por el contacto con áreas contaminadas o por las manipulaciones a que son sometidos, previas a su procesado y/o distribución, a bordo de los barcos o en tierra. La piel de los manipuladores puede ser la fuente de dichos microorganismos, aunque también se ha detectado su presencia en ambientes acuáticos.

Además de las del género *Planococcus*, se han descrito otras micrococáceas asociadas al medio acuático, tales como *Staphylococcus delphini* (Varaldo y col, 1988) y *Staphylococcus piscifermentans*, detectada en pescado fresco en Thailandia (Tanasupawat y col, 1992).

Representantes de esta familia han sido aislados en niveles elevados a partir de canales de cordero refrigeradas (Prieto y col, 1995) y en carne envasada en atmósferas modificadas y almacenada a refrigeración (Venugopal y col, 1993), debido a lo cual podrían ser considerados como parte de la flora alterante de dichos productos. Por el contrario, el papel que desempeñan estos microorganismos en la alteración del pescado de agua dulce, capturado en regiones templadas del planeta y posteriormente mantenido a refrigeración, no parece ser muy importante, a pesar de la capacidad que tienen algunas especies de micrococáceas de desarrollar malos olores al crecer en un medio basado en pescado (Gillespie y McRae, 1975) y de hidrolizar proteínas y lípidos (Kloos y Schleifer, 1981; Schleifer y col, 1981). Este hecho puede deberse a que su crecimiento se ve retardado (e incluso inhibido), en la mayoría de los casos, por el efecto de las bajas temperaturas de conservación. De hecho, los niveles de estos microorganismos, con respecto a la flora total, disminuyen a lo largo del almacenamiento a refrigeración, independientemente de los niveles iniciales que presenten (Acuff y col, 1984). Algunos autores apuntan que son malos competidores y son incapaces de crecer en presencia de bacterias psicrotrofas (Varnam y Evans, 1991).

Asimismo, y tal y como se comentaba en el capítulo IV, este grupo microbiano puede ser considerado como indicador de la higiene durante el procesado del pescado, así como de su manipulación desde el momento de la captura hasta su consumo (Shewan, 1971). No hay que olvidar, de todas maneras, la capacidad que tienen algunas especies para desencadenar intoxicaciones alimentarias humanas (Kloos y Schleifer, 1981).

El propósito del trabajo contenido en este capítulo ha sido la identificación de las micrococáceas aisladas a partir de distintas muestras de pescado de agua dulce, identificación que se ha basado en la utilización de los esquemas y pruebas empleadas tradicionalmente en microbiología. Paralelamente, se ha procedido a la clasificación de los microorganismos estudiados mediante análisis numérico, con el fin de establecer las distintas relaciones entre los grupos microbianos mayoritarios. Finalmente se pretendían establecer las relaciones existentes entre los distintos taxones y su origen (especie de pescado, zona de muestreo, temperatura de aislamiento), así como evaluar la capacidad alterante de las cepas, todo ello con vistas a contribuir a delimitar la importancia real de las micrococáceas en el pescado de agua dulce.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se estudiaron un total de 64 cepas de microorganismos adscritos a la familia *Micrococcaceae*, de las cuales 61 fueron obtenidas a partir de placas de Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid) utilizadas para el recuento de las floras aerobia mesófila viable y aerobia psicrotrofa viable (ver capítulo I de la presente memoria). Además, se incluyeron tres cepas tipo como patrones internos, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240b) y *Planococcus citreus* (ATCC 14404), que pudieran tener interés desde el punto de vista de la salud pública o por su relación con el hábitat acuático.

Para su adscripción a la familia *Micrococcaceae*, dichas cepas fueron sometidas a una serie de pruebas preliminares, que aparecen reflejadas en el capítulo IV, que mostraron su condición de cocos Gram positivos y catalasa positivos. Para confirmar su pertenencia a dicha familia, se comprobó la ausencia de formas de resistencia al calor (esporos). Para ello, se aplicó un tratamiento térmico (80°C, durante diez minutos) a un caldo en fase estacionaria de crecimiento, tal y como se describe en el capítulo IV. Asimismo, se procedió a la repetición de la prueba de la catalasa (en el Agar A) siguiendo las indicaciones de Baird-Parker (1979).

Identificación clásica.

Se realizó siguiendo los esquemas de Kloos y Schleifer (1981), Kocur y Schleifer (1981), Schleifer y col (1981) y Hernández Haba y Dubón Pérez (1992).

Propiedades examinadas en el análisis numérico y empleadas en la identificación clásica.

Se estudiaron un total de 80 caracteres fenotípicos de los cuales diez correspondían a examen morfológico en distintos medios de cultivo, diez a pruebas fisiológicas, uno a resistencia a antibióticos y, el resto, fueron “tests” bioquímicos. Para la realización de las pruebas, los medios se incubaron a 28°C con excepción de los “tests” realizados para determinar su capacidad de crecimiento a distintas temperaturas.

Reacción de la citocromo-c-oxidasa. Llevada a cabo del modo descrito en anteriores capítulos (capítulo I). La aparición de colonias de color púrpura era indicativa de la presencia de esta enzima.

Movilidad. Se utilizó el medio GI (Difco) para detectar movilidad; la interpretación de los resultados, así como el período de incubación, aparece expuesta en capítulos anteriores (capítulo II).

Crecimiento en medio líquido. En este caso se empleó el Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI -Oxoid-). Tras 24 h de incubación (48 h en las cepas de crecimiento lento) se examinó la presencia de turbidez en el medio y/o de una película correspondiente a crecimiento en la superficie de dicho medio (Prieto, 1990).

Morfología en medio sólido. Las cepas se incubaron en la superficie de un medio sólido, el Agar A (Baird Parker, 1979), durante 48 h, período tras el cual se examinaron las siguientes características de las colonias (Prieto y col, 1992a): integridad del borde, convexidad, tamaño y aspecto (consistencia cremosa).

Producción de pigmentos. Para ello se utilizó el Agar P (Kloos y col, 1974). Las cepas se sembraron de la misma manera que en el caso anterior, pero en este caso se efectuaron lecturas a los dos y a los cinco días. Tras el período de incubación, se anotó la existencia de colonias no pigmentadas o la de colonias de color rosa, amarillo y/o naranja. Bajo el epígrafe “otros” se englobaron aquellas cepas con pigmentos distintos a los relacionados anteriormente.

Crecimiento y morfología de las colonias en el medio Baird-Parker. Tras un período de incubación de 48 h se anotó la aparición de: colonias de color negro, un halo de hidrólisis de las proteínas constituyentes del medio alrededor de la zona de crecimiento, así como la existencia de un área densa, que circundaba el halo de hidrólisis de las proteínas, como consecuencia, posiblemente, de la acción de una lipasa (Anon, 1990).

Crecimiento en condiciones de anaerobiosis. Para ello se empleó el medio semisólido Brewer Thioglycollate Medium (Difco) que fue precalentado, antes de la inoculación (por siembra en picadura) de las cepas problema, para eliminar el oxígeno que podría haber difundido a su interior desde el momento de su preparación. Las lecturas se realizaron a los dos y a los cuatro días de incubación. La interpretación de los resultados se hizo de acuerdo con el esquema de Evans y Kloos (1972), de tal manera que se anotaba la presencia o ausencia de crecimiento tanto en la zona donde existía una mayor tensión de oxígeno (zona de aerobiosis de coloración verde) como en la zona de anaerobiosis. En el caso de que el crecimiento se manifestase en esta última zona, se observaba si dicho crecimiento se daba únicamente alrededor de la zona de picadura, en masa o se caracterizaba por la presencia de colonias aisladas.

Crecimiento a diferentes temperaturas. Se llevó a cabo en el Caldo A (Baird Parker, 1979). Las cepas, una vez sembradas, se incubaron a 10°C (durante cinco días), 30 y 37°C (dos días) y a 15 y 45°C (tres días) en baños de agua termostataados. Aquellos tubos en los que la turbidez era evidente tras su agitación, fueron considerados como positivos, de manera análoga a lo descrito en el capítulo V.

Tolerancia a distintas concentraciones de NaCl. Las cepas se sembraron en la superficie de placas de Agar A (misma formulación que el Caldo A, pero al que se le añadieron 15 g/l de agar) a las que previamente se les había añadido NaCl a las siguientes concentraciones (p/v): 5%, 7.5%, 10% y 15%. Tras el período de incubación, las cepas resistentes a esas condiciones mostraron crecimiento en la zona de inoculación.

Oxidación y fermentación de la glucosa. Esta prueba fue llevada a cabo mediante dos procedimientos:

1. Empleando el medio OF de Hugh & Leifson (Difco): El esquema seguido aparece descrito en el capítulo II.

2. Utilizando el medio recomendado por el "Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci & Micrococci" (1965). Es similar al medio de Hugh & Leifson, pero en lugar de emplear azul de bromotimol como indicador de cambio de pH, se utilizó púrpura de bromocresol. La inoculación, incubación y lectura se realizaron como en el medio OF.

Producción de ácido a partir de distintos azúcares. El medio base empleado, Caldo Base Púrpura (Difco), fue suplementado con los siguientes azúcares esterilizados, previamente, por filtración (concentración final: 1% p/v): L-arabinosa, celobiosa, dulcitol, D-fructosa, D-galactosa, gluconato, *meso*-inositol, lactosa, maltosa, manitol, D-manosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, D-ribosa, sacarosa, salicina, sorbitol, D-sorbosa, trealosa, xilitol y D-xilosa. Se efectuaron lecturas periódicas tras 12 h, 1 d, 2 d y 5 d de incubación del mismo modo al descrito en el capítulo V. Las cepas que fermentaban los azúcares daban lugar a un cambio de color en el indicador (hacia amarillo). Si este cambio era ligero, era registrado como reacción dudosa.

Producción de ácido a partir de glicerol en presencia de eritromicina. Se llevó a cabo empleando el medio descrito por Schleifer y Kloos (1975). Este medio contiene diversas sales, glicerol al 1% (esterilizado por filtración) y un indicador (púrpura de bromocresol). Una vez preparado, se le añade una solución, también esterilizada por filtración, de eritromicina (concentración final: 0.4 µg/ml). La incubación, los tiempos de lectura y la interpretación de los resultados se efectuaron del mismo modo al descrito en el apartado anterior.

Resistencia a la novobiocina. Las cepas se sembraron en la superficie de placas de Mueller-Hinton (MH, Oxoid) que contenían 1.6 µg/ml de novobiocina (Sigma), de modo similar a Kloos y Schleifer (1975). Los microorganismos resistentes a las concentraciones utilizadas de este antibiótico daban lugar a colonias en la zona de siembra. Como control negativo se empleó el mismo medio base (Mueller-Hinton) al que no se le añadió novobiocina.

Resistencia a la furazolidona. Se siguió el método de Von Rheinbaben y Hadlock (1981). Como medio base se empleó TSA (Oxoid) suplementado con extracto de levadura al 0.1% (p/v) y Tween 80 al 0.5% (v/v). Paralelamente se prepararon dos soluciones que, esterilizadas por filtración, fueron añadidas al medio base atemperado a 48°C para evitar su floculación; una de ellas era una solución al 0.5% (v/v) de Aceite Rojo O (Oil Red O, Sigma) en acetona que era incorporada al 0.1% (v/v) al medio base; la otra, añadida al 10% (v/v) al medio base, consistía en una solución al 0.05% (p/v) de furazolidona (Sigma) en acetona. Una vez sumadas estas soluciones al medio base, se procuró la evaporación de la acetona mediante el secado de las placas en una cabina de flujo laminar. Como en el caso anterior, y a modo de control, las cepas se sembraron en placas a las que no se había añadido el antibiótico. Las cepas capaces de crecer en este medio fueron calificadas como resistentes a la furazolidona.

Resistencia a la lisostafina y a la lisozima. Se siguió la metodología de Kloos y Schleifer (1975). Se empleó el Agar P (Kloos y col, 1974) como medio base al que se le añadieron lisostafina (Sigma) o lisozima (Sigma) a las concentraciones finales de 200 µg/ml 25 µg/ml respectivamente (estas concentraciones son las que utilizaron Schleifer y Kloos -1975-). La presencia de crecimiento en los puntos de inoculación indicaba resistencia a estos compuestos antimicrobianos.

Las pruebas que se relacionan a continuación aparecen más ampliamente descritas en capítulos anteriores de la presente memoria (capítulos II y V). A continuación se describen, de manera breve, los medios empleados y la interpretación de los resultados.

Hidrólisis de la arginina. Se utilizó, como medio base, el Caldo Decarboxylase Möller (Difco) y se empleó la metodología descrita en el capítulo II. Las cepas que eran capaces de hidrolizar la arginina desarrollaban una coloración púrpura en el medio en el que crecían (Cowan, 1974).

Hidrólisis de la esculina. Llevado a cabo en Agar Esculina de modo análogo al descrito en el capítulo II. La presencia de un halo de ennegrecimiento alrededor de las colonias, tras el período de incubación (48 h), fue interpretado como una reacción positiva.

Reacción del Voges-Proskauer. Se empleó el medio MRVP (Oxoid). Tras el período de incubación (cinco días) se añadieron los reactivos indicados (ver capítulos II y V). La aparición de un anillo de color rojo en la superficie del medio era indicativo de la producción de diacetilo por parte de la cepa.

Utilización de citrato como única fuente de carbono. Se llevó a cabo en el Agar Citrato de Simmon (Oxoid). Las cepas capaces de utilizar citrato daban lugar a una coloración azul en el medio.

Actividad desoxirribonucleasa. Se manifestaba por la aparición de halos de aclaramiento (tras adición de HCl al 25%) alrededor de las colonias crecidas en el Agar DNAsa (Oxoid).

Reducción de nitratos a nitritos y a óxido nitroso. Como en el capítulo V, se empleó Caldo Nitrato (Difco), incubándose los tubos durante cinco días. Tras añadir los reactivos correspondientes, la producción de nitritos se manifestaba por un enrojecimiento del medio, mientras que la producción de óxido nitroso se verificaba al no modificarse el color del medio tras añadir polvo de zinc (Cowan, 1974).

Actividad -galactosidasa. Para esta prueba se utilizó la metodología descrita en el capítulo V. La reacción positiva se manifestaba por la aparición de un color amarillo en los tubos que contenían una suspensión bacteriana en solución salina y un disco de ONPG.

Resistencia al agente vibriostático O/129. Comprobada como ausencia de crecimiento alrededor del disco de antibiótico de O/129 de 150 µg (Oxoid), de modo análogo al descrito en el capítulo II.

Actividad lipolítica sobre Tween 20, Tween 60, Tween 80 y Agar Tributirina. Período de incubación de 48 h. En el caso de los distintos Tween empleados, la lipólisis se manifestaba como precipitación de ácidos grasos, mientras que la hidrólisis de la tributirina se verificaba por la aparición de un halo de aclaramiento.

Actividad proteolítica sobre gelatina y caseína. La actividad gelatinasa (licuefacción) fue puesta de manifiesto empleando el medio Nutrient Gelatin (Difco). La incubación se prolongó

hasta los siete días. En el caso de la actividad caseinolítica (halos de aclaramiento) se empleó el Agar Caseína (capítulo II) y la incubación se realizó durante tres días.

Acción sobre la yema de huevo. En este caso se registraron las actividades lipolítica y proteolítica tras un período de incubación de 48 horas (capítulo V).

Hemólisis y hemólisis. Las cepas se sembraron por agotamiento en placas de Agar Sangre que contenía un 5% de sangre de oveja y se incubaron durante 72 h. La hemólisis se caracteriza por la presencia de una coloración verdosa alrededor de las colonias por lisis incompleta de los eritrocitos, mientras que la hemólisis se corresponde con una zona de aclaramiento (ver capítulo II).

Análisis numérico de los datos y test de reproducibilidad.

Un total de 80 caracteres cuantitativos se codificaron como: 0, negativo; 1, positivo ó 2, prueba no realizada o resultado de difícil interpretación. Los coeficientes de similitud (S_{SM} o simple matching coefficient -Sokal y Michener, 1958- y S_j o coeficiente de Jaccard -Sneath, 1957-) se obtuvieron entre cada par de cepas empleando programas en VISUAL BASIC V3.0 (Microsoft Corp.) desarrollados por Prieto (1990). El agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) se consiguió con el programa SPSS/PC+ V3.1 (SPSS Inc., Chicago).

También se calculó el coeficiente de correlación (r) entre la matriz de similitud y los niveles en el fenograma derivados de los de la matriz (correlación cofenética -Sneath, 1978a-) empleando el programa NTSYS-pc V1.80 (Exeter Software, New York). Las tablas de frecuencia se generaron mediante el programa LOTUS 1,2,3 V2.0 (Lotus Development Corporation, Texas) y fueron empleadas para determinar los caracteres más discriminantes (Sneath, 1978a).

Como en los capítulos IV y V, todas las pruebas se repitieron en un 10% de las cepas (en este caso fueron sobre un total de siete). La probabilidad media de error (p) se calculó de acuerdo con lo especificado por Sneath y Johnson (1972).

Otras pruebas de identificación.

La detección de la **actividad coagulasa** se utilizó en la adscripción a especie de las cepas identificadas tentativamente como *Staphylococcus* spp. Se puso de manifiesto mediante el método en tubo (Baird Parker, 1979) y la utilización de "Plasma con EDTA para la detección de actividad coagulasa" (Difco). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 4 h y 24 h a temperatura ambiente. En la puntuación se empleó el sistema de Turner y Schwartz (1958). Los resultados de esta prueba no fueron incluidos en el análisis numérico.

RESULTADOS

Identificación clásica.

Ninguna de las cepas estudiadas poseía formas de resistencia al calor y todas resultaron ser catalasa positivas en el medio A. Todas las cepas, a excepción de una, pudieron ser identificadas, al menos, a nivel de género. La cepa que no fue identificada a este nivel (2031) se mostró muy poco reactiva en los distintos “tests” empleados. La cepa 2715, capaz de crecer a concentraciones elevadas de sal, fue adscrita al género *Planococcus* al producir un pigmento marrón y ser móvil.

Las pruebas que se tuvieron en cuenta, principalmente, a la hora de adscribir al resto de las cepas estudiadas a uno de los géneros restantes de la familia *Micrococcaceae* (*Micrococcus* o *Staphylococcus*) fueron las siguientes: resistencia a la lisostafina, producción de ácido a partir de la glucosa en condiciones anaerobias y crecimiento en anaerobiosis en el medio del tioglicolato de Brewer. En la tabla VII.1 se observan los perfiles característicos mostrados por las cepas estudiadas con respecto a las tres pruebas anteriormente mencionadas y su adscripción definitiva a género. Tal y como se puede apreciar en esta misma tabla, los perfiles R + – y S + – no se dan en ningún caso, hecho lógico, por otra parte, si tenemos en cuenta que al no ser capaces de crecer en anaerobiosis, tampoco podrían fermentar la glucosa en esas mismas condiciones.

Tabla VII.1. Perfiles mostrados por las cepas adscritas a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

	Género asignado	Lisostafina	Ferm. Glucosa	Crec. anaerobio
Perfil I	<i>Micrococcus</i>	R ⁽¹⁾	– ⁽³⁾	– ⁽³⁾
Perfil II	<i>Micrococcus</i>	R	–	+ ⁽⁴⁾
Perfil III	<i>Staphylococcus</i>	R	+ ⁽⁴⁾	+
Perfil IV	<i>Staphylococcus</i>	S ⁽²⁾	–	–
Perfil V	<i>Staphylococcus</i>	S	–	+
Perfil VI	<i>Staphylococcus</i>	S	+	+

⁽¹⁾R, resistencia a la lisostafina; ⁽²⁾S, sensibilidad a la lisostafina; ⁽³⁾incapaz de fermentar la glucosa o de crecer, respectivamente, en condiciones anaerobias; ⁽⁴⁾capaz de fermentar la glucosa o de crecer, respectivamente, en condiciones anaerobias.

El primer criterio que se tuvo en cuenta para adscribir cada uno de los dos géneros a los distintos perfiles fue la sensibilidad a la lisostafina. Así, las cepas sensibles a la lisostafina fueron identificadas como *Staphylococcus*, mientras que las resistentes lo fueron como *Micrococcus*. En el caso del Perfil III, en el cual las cepas eran resistentes a dicho compuesto pero fueron clasificadas como *Staphylococcus*, se consideró, además, tanto el crecimiento en condiciones de anaerobiosis y la fermentación de la glucosa anaeróticamente, como la capacidad de producir ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina, característico de *Staphylococcus*, “test” que fue positivo para todas las cepas contenidas en el perfil III.

En la tabla VII.2 se presenta la distribución de las cepas, identificadas a nivel de especie, entre los distintos perfiles de género.

Tabla VII.2. Distribución de las especies entre los distintos perfiles de género.

Especie	Perfiles†					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>M. varians</i>	6*					
<i>M. luteus</i>	10					
<i>M. sedentarius</i>	3					
<i>M. lylae</i>	6					
<i>M. agilis</i>	2					
<i>M. kristinae</i>	2	3				
<i>M. halobius</i>	1					
<i>M. roseus</i>	1					
<i>Micrococcus</i> spp.		2				
<i>S. saccharolyticus</i>						7
<i>S. caseolyticus</i>				2	3	
<i>S. auricularis</i>						1
<i>Staphylococcus</i> spp.			9		1	

*, número de cepas; †, perfil de género (tabla VII.1).

Las cepas identificadas a nivel de especie y sus correspondientes números de identificación, así como los datos relativos a su origen, se muestran en las figuras VII.1 y VII.2.

Las cepas pertenecientes al género *Micrococcus* y agrupadas en el perfil I fueron, a su vez, adscritas a varias especies, tal y como se aprecia en la tabla VII.2. Esta adscripción se realizó teniendo en cuenta el esquema abreviado para la diferenciación de *Micrococcus* que aparece en el volumen II de Prokaryotes (Schleifer y col, 1981) y que aún hoy sigue vigente.

Las cepas que mostraron pigmentación amarilla fueron adscritas a las especies *M. luteus* o *M. varians*. Las cepas identificadas como *M. luteus* (todas excepto la 2331 fueron resistentes a la furazolidona) coincidían con el esquema al que hemos hecho referencia anteriormente (Schleifer y col, 1981), si bien diferían en su respuesta a la prueba de la oxidasa (todas fueron negativas, en contraposición a lo que aparece en el esquema abreviado, en el que las cepas de *M. luteus* son oxidasa positivas o débilmente positivas) y a la producción aeróbica de ácido a partir de la glucosa (las cepas 109, 630, 2259, 2299 y 3515 produjeron ácido a partir de este azúcar, frente al carácter negativo que aparece en el esquema abreviado). El hecho que nos llevó a identificar definitivamente a estas cepas como *M. luteus* fue que la cepa patrón empleada (ATCC 10240b) era, asimismo, oxidasa negativa y fermentadora de la glucosa en condiciones aerobias.

La adscripción de las cepas a *M. varians* fue aún más complicada, ya que muchas de las características que exhibían eran coincidentes con la descripción de *M. sedentarius*. El principal criterio que empleamos para la adscripción a *M. varians* fue la utilización del citrato como única fuente de carbono, característica que no poseían las otras especies de *Micrococcus*. En la tabla siguiente (tabla VII.3) se muestran las características (fermentación aerobia de la glucosa, hidrólisis de la esculina y reducción de los nitratos a nitritos) en las que nuestras cepas dieron lugar a resultados variables y diferentes, en algunos casos, de la descripción que aparece en el volumen II de Prokaryotes (Schleifer y col, 1981).

Tabla VII.3 Características variables para las cepas identificadas como *M. varians*.

Pruebas	Cepas						Prokaryotes*
	263	280	283	2184	2583	2337	
Ác. glucosa (aerobiosis)	-	+	+	+	-	+	+
Hidrólisis esculina	+	+	+	-	-	+	-
Reducción de nitratos	+	-	-	-	-	-	+

*, resultados observados en el esquema abreviado (Schleifer y col, 1981).

Las cepas de *M. halobius* (sensible a la furazolidona) y *M. roseus* coinciden con el perfil mostrado en el esquema abreviado en todas sus características, excepto en lo referente a la prueba de la oxidasa (negativa) en la primera.

El resto de las especies, *M. sedentarius*, *M. lylae* y *M. agilis*, diferían de dicho esquema en una serie de pruebas. En general, los perfiles de estas tres especies fueron muy similares entre sí, si bien no eran coincidentes en lo referente a la prueba de la oxidasa y la movilidad. En la tabla VII.4 se muestran las cepas aisladas que difieren, en las pruebas que se señalan, de los patrones recogidos en el esquema de Schleifer y col (1981).

Tabla VII.4. Cepas que no coinciden con la descripción correspondiente de Schleifer y col (1981) en su esquema abreviado.

Prueba	Especie		
	<i>M. lylae</i>	<i>M. sedentarius</i>	<i>M. agilis</i>
Utilización del citrato	todas	1775, 2152	todas
Ác. glucosa (aerobiosis)	1954, 2711, 206		
Reducción de nitratos	2711, 206, 282		3038
Hidrólisis L-arginina		1775, 3418	3503
Hidrólisis esculina			todas
Oxidasa			3038

Cada una por separado, las cepas identificadas como *M. kristinae* y adscritas a los perfiles I y II (tabla VII.1) eran muy similares al perfil bioquímico mostrado por el esquema abreviado de Schleifer y col (1981), excepto en lo referente a las pruebas que se muestran en la tabla VII.5. Por el contrario, mostraban características muy variables entre sí. Las cepas 2243 (perfil II), 1221 (perfil II) y 2257 (perfil I) fueron sensibles a la furazolidona.

Tabla VII.5. Características variables de las cepas identificadas como *M. kristinae*.

Prueba	Cepas					Prokaryotes*
	2257	1221	2434	2243	2527	
Ácido glucosa (aerobiosis)	+	+	+	-	+	+
Reducción de nitratos	-	-	+	-	+	-
Hidrólisis de la esculina	-	-	+	+	-	+
Ácido de manosa	+	-	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	+	+	+	+

*, resultados observados en el esquema abreviado (Schleifer y col, 1981).

Las cepas de *Micrococcus* no identificadas a nivel de especie (315 y 2241), además de pertenecer al perfil II (tabla VII.1) diferían del patrón bioquímico del resto de las cepas de *M. luteus*, entre otras, en que la 315 era sensible a la furazolidona y la 2241 fermentaba la manosa e hidrolizaba la arginina.

Ninguna de las cepas ambientales adscritas al género *Staphylococcus* manifestó actividad coagulasa. Según el esquema de puntuación de Turner y Schwartz (1958), únicamente dos tubos obtuvieron una puntuación de 1, pero no fueron considerados como positivos. El resto fueron puntuados con un 0. Por el contrario, la cepa tipo de *S. aureus* (ATCC 25923) sí fue capaz de coagular el suero de conejo, obteniendo una puntuación de 4 en dicho esquema. Por otro lado, ninguna de las cepas creció en presencia de furazolidona.

Las cepas de estafilococos incluidas en los perfiles V y VI (tabla VII.1) y que resultaron ser sensibles a la novobiocina se subdividieron en dos grandes grupos. Por un lado, aquéllas que eran negativas para la prueba de la oxidasa y que presentaban dificultades para crecer en condiciones de aerobiosis (no crecían en la porción aerobia del medio de tioglicolato). Por otro lado, las cepas que eran oxidasa negativas.

Las primeras, que se adscribieron a las especies *S. saccharolyticus* y *S. auricularis* (Perfil VI en la tabla VII.1), presentaron un perfil bioquímico y fisiológico que difería, en muy pocas pruebas, del mostrado por Kloos (1990) y por el Manual de Bergey (Kloos y Schleifer, 1986) para ambas especies. Así, y al igual que en dichos esquemas, las cepas adscritas a *S. saccharolyticus* crecían débilmente a 15°C, no eran hemolíticas, no fermentaban la sacarosa ni el manitol y daban lugar a colonias de tamaño reducido cuando crecían en la superficie de un medio sólido. En la tabla VII.6 se muestran las pruebas para las cuales las cepas adscritas a esta especie dieron lugar a resultados variables con respecto a los perfiles mostrados en el Manual de Bergey para *S. saccharolyticus*, si bien dichas pruebas son de escaso valor taxonómico. La cepa adscrita a *S. auricularis* mostró, también, un patrón bioquímico muy parecido al descrito por Kloos y Schleifer (1986), siendo incapaz de fermentar la sacarosa y el manitol y de hidrolizar la arginina y, a diferencia de las cepas adscritas a *S. saccharolyticus*, fue capaz de producir ácido a partir de la trealosa y de reducir los nitratos a nitritos.

Tabla VII.6. Pruebas en las que las cepas adscritas a *S. saccharolyticus* dieron lugar a resultados variables.

Pruebas	Cepas							Bergey*
	1533	1534	1636	1664	1696	1697	2153	
Crecimiento a 45°C	+	-	+	-	-	-	+	+
Ácido de lactosa	+	+	+	-	+	+	-	-
Ácido de maltosa	+	+	+	-	+	-	-	-
Hidrólisis arginina	+	+	-	-	-	-	-	+

*, resultados observados en el esquema de Kloos y Schleifer (1986).

La cepa 53, adscrita al perfil V (tabla VII.1), presentaba un patrón bioquímico muy similar a *S. saccharolyticus*, pero al no fermentar la glucosa en condiciones anaerobias no fue finalmente identificada a nivel de especie.

Las cepas que fueron adscritas a la especie *S. caseolyticus*, incluidas en los perfiles IV y V, eran asimismo sensibles a la novobiocina y, a diferencia de *S. saccharolyticus*, oxidasa positivas. Al igual que en *S. saccharolyticus*, los patrones bioquímicos que exhibieron fueron bastante similares a los señalados por Kloos (1990) y a los que aparecen en el Manual de Bergey (Kloos y Schleifer, 1986) correspondientes a *S. caseolyticus*, con las excepciones que aparecen en la tabla VII.7, además de la incapacidad para fermentar la glucosa anaeróticamente por parte de las cepas 1670 y 3013 (tabla VII.1).

Tabla VII.7. "Tests" para los cuales las cepas adscritas a *S. caseolyticus* dieron lugar a resultados variables.

Pruebas	Cepas					Bergey*
	1228	1245	1202	1670	3013	
Crec. aerobiosis	-	-	-	+	+	+
Ácido de fructosa	+	+	+	-	+	+
Ácido de ribosa	-	-	-	-	-	+
Ácido de xilosa	-	-	-	-	+	-

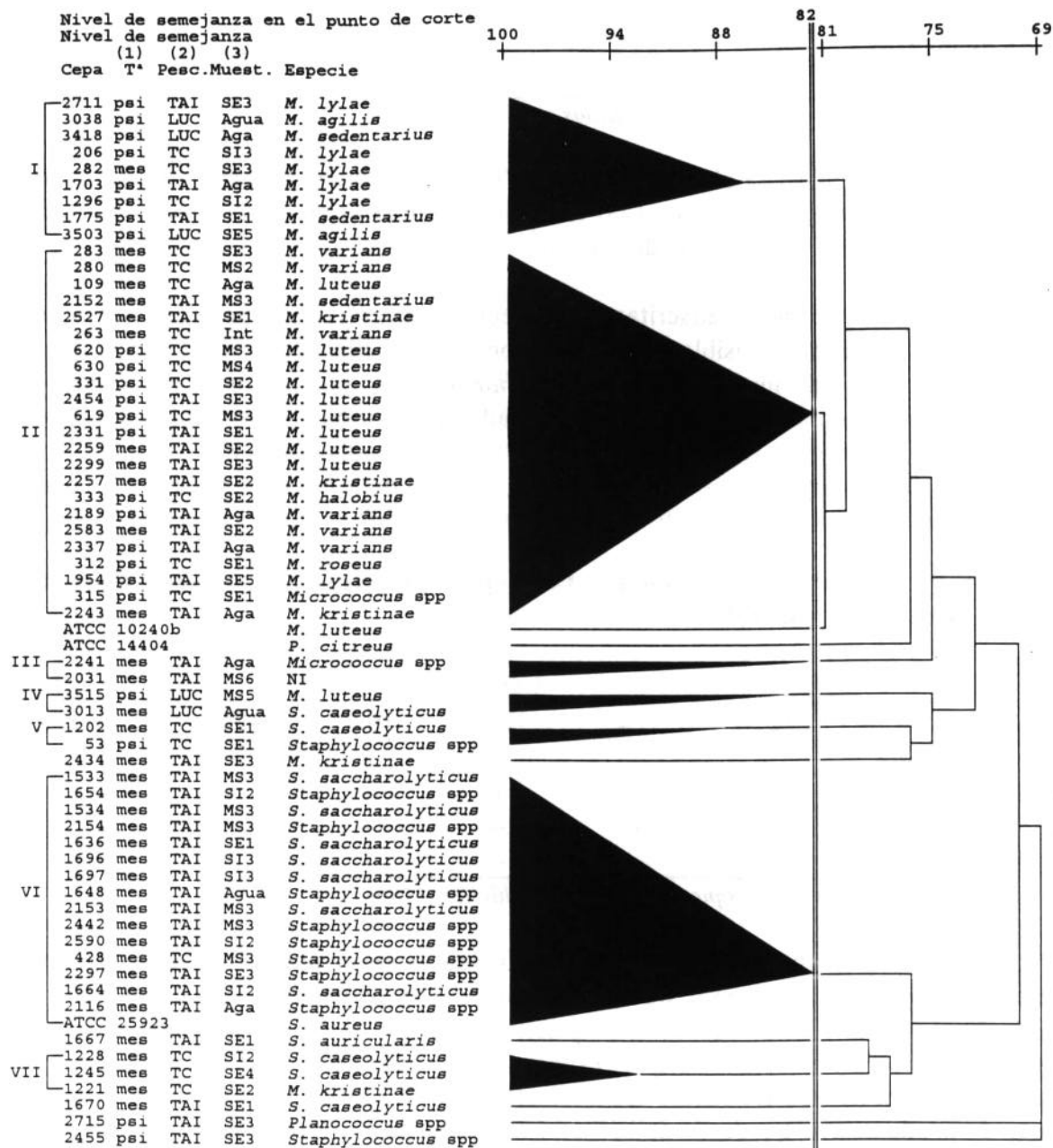
*, resultados observados en el esquema de Kloos y Schleifer (1986).

Finalmente, cabe decir que las cepas incluidas en el perfil III fueron adscritas al género *Staphylococcus* a pesar de ser resistentes a la lisostafina. Las cepas 428, 1648, 2154, 2297, 2442 y 2590 presentaron perfiles similares a los de las cepas identificadas como *S. saccharolyticus*. Por lo que respecta a las cepas 1654 y 2116, se puede decir lo mismo que para las anteriormente mencionadas, con la salvedad de que la primera no era capaz de producir ácido a partir de la fructosa, mientras que la segunda era productora de ácido a partir de la trealosa, en ambos casos en condiciones aerobias.

Análisis numérico.

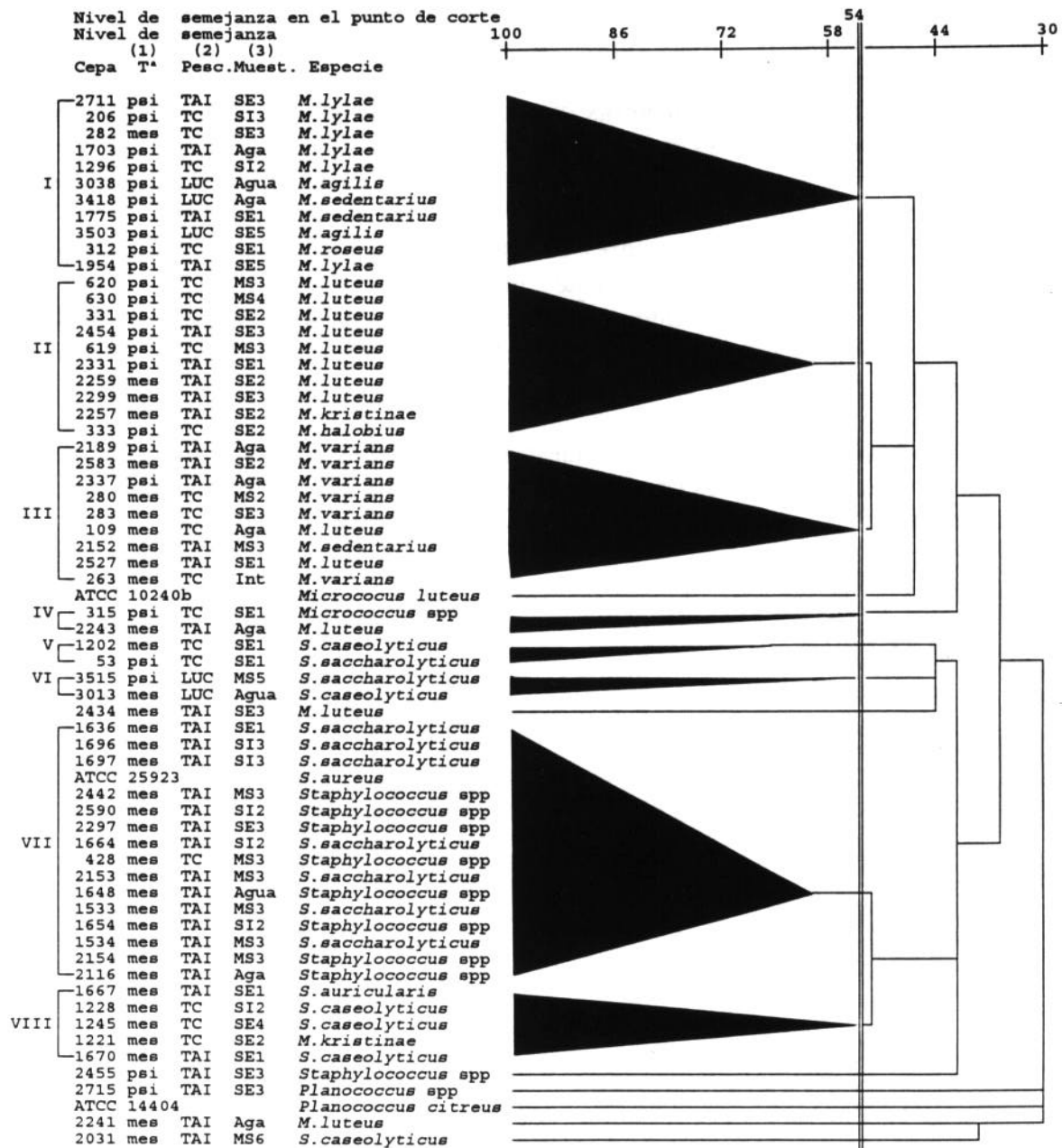
Las figuras VII.1 y VII.2 muestran los taxones y el patrón de agrupamiento de las cepas incluidas en el estudio empleando dos coeficientes de semejanza distintos (S_{SM} -figura VII.1- y S_j -figura VII.2-).

Figura VII.1. Distribución (y datos relativos a su origen) de 61 cepas de micrococáceas aisladas de peces de agua dulce en el dendrograma formado a un nivel de semejanza del 82% (S_{SM}) y realizando el agrupamiento por el procedimiento UPGMA.



(1) T*, grupo del que fueron aisladas (mes, mesófilos; psi, psicrotrofos); (2) Pesc., especie de pescado en la que fueron aisladas (TC, trucha común; TAI, trucha arco iris; LUC, lucio); Muest., muestra (SE, piel; SI, cavidad abdominal; MS, tejido muscular; Aga, agallas; Int, intestino).

Figura VII.2. Distribución (y datos relativos a su origen) de 61 cepas de micrococáceas aisladas de peces de agua dulce en el dendrograma formado a un nivel de semejanza del 54% (S) y realizando el agrupamiento por el procedimiento UPGMA.



(1) T*, grupo del que fueron aisladas (mes, mesófilos; psi, psicrotrofos); (2) Pesc., especie de pescado en la que fueron aisladas (TC, trucha común; TAI, trucha arco iris; LUC, lucio); Muest., muestra (SE, piel; SI, cavidad abdominal; MS, tejido muscular; Aga, agallas; Int, intestino).

De las 64 cepas, 57 se agruparon en siete (empleando el coeficiente S_{SM} a un 82% de semejanza) y ocho (empleando el coeficiente S_J a un 54% de semejanza) taxones. Tal y como puede verse en la figura VII.2 (S_J), cinco de los nueve taxones estaban formados por más de tres cepas (grupos significativos), conteniendo, uno de ellos (el taxón siete), una de las cepas patrón empleadas en este estudio.

En ambos casos siete cepas permanecieron sin agrupar: una cepa adscrita al género *Planococcus*, una a la especie *M. luteus*, una a *M. kristinae*, una a *Staphylococcus* spp. y la cepa tipo *Planococcus citreus* ATCC 14404 en ambos dendrogramas; empleando el coeficiente S_{SM} permanecieron sin agruparse, además, una cepa de *S. auricularis* y otra de *S. caseolyticus* (figura VII.1), mientras que con el coeficiente S_J también lo fueron una cepa de *Micrococcus* spp. y la cepa no identificada (figura VII.2).

El coeficiente cofenético r correspondiente al análisis numérico en el que se empleó el coeficiente de similitud S_{SM} fue 0.84757, mientras que el correspondiente al coeficiente de similitud S_J fue de 0.82164, valores que nos indican que no se produce distorsiones significativas de la matrices triangulares de similitudes.

Todas las cepas fueron universalmente negativas para la producción de ácido a partir de los siguientes azúcares: dulcitol, *meso*-inositol, melibiosa, rafinosa, ramnosa, D-ribosa y xilitol.

En las tablas VII.8 y VII.9 se muestran las pruebas más discriminantes entre los taxones mayoritarios obtenidos con uno y otro coeficiente (S_{SM} y S_J) respectivamente, así como algunos otros “tests” de interés desde el punto de vista taxonómico.

Tabla VII.8. Perfil bioquímico, morfológico y fisiológico de los taxones significativos obtenidos con el coeficiente S_{sm} (figura VII.1).

Taxones mayoritarios	I	II	VI	VII
Número de cepas	9	23	16	3
Pruebas				
Oxidasa	66*	13	0	100
Ácido de glucosa (aerobiosis):				
Medio tradicional	11	9	28	0
Medio "Subcommittee..." †	12	54	100	100
Ácido de glucosa (anaerobiosis)				
Medio tradicional	0	0	16	0
Medio "Subcommittee..."	0	4.3	100	0
Pigmento:				
amarillo	0	78	6	0
naranja	0	8	25	100
Diámetro de colonia:				
1-2 mm	0	73	56	0
2-3 mm	55	21	43	0
>3mm	44	4	0	100
Reacciones en Baird Parker:				
Proteolisis	0	0	12	100
Reducción del telurito	11	8	100	100
Crecimiento:				
a 10°C	100	91	0	100
en 15% NaCl	0	4	100	0
en anaerobiosis	0	8	100	100
en aerobiosis	88	82	0	0
Voges Proskauer	0	0	93	66
Resistencia a la lisostafina	100	100	50	33
Prod. de ácido a partir de:				
D-fructosa	0	8	93	100
Maltosa	0	4	75	100
Trealosa	0	0	12	100
Glicerol + eritromicina	0	0	70	0
Hidrólisis del Tween 80	100	30	62	0

*, porcentaje de cepas que dieron lugar a una respuesta positiva para la prueba; †, medio recomendado por el "Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci".

Tabla VII.9. Perfil bioquímico, morfológico y fisiológico de los taxones mayoritarios obtenidos con el coeficiente S_j (figura VII.2).

Taxón	I	II	III	VII	VIII
Número de cepas	11	10	9	16	5
Pruebas					
Oxidasa	63	0	22	0	80
Ácido de glucosa (aerobiosis):					
Medio tradicional	9	0	22	28	25
Medio "Subcommittee..." †	20	50	55	100	100
Ácido de glucosa (anaerobiosis)					
Medio tradicional	0	0	0	6	0
Medio "Subcommittee..."	0	0	0	100	20
Pigmento amarillo	0	80	88	6	0
Diámetro de colonia:					
1-2 mm	18	100	33	56	0
2-3 mm	45	0	55	43	0
>3mm	36	0	11.1	0	80
Reacciones en Baird Parker					
Proteolisis	0	0	0	12	100
Reducción del telurito	9	0	22	100	100
Crecimiento:					
a 10°C	100	90	100	0	100
en 10% NaCl	45	0	33	100	100
en 15% NaCl	0	0	11	100	40
en anaerobiosis	0	0	0	100	80
en aerobiosis	72	100	100	0	20
Utilización del citrato	72	0	77	0	20
Voges Proskauer	0	0	0	93	40
Reducción de nitratos	60	0	22	100	80
Resistencia a la lisostafina	100	100	100	50	20
Prod. de ácido a partir de:					
D-fructosa	0	0	22	93	80
Maltosa	0	0	11	75	100
Trealosa	0	0	0	12	100
Glicerol + eritromicina	0	0	0	70	0
Hidrólisis del Tween 20	100	30	0	87	80

*, porcentaje de cepas que dieron lugar a una respuesta positiva para la prueba; †, medio recomendado por el "Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci".

Las especies incluídas en los grupos obtenidos con el coeficiente S_j (figura VII.2), así como sus características comunes (teniendo en cuenta los resultados expuestos en la tabla VII.9) se describen a continuación:

El taxón I contenía un total de once cepas, de las cuales seis fueron identificadas como *M. lylae*, dos como *M. sedentarius*, una como *M. roseus* y dos como *M. agilis*. El perfil fisiológico y bioquímico de este grupo era heterogéneo (Tabla VII.9). Entre las características más significativas cabe destacar que, a excepción de una cepa, fueron incapaces de crecer en el medio que contenía furazolidona. Ninguna de las cepas incluídas en este taxón fue capaz de producir ácido a partir de los azúcares ensayados (con excepción de la glucosa en casos aislados), ni de crecer en un medio conteniendo un 15% de NaCl. Las características generales de este grupo (Tabla VII.9), con excepción de la utilización del citrato como única fuente de carbono, eran las de *M. lylae* (Schleifer y col, 1981).

Taxón II. En él se incluyeron 10 cepas que se adscribieron al género *Micrococcus*. Ocho de ellas fueron identificadas como pertenecientes a la especie *M. luteus*, una como *M. kristinae* y, la última, como *M. halobius*. Este taxón se mostró más homogéneo que el anterior en cuanto a sus propiedades (Tabla VII.9). Todas las cepas daban lugar a colonias menores de 1 mm, eran oxidasa negativas, resistentes a la lisostafina y no utilizaron el citrato como única fuente de carbono. Ninguna de ellas redujo los nitratos a nitritos, ni utilizó el citrato como única fuente de carbono, así como tampoco fueron capaces de producir ácido a partir de los azúcares, a excepción de la glucosa y de la lactosa. Las cepas identificadas como *M. luteus* produjeron pigmento amarillo y todas, a excepción de una cepa de esta misma especie (2331), fueron resistentes a la furazolidona. Teniendo en cuenta todas estas propiedades, se observaba que este grupo presentaba características típicas de *M. luteus*, con la excepción de la prueba de la oxidasa (Schleifer y col, 1981).

El taxón III incluía un total de nueve cepas, de las cuales seis fueron identificadas como *M. varians*, una como *M. luteus*, una como *M. kristinae* y otra como *M. sedentarius*. Todas produjeron pigmento amarillo en medio sólido (excepto la cepa de *M. sedentarius*), eran resistentes a la lisostafina, a la lisozima y a la furazolidona (salvo la cepa de *M. sedentarius* a estas dos últimas). En este mismo grupo se englobaban cepas (Tabla VII.9) que eran capaces de producir ácido a partir de un número mayor de azúcares que en los dos taxones anteriores. Otra característica a tener en cuenta desde el punto de vista de la clasificación fue su incapacidad para hidrolizar el Tween 20. Al igual que en caso del taxón II, que se adscribía a la especie *M. luteus*, el taxón III se identifica, al tener muchas propiedades comunes, con la especie *M. varians* (Schleifer y col, 1981). Tal y como se observa en la figura VII.2 este grupo confluye con el taxón II a un nivel de similitud (S_j) del 50%, dando lugar a un supertaxón que coincide, tal y como veremos más adelante, con el grupo formado a un nivel de semejanza del 82% (S_{SM}) que se observa en la figura VII.1.

Entre los caracteres más constantes que se pueden apreciar en los tres grupos anteriores, y que son de un mayor valor desde el punto de vista taxonómico (Tabla VII.9), destacan su incapacidad para producir ácido a partir de la glucosa anaeróticamente, su incapacidad de crecer en anaerobiosis en el medio del tioglicolato de Brewer y su carácter psicrotrofo, ya que son capaces de desarrollarse a 10°C.

El taxón VII contiene dieciséis cepas, entre ellas siete adscritas a la especie *S. saccharolyticus*, la cepa tipo de *S. aureus* y ocho cepas de *Staphylococcus* no identificadas a nivel de especie (*Staphylococcus* spp.). Todas las cepas fermentaban la glucosa y crecían en anaerobiosis en el medio de Brewer, pero diferían en su sensibilidad a la lisostafina, tal y como se aprecia en la tabla VII.9. Las cepas de *Staphylococcus* no identificadas a nivel de especie eran resistentes a la lisostafina, mientras las cepas de la especie *S. saccharolyticus* y la cepa tipo de *S. aureus* eran sensibles a dicha enzima (Tabla VII.3). Todas ellas fueron incapaces de crecer en el medio que contenía furazolidona y de desarrollarse a 10°C, pero redujeron el telurito en el medio Baird Parker, crecieron en presencia de concentraciones del 15% de NaCl, redujeron los nitratos a nitritos y mostraron actividades lipolíticas y proteolíticas muy marcadas. Otra de sus características más significativas fue la capacidad para fermentar distintos azúcares. Por último, y en referencia a la adscripción a especie de este taxón, cabe decir que fue identificado como *S. saccharolyticus*, no sólo por que incluía a cepas de esta especie, sino debido a que, asimismo, contenía a cepas pertenecientes al perfil III (tabla VII.1) con propiedades muy similares a las de *S. saccharolyticus*, aspecto al que hemos hecho referencia anteriormente al tratar la identificación clásica de estas cepas.

El taxón VIII engloba a tres cepas de *S. caseolyticus*, una de *S. auricularis* y una de *M. kristinae*. Éste es un grupo muy heterogéneo que comprende a cepas oxidasa negativas, capaces de fermentar la glucosa anaeróticamente (*S. auricularis*), y sensibles a la lisostafina (excepto *M. kristinae*). Entre las características comunes, y diferenciales con respecto a otros taxones, destacan su capacidad para reducir el telurito potásico (colonias negras en el medio de Baird Parker), de crecer a 10°C y de producir ácido a partir de la maltosa y la trealosa en condiciones aerobias (Tabla VII.9). Debido a la disparidad existente entre las propiedades de las distintas cepas incluidas en este taxón, no se le asignó ningún nombre específico.

Por lo que respecta a las características principales de los otros tres agrupamientos (figura VII.2), formados por menos de tres cepas cada uno, son las siguientes:

El taxón IV contenía una cepa de *M. kristinae* y una de *Micrococcus* que no pudo ser identificada a nivel de especie (*Micrococcus* spp.). Ambas fueron resistentes a la lisostafina y a la furazolidona, si bien *M. kristinae* era capaz de fermentar la glucosa.

El taxón V estaba formado por una cepa *S. caseolyticus* y otra de *Staphylococcus* spp., mientras que el taxón VI comprendía a una cepa de *M. luteus* y otra de *S. caseolyticus*. Todas ellas eran sensibles a la lisostafina, pero la cepa 3515 (*M. luteus*) crecía en un medio conteniendo furazolidona y fermentaba la glucosa.

Los agrupamientos que se obtienen al aplicar el coeficiente S_{SM} (figura VII.1) guardan paralelismo con los conseguidos con el coeficiente S_j (figura VII.2), a los que acabamos de hacer referencia. Así, el taxón I, resultante de aplicar el coeficiente S_{SM} , es similar al I obtenido con el coeficiente S_j , aunque el primero de ellos está constituido por dos cepas menos (*M. roseus* y *M. lylae*) que, en el S_{SM} , aparecen agrupadas en el segundo taxón. Este taxón II (S_{SM}) se corresponde, asimismo, con los grupos II, III y IV hallados con el coeficiente S_j y se agrupa, a un 80% de semejanza, con la cepa tipo de *M. luteus*.

Por lo que se refiere a otro de los taxones significativos obtenidos con el coeficiente S_{SM} , el agrupamiento VI, coincide plenamente en su composición con el grupo VII correspondiente al coeficiente S_j . El último de los grupos significativos obtenidos con el coeficiente S_{SM} , el número VII, proviene de la desmembración del taxón VIII en S_j .

Finalmente, los taxones IV y V en S_{SM} se corresponden con el VI y el V S_j , respectivamente, mientras el taxón III, en S_{SM} aparece compuesto por una cepa de *Micrococcus* spp. y una cepa no identificada a nivel de género.

Distribución de las especies de *Micrococcaceae* en función del punto de muestreo, la especie de pescado y la temperatura de aislamiento.

En la siguiente tabla (VII.10) se pueden observar la relación de cepas de *Micrococcaceae* que fueron aisladas de pescado de agua dulce y su distribución entre las distintas muestras.

Tabla VII.10. Distribución de las especies de *Micrococcaceae* aisladas a partir de pescado de agua dulce en función del punto de muestreo del que se obtuvieron.

Especie	Cepas	Muestra					
		SE ⁽¹⁾	SI ⁽²⁾	Ms ⁽³⁾	Int ⁽⁴⁾	Aga ⁽⁵⁾	AGUA
<i>M. luteus</i>	10*	5		4		1	
<i>M. varians</i>	6	2		1	1	2	
<i>M. lylae</i>	6	3	2			1	
<i>M. kristinae</i>	5	4				1	
<i>M. agilis</i>	2	1					1
<i>M. sedentarius</i>	3	1		1		1	
<i>M. halobius</i>	1	1					
<i>M. roseus</i>	1	1					
<i>Micrococcus</i> spp.	2	1				1	
<i>S. saccharolyticus</i>	7	1	3	3			
<i>S. caseolyticus</i>	5	3	1				1
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	3	2	3		1	1
<i>S. auricularis</i>	1	1					
<i>Planococcus</i> spp.	1	1					
No identificada	1	1					

⁽¹⁾, SE, piel; ⁽²⁾, SI, superficie de la cavidad abdominal; ⁽³⁾, Ms, tejido muscular; ⁽⁴⁾, Int, intestino; ⁽⁵⁾, Aga, agallas; *, número de cepas adscritas a cada especie.

A continuación (tabla VII.11), se muestra la distribución de las especies de micrococáceas entre las especies de pescado de las que fueron aisladas y en función de la temperatura de aislamiento.

Tabla VII.11. Distribución de las especies de Micrococcaceae en función de la especie de pescado y del grupo fisiológico (mesófilo/psicrotrofo) de origen.

Especie microbiana	Cepas	Especie de pescado		Grupo fisiológico		
		TC ⁽¹⁾	TAI ⁽²⁾	LUC ⁽³⁾	Mes ⁽⁴⁾	Psi ⁽⁵⁾
<i>M. luteus</i>	10*	5	4	1	3	7
<i>M. varians</i>	6	3	3		4	2
<i>M. lylae</i>	6	3	3		1	5
<i>M. kristinae</i>	2	1	4		5	
<i>M. agilis</i>	2			2		2
<i>M. sedentarius</i>	3		2	1	1	2
<i>M. halobius</i>	1	1				1
<i>M. roseus</i>	1	1				1
<i>Micrococcus</i> spp.	2	1	1		1	1
<i>S. sacchalolyticus</i>	7		7		7	
<i>S. caseolyticus</i>	5	3	1	1	5	
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	2	8		8	2
<i>S. auricularis</i>	1		1		1	
<i>Planococcus</i> spp.	1		1			1
No identificada	1		1		1	
TOTAL	61	20	36	5	37	24

⁽¹⁾, TC, trucha común; ⁽²⁾, TAI, trucha arco iris; ⁽³⁾, LUC, lucio; ⁽⁴⁾, Mes, flora aerobia mesófila viable; ⁽⁵⁾, Psi, flora aerobia psicrotrofa viable; *, número de cepas adscritas a cada especie.

En la tabla VII.12 se muestran las aptitudes proteolíticas, lipolíticas y desoxirribonucleasa de las cepas de micrococáceas aisladas contenidas en los taxones significativos obtenidos con el coeficiente S_j (figura VII.2).

Tabla VII.12. Actividades hidrolíticas sobre distintos sustratos por parte de miembros de la familia Micrococcaceae aislados de peces de agua dulce.

Sustrato	Taxón†				
	I	II	III	VII	VIII
Tween 20	100*	30	0	87	80
Tween 60	100	40	11	93	40
Tween 80	91	60	0	87	80
Tributirina	91	40	66	100	100
Lecitinasa	63	10	100	25	80
Yema de huevo	54	0	0	25	0
Gelatina	0	30	44	87	33
Caseína	0	0	78	69	60
ADN	18	50	44	100	100

†, taxón del análisis numérico (coeficiente S_i, figura VII.2); *, *porcentaje de cepas positivas para dicha prueba.*

DISCUSIÓN

Estudio taxonómico a nivel de género.

Ninguna de las cepas aisladas fue adscrita al género *Stomatococcus*. De este modo, todas las cepas que produjeron ácido a partir de la glucosa, identificadas como pertenecientes al género *Staphylococcus*, fueron capaces de crecer a concentraciones salinas del 5%, a la cual no se desarrolla *Stomatococcus* (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992). Para no adscribir al género *Stomatococcus* las cepas que fueron resistentes a la lisostafina se empleó, como criterio adicional, la producción de ácido a partir de la trealosa y la prueba del Voges Proskauer (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992), ambas negativas para dichas cepas.

La adscripción a género de la cepa 2715 (*Planococcus* spp) se hizo en virtud de su movilidad y de su morfología en medio sólido, a pesar de no poseer algunas de las características descritas para este género microbiano (Kocur y Schleifer, 1981), y de agruparse con la cepa patrón de *P. citreus* a un nivel de semejanza muy bajo (figura VII.2).

De entre las propiedades propuestas en distintos momentos por distintos autores (Anon -“Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci”-, 1965; Evans y Kloos, 1972; Klesius y Schuhardt, 1968) y empleadas en el presente trabajo para diferenciar el género *Staphylococcus* del género *Micrococcus* por métodos bioquímicos han destacado, por su utilidad taxonómica, la capacidad de producir ácido a partir de la glucosa en condiciones de anaerobiosis, la capacidad para desarrollarse en el medio del tioglicolato en condiciones aerobias o anaerobias y la resistencia a la lisostafina, pruebas cuyos resultados aparecen reflejados en la tabla VII.1, en forma de perfiles resultantes de las combinaciones de las tres pruebas.

Ninguno de estos criterios clásicos proporcionó una adscripción al 100% de las cepas identificadas, puesto que siempre había microorganismos que daban reacciones distintas a aquellas características de su género. Así, teniendo en cuenta los resultados de las tablas VII.1 y VII.2, se observa que en nuestro trabajo, empleando el método del OF, se procedía a la adscripción a género de un total de cincuenta y tres cepas. Con la prueba de la sensibilidad a la lisostafina se conseguía dicho objetivo en 50 cepas, mientras que con el crecimiento en anaerobiosis (medio del tioglicolato) esta cifra aumentaba hasta las 52 cepas. Por tanto, con una sola de estas pruebas era posible adscribir a uno de los géneros, al menos, un 89% de las cepas. En cuanto a las posibles combinaciones de dos de las tres pruebas empleadas, resulta interesante apreciar que la combinación de la fermentación de la glucosa con el crecimiento en anaerobiosis resulta en la adscripción a género de 48 cepas (81% del total), mientras que cuando una de las dos pruebas elegidas es la sensibilidad a la lisostafina, sólo se adscriben 43 ó 44 cepas. Considerando únicamente aquellos perfiles en los cuales las tres pruebas correspondían al género al que fueron finalmente adscritos (perfiles I y VI), tan sólo 39 cepas (66%) podían ser clasificadas correctamente.

El “test” OF (para detectar la producción aeróbica y/o anaeróbica de ácido a partir de la glucosa) mostró diferencias en la respuesta de las cepas en función del medio empleado (tablas VII.8 y VII.9). Así, el medio con púrpura de bromocresol como indicador (recomendado por el “Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci” -1965-) fue más sensible que el medio tradicional de Hugh y Leifson (1953). Con el medio OF con

púrpura de bromocresol, por sí solo, se han podido distinguir la mayor parte de las cepas contenidas en el presente estudio, en concordancia con lo afirmado por Kloos (1982). De todos modos, Venugopal y col (1994), aunque afirman que se trata de un método útil para diferenciar ambos géneros microbianos, opinan que la diferenciación entre ellos no puede depender únicamente de él. Nuestros datos confirman la hipótesis de De la Rosa (1990) acerca del carácter definitivo del “test” OF para la diferenciación de estafilococos y micrococos de origen distinto al humano. La prueba de crecimiento en el medio del tioglicolato es considerada, en principio, como más restrictiva que la de producción de ácido a partir de la glucosa, aunque tampoco confirma del todo la adscripción a género (De la Rosa, 1990; Venugopal y col, 1994), pero en nuestro caso se ha mostrado, únicamente, igual de eficaz que la prueba de la resistencia a la lisostafina en la identificación de las *Micrococcaceae* estudiadas. Esta última prueba a la que nos acabamos de referir (resistencia a la lisostafina) se mostró útil para diferenciar ambos géneros, con la excepción del pequeño grupo de cepas que se identificaron, finalmente, como *Staphylococcus* spp (Perfil III). Algunos autores tampoco lo consideran un “test” muy efectivo (Venugopal y col, 1994).

Los perfiles I y VI (tabla VII.1) son, respectivamente, los perfiles tradicionalmente característicos de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*, mientras que los perfiles II, IV y V se corresponden con cepas que, pertenecientes a uno de los dos géneros microbianos, difieren en una de las tres propiedades que se han venido considerando como de mayor valor taxonómico. Diversos autores han descrito, también, el aislamiento de cepas con propiedades intermedias entre micrococos y estafilococos y que resultan en una separación complicada (De la Rosa y col, 1990). Así, en las cepas adscritas al perfil II, correspondiente al género *Micrococcus*, hemos apreciado la existencia de cepas (identificadas como *M. kristinae*), capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis en el medio del tioglicolato, tal y como han observado otros autores (Schleifer y Kloos, 1976). Las cepas contenidas en los perfiles IV y V fueron adscritas al género *Staphylococcus* (tabla VII.1) a pesar de ser incapaces de fermentar la glucosa en condiciones de anaerobiosis, ya que fueron sensibles a la lisostafina y, además, las cepas del perfil V crecieron en anaerobiosis. Este fenómeno ha sido observado anteriormente por otros investigadores que han identificado cepas de este mismo género que tampoco eran capaces de producir ácido anaeróticamente, pero que eran sensibles a la lisostafina (Schleifer y Kloos, 1976). Para conseguir la adscripción a género de las cepas muy dudosas (perfil III), nos vimos obligados a recurrir a otras pruebas, tales como la producción de ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina, que hizo posible su adscripción al género *Staphylococcus*, ya que todas ellas fueron capaces de fermentar dicho polialcohol. De todos modos, esta prueba no es del todo confirmatoria, ya que, por un lado, no todas las cepas de *Staphylococcus* dan lugar a ácido en este medio (García y col, 1988; Schumacher y col, 1985) y, por otro lado, se puede observar en el estudio de Venugopal y col (1994) que también existen cepas de *Micrococcus* capaces de fermentar el glicerol en presencia de eritromicina. Estas mismas cepas (las contenidas en el perfil III) mostraron características intermedias entre *Micrococcus* y *Staphylococcus*, pero se encuentran más próximas a *Staphylococcus*. Además, poseyeron la capacidad de fermentar un mayor número de azúcares que las cepas adscritas al género *Micrococcus* (tablas VII.8 y VII.9).

Por lo que respecta a otro de los “tests” que han sido propuestos para la diferenciación entre micrococos y estafilococos, la resistencia a la furazolidona (Von Rheinbaben y Hadlock, 1981), hemos observado resultados desiguales entre las distintas cepas de *Micrococcus*, en teoría resistentes a este antibiótico, si bien ninguna de las cepas adscritas al género *Staphylococcus*, tal y como se esperaba, fue capaz de crecer en presencia de dicho compuesto.

Schumacher y col (1985) detectaron que algunas cepas de *M. agilis* fueron sensibles a la furazolidona. Venugopal y col (1994) consideraron que la resistencia a la furazolidona fue un método útil para diferenciar los estafilococos de los micrococos.

En los análisis de taxonomía numérica llevados a cabo se observa que con ambos coeficientes empleados (S_{SM} y S_J) se consiguió una separación bastante aceptable entre micrococos, estafilococos y *Planococcus* spp (figuras VII.1 y VII.2). Desde un punto de vista práctico, para la distinción entre las cepas adscritas a los tres géneros anteriormente citados, tal vez el coeficiente S_J sea más eficaz, ya que a un 40% de semejanza consigue un agrupamiento homogéneo en el se incluyen la mayor parte de las cepas de *Micrococcus* por un lado y, a ese mismo nivel de corte, otro bloque, menos homogéneo al contener cepas del género *Micrococcus*, que incluía la totalidad de las cepas adscritas al género *Staphylococcus*. Por otro lado, para el coeficiente S_{SM} se logra la formación de agrupamientos menos homogéneos, con respecto al coeficiente S_J , conforme disminuye el nivel de semejanza. De este modo, los taxones IV y V (conteniendo cepas de *Staphylococcus*) se agrupan con los taxones que incluyen a la mayoría de las cepas de *Micrococcus*, a un nivel de semejanza mayor (75%) que con el grupo mayoritario de *Staphylococcus* (taxón VI), así como con la cepa tipo de *Planococcus* spp (figura VII.1). Molitoris y col (1989) obtenían resultados similares al aplicar los coeficientes S_{SM} y S_J a un mismo grupo de microorganismos. En nuestro estudio también se observa que, fenotípicamente, las cepas pertenecientes al género *Planococcus*, especialmente la de origen ambiental, aparecen muy separadas con respecto a las cepas de los otros dos géneros aislados, especialmente con el coeficiente S_J y posiblemente debido a la existencia de muchos resultados negativos en los perfiles mostrados por estas cepas, ya que empleando el coeficiente de S_{SM} (en el que sí se tienen en cuenta los resultados negativos) y tal y como acabamos de mencionar, la cepa tipo de *P. citreus* se agrupa a un 76% con el supertaxón de *Micrococcus*. Goodfellow y col (1981) observaron, al clasificar estafilococos coagulasa negativos, que con ambos coeficientes (S_J y S_{SM}) se obtenían clasificaciones numéricas muy similares, pero la influencia de la inclusión de los resultados negativos se manifestó en la distinta composición de los agrupamientos logrados con el coeficiente S_{SM} .

Otra de las razones por las cuales las cepas contenidas en el Perfil III fueron adscritas al género *Staphylococcus*, además de por lo anteriormente expuesto y relativo a los resultados de las pruebas bioquímicas, consistía en que dichas cepas se agruparon con otras cepas adscritas a este género (contenidas en el perfil VI) a un nivel de semejanza alto (64% S_J - figura VII.2-). Otros autores asignaron a especie cepas no identificadas por métodos tradicionales tras su adscripción a taxones resultantes del análisis numérico ya definidos (Prieto y col, 1995).

En el estudio taxonómico de Feltham (1981) también se observó una clara diferenciación entre la mayor parte de las especies de micrococos y los estafilococos. En el caso de las cepas del género *Planococcus* que estudiaron, éstas se situaron más próximas a los micrococos, tal y como se aprecia en la cepa tipo de *P. citreus* al emplear el coeficiente S_J . *M. kristinae*, en ese mismo estudio, se agrupó con miembros del género *Staphylococcus* a un nivel de semejanza más alto que con el resto de los micrococos. En nuestro trabajo, dos de las cinco cepas de *M. kristinae* se agruparon con cepas de estafilococos de modo análogo al mostrado por Feltham (1981).

Identificación y estudio taxonómico a nivel de especie.

El esquema abreviado de Schleifer y col (1981) para identificación de *Micrococcus* no fue lo suficientemente aclaratorio para nuestro propósito, que era la identificación más ajustada posible a nivel de especie de las cepas objeto de estudio empleando, únicamente, “tests” bioquímicos. Aquellas cepas cuya identificación resultó ser menos complicada fueron las de *M. roseus* y *M. halobius*. Por el contrario, las cepas de *M. agilis* fueron adscritas a este género por el hecho de ser móviles, pero diferían del esquema abreviado en muchas de sus pruebas. Por lo que respecta al resto de las especies, con la excepción de *M. kristinae*, los criterios más útiles para su identificación fueron la producción de pigmento amarillo, para distinguir *M. varians* y *M. luteus* del resto de especies, y el uso del citrato como única fuente de carbono para establecer la diferenciación entre estas dos últimas. Por el contrario, pruebas aparentemente clave, como la producción de ácido a partir de glucosa, y la reacción de la oxidasa, no fueron caracteres definitivos en la identificación a nivel de especie de ninguna de las dos, ya que ni siquiera la cepa tipo de *M. luteus* coincidía con su descripción de especie en lo referente a estas dos características. De todos modos, y en ambas especies, su perfil bioquímico no difería, en más de dos pruebas, del perfil del esquema de Schleifer y col (1981). Éste es el caso, también, de *M. sedentarius*, mientras que dos de las seis cepas de *M. lylae* diferían en tres caracteres de dicho esquema. Algunas de las cepas adscritas a la especie *M. kristinae* presentaban unos patrones bioquímicos atípicos en comparación con las otras especies de *Micrococcus*, hecho que se reflejaría en el análisis numérico que se llevó a cabo posteriormente (figuras VII.1 y VII.2), pero fueron bastante similares al del esquema de Schleifer y col (1981).

Otra de las características fenotípicas que llama la atención es que, como se observa en las tablas VII.8 y VII.9, no todas las cepas adscritas al género *Micrococcus* fueron capaces de crecer en condiciones aerobias en el medio del tioglicolato de Brewer. Tal vez pudiera haber ocurrido que, en nuestro caso, el crecimiento en la zona de aerobiosis fuese tan débil que no pudiera ser detectado. De hecho, Evans y Kloos (1972) aprecian que algunas cepas adscritas a este género (pertenecientes a las especies *M. luteus* y *M. roseus*) crecían muy débilmente en ese mismo medio.

Con el coeficiente S_j (figura VII.2) se obtuvo una mejor diferenciación de las especies de micrococos, principalmente debido a que el análisis numérico llevado a cabo con este coeficiente no tiene en cuenta aquellos resultados en los que, cuando dos cepas son comparadas para un mismo “test” (p.e. la producción de ácido a partir de azúcares), ambas son negativas para dicha prueba. Otra de las características coincidentes entre nuestro estudio y el de Feltham (1981) es que las cepas de *M. lylae* y *M. sedentarius* se agruparon a un nivel de semejanza relativamente alto, lo que demuestra una gran proximidad entre ambas especies. Por otro lado, y al contrario que en el estudio de Feltham (1981), en nuestro trabajo las cepas de *M. roseus* y *M. agilis* se agruparon a un nivel alto de semejanza con las de *M. luteus* y *M. varians*. Estas diferencias podrían deberse a que en el trabajo de aquél se emplearon, principalmente, cepas de colección, mientras que en el nuestro fueron clasificadas cepas de origen ambiental. El agrupamiento observado por Feltham (1981) entre las cepas de *M. varians* y *M. luteus* fue similar al de las cepas de estas mismas especies en nuestro estudio. Las tres especies de *Micrococcus* más frecuentes en nuestro estudio (*M. luteus*, *M. varians* y *M. lylae*) han mostrado diferentes interrelaciones genéticas y fenotípicas entre ellas (Schleifer y col, 1981); tal y como puede verse en las figuras VII.1 y VII.2, *M. luteus* y *M. varians* están

más próximas entre sí que con *M.lylae*, pero desde el punto de vista genético, y de acuerdo con Schleifer y col (1981), las dos primeras no parecen estar muy relacionadas.

Por su parte, la identificación de las cepas adscritas al género *Staphylococcus* no fue menos complicada que en el caso anterior debido, principalmente, a las diferencias existentes entre los patrones fenotípicos de dichas cepas y los que se muestran en los esquemas de identificación disponibles. Kloos y Schleifer (1975), por un lado, propusieron que, además de la prueba de la coagulasa, podía ser útil para la diferenciación entre las distintas especies de estafilococos el perfil de fermentación de azúcares. Los azúcares que consideraban más importantes desde este punto de vista fueron: arabinosa, fructosa, lactosa, manitol, maltosa, ribosa, sacarosa, trealosa, xilosa y xilitol. En el presente estudio se ha visto que parte de las diferencias observadas entre las especies identificadas residía en su capacidad de fermentación de azúcares. Pero esto no es, ni mucho menos, lo más significativo en cuanto a la adscripción a especie. Así, pruebas como la sensibilidad a la novobiocina y la oxidasa han resultado ser de gran ayuda para la identificación llevada a cabo en el presente capítulo.

Las cepas identificadas como *S. saccharolyticus* presentaron perfiles bioquímicos similares a los de *S. schleiferi* (Freney y col, 1988) y *S. carnosus* (Kloos y Schleifer, 1986), también sensibles a la novobiocina, oxidasa negativas y no fermentadoras de la manosa, pero, a diferencia de éstas, mostraron ciertas características tales como no crecer en la zona de aerobiosis del medio de tioglicolato de Brewer, dar lugar a colonias de tamaño menor a 1 mm cuando crecían en medio sólido, no ser hemolíticas sobre los eritrocitos de oveja, ni hidrolizar la arginina. También presentaron, asimismo, notables diferencias con respecto a una especie de estafilococos aislada a partir de pescado fresco, *S. piscifermentans* (Tansupawat y col, 1992). En este caso, la clave dicotómica de Hernández Haba y Dubón Pérez (1992) para distinguir a los miembros de este género microbiano se mostró de mucha utilidad.

Por el contrario, esta misma clave (Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992) nos podía haber llevado a la confusión en la cepa de *S. auricularis* ya que, siguiendo sus indicaciones, la habríamos identificado como *S. schleiferi* o como *S. carnosus*: esto fue debido a que *S. auricularis*, en esta clave, aparece descrita como fermentadora de la sacarosa, mientras que en la descripción del Manual de Bergey (Kloos y Schleifer, 1986) se incluyen, dentro de esta especie, a cepas tanto fermentadoras como no fermentadoras de la sacarosa.

Por lo que respecta a las cepas adscritas a la especie *S. caseolyticus*, cabe decir que, en este caso también, la clave de Hernández Haba y Dubón Pérez (1992) fue de mucha utilidad, aunque englobase a cepas con perfiles de fermentación de azúcares variados.

El taxón que contenían la mayor parte de los estafilococos era estable en ambos métodos numéricos de clasificación, así como el taxón no significativo que incluía las cepas 53 y 1202, mientras que el otro grupo significativo, simplemente variaba de un método a otro en dos cepas, una de *S. caseolyticus* y otra de *S. auricularis*. También puede verse (figuras VII.1 y VII.2) que existe una fuerte relación entre la mayor parte de las cepas de *Staphylococcus*, a pesar de los diferentes perfiles bioquímicos obtenidos con las pruebas clásicas.

Ecología de las micrococáceas.

En la tabla VII.10 se observa que los representantes del género *Micrococcus*, y principalmente *M. luteus*, suponen la mayor parte de los cocos Gram positivos aislados del

pescado. Por lo que se refiere a la distribución de las cepas entre las muestras estudiadas y que se puede apreciar en esa misma tabla, cabe decir que la mayor parte de los micrococcos fueron aislados en la piel (28 cepas, representantes de todas las especies identificadas), mientras que únicamente tres fueron detectadas en el agua. La piel es la zona del pescado en la cual distintos autores han aislado, con mayor frecuencia, representantes de este género microbiano (Abo Elnaga, 1980; Acuff y col, 1984; Gennari y Tomaselli, 1988; Horsley, 1973), si bien han sido también aislados a partir de las agallas (Evelyn y McDermott, 1961; Gennari y Tomaselli, 1988), del intestino (Sugita y col, 1992), y del agua dónde se criaban (Acuff y col, 1984). Parece claro que estos microorganismos, tal y como se afirmó en el capítulo IV, pueden tener su origen en el hombre y ser aportados al pescado durante su manipulación. En cuanto a la presencia de micrococáceas en el interior de la masa muscular, ésta podría haber sido debida al arrastre de microorganismos desde la piel durante el proceso de toma de muestras, especialmente en *M. luteus*, *M. varians*, *M. sedentarius* (microorganismos que no crecen en condiciones de anaerobiosis) y *S. saccharolyticus*, especies que no fueron aisladas en el agua de cría del pescado y que, por el contrario, sí se encontraban presentes en su piel. Por lo que respecta al género *Planococcus*, género que se ha visto asociado a enfermedad en alevines de pescado (Austin, comunicación personal), no es extraño su aislamiento puesto que el medio acuático es su hábitat natural, si bien se ha asociado, sobre todo, al agua salada (Kocur y Schleifer, 1981).

En todas las especies de pescado muestreadas se aislaron cepas pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* (tabla VII.11), y en diversos momentos del almacenamiento a refrigeración, excepción hecha de los estadios finales del mismo (figuras VII.1 y VII.2). Tal y como se observa en la tabla VII.11, más de la mitad de las cepas aisladas pertenecientes a esta familia fueron aisladas en truchas procedentes de piscifactoría, hecho que reafirma lo expuesto en anteriores capítulos acerca de la influencia de este sistema de producción intensivo sobre la microbiología del pescado. Austin (1985) afirmó que el uso de compuestos antimicrobianos en piscifactorías podría favorecer la proliferación de microorganismos Gram positivos. Entre las dos especies de trucha se observa una diferencia fundamental: en los ejemplares de trucha arco iris se aisló un número mayor de cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*. De hecho, el 80% del total de las cepas adscritas al género *Staphylococcus* se aislaron de trucha arco iris. En los ejemplares de lucio, por su parte, tan sólo se detectaron cinco cepas de *Micrococcaceae*, muy por debajo de los niveles encontrados en las otras dos especies de pescado. Esto podría ser debido a que los ejemplares de lucio, además de no ser fruto de cría intensiva, fueron objeto de un manejo distinto al de los ejemplares de trucha (ver capítulo I).

Por otra parte, la mayoría de las cepas identificadas como estafilococos (90%) fueron aisladas a partir de placas de Agar Triptona de Soja (Oxoid) empleadas para el recuento de flora aerobia mesófila viable (tabla VII.11), hecho observado anteriormente en otros estudios (Prieto y col, 1995). Por el contrario, algo más de la mitad de los micrococcos aislados se obtuvieron a partir de placas incubadas en condiciones de refrigeración (psicrotrofos). La única cepa del género *Planococcus* identificada fue, asimismo, aislada a temperatura de refrigeración. Si tenemos en cuenta los resultados que aparecen en la tabla VII.9, en los que las cepas contenidas en el taxón VII (S₁), identificadas como pertenecientes al género *Staphylococcus*, no crecían a temperaturas de 10°C, e incluso tan sólo un 37.5% de ellas era capaz de hacerlo a 15°C, podemos concluir que, aunque se aislasen en los recuentos de flora

aerobia mesófila, no podían serlo en los de flora aerobia psicrotrófa, al no ser capaces de desarrollarse a esas temperaturas de incubación. Por tanto tampoco se puede esperar que proliferen de ningún modo en el transcurso del almacenamiento del pescado a no ser que se produzcan “abusos” de temperatura durante el transcurso de dicho almacenamiento.

Desde el punto de vista de la salud pública, el no aislamiento de cepas pertenecientes a especies de micrococáceas de importancia clínica nos hace pensar que, independientemente de la duración del almacenamiento a refrigeración, este tipo de alimento es seguro con respecto a estos microorganismos.

Por otra parte, y teniendo en cuenta su escasa presencia en las últimas etapas del almacenamiento del pescado, parece lógico interpretar que su papel como microorganismos alterantes es muy reducido, a pesar de ser capaces de desarrollar actividades lipo y proteolíticas sobre diversos sustratos (tabla VII.12).

Teniendo en cuenta que el hábitat de *Micrococcus* y *Staphylococcus* es la piel humana (y animal) y que, por dicho motivo, el recuento de *Staphylococcus* es utilizado como indicador de la contaminación de origen humano y de la eficacia de los sistemas de desinfección en piscinas recreativas (APHA, 1984), podría plantearse la utilización de la determinación de micrococáceas en pescado como un indicador de la higiene durante la producción y/o manipulación. En tal sentido, el carácter de mesófilo estricto de la mayor parte de las cepas de *Staphylococcus* y la preponderancia de micrococáceas en la piel de las especies de pescado procedentes de áreas más pobladas (trucha arco iris) ó sometidas a manejo más descuidado (trucha común) apoyan el empleo de dicha determinación.

CAPÍTULO VIII:

ESTUDIO TAXÓNOMICO E IDENTIFICACIÓN CLÁSICA DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

INTRODUCCIÓN

Las bacterias acidolácticas son microorganismos Gram positivos no esporulados, que pueden presentar morfología cocoide, cocobacilar (ovoidea) o bacilar y que dan lugar a ácido láctico como producto final de su metabolismo de los carbohidratos (Axelson, 1993). Los géneros microbianos comprendidos dentro de este grupo y que aparecían en la última edición revisada del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriana (1986) eran los siguientes: *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Con fecha posterior a la edición de este Manual se describió un nuevo género de bacterias acidolácticas dentro de las de morfología cocoide, el género *Tetragenococcus* (Collins y col, 1990). Asimismo, Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) y Schleifer y col (1985) reclasificaron las especies comprendidas en el género *Streptococcus* entre los géneros *Streptococcus* “sensu stricto”, *Lactococcus* y *Enterococcus*.

Siguiendo con las bacterias acidolácticas cocoides, Collins y col (1989) describieron la existencia de unos microorganismos móviles cuyo hábitat principal era el medio acuático (sospechosas de ser responsables de procesos infecciosos en salmónidos) de características semejantes a los llamados “lactobacilos atípicos” y que se agruparon dentro de la especie *Vagococcus fluvialis*. Años más tarde, este mismo grupo de investigadores (Wallbanks y col, 1990) describió una nueva especie microbiana, la cual fue adscrita al género *Vagococcus* (*V. salmoninarum*) que difería de *V. fluvialis*, entre otras propiedades, por su falta de movilidad. Recientemente se han caracterizado cepas inmóviles de *V. fluvialis*, aisladas a partir de lesiones de animales domésticos, lo cual se tradujo en la modificación de la descripción de esta especie (Pot y col, 1994).

Por lo que respecta a las modificaciones que ha sufrido el género *Lactobacillus*, cabe decir que en los últimos años se han descrito una serie de nuevas especies (Axelson, 1993; Hernández Haba y Dubón Pérez, 1992). Thornley y Sharpe, en 1959, realizaron una primera aproximación en su estudio al describir cepas de bacterias acidolácticas de comportamiento poco usual. En este mismo sentido, y principalmente durante los años ochenta, se aislaron cepas de bacterias acidolácticas semejantes a *Lactobacillus* y para las que se acuñó el término “lactobacilos atípicos” (otros autores, como Hitchener y col -1982- emplearon otra nomenclatura, como “estreptobacterias” y “betabacterias atípicas”, para definir las). Los “lactobacilos atípicos” se caracterizaban por su dificultad, e incluso incapacidad, para crecer en medios descritos para el aislamiento de miembros de este género (Hitchener y col, 1982). Así, las cepas de “lactobacilos atípicos”, al ser subcultivados en Agar Acetato (Agar Rogosa - Rogosa y col, 1951-) no daban lugar a colonias visibles, mientras que en Agar MRS (Agar de Man, Rogosa y Sharpe, De Man y col -1960) o no eran capaces de crecer o las colonias a las que daban lugar eran muy pequeñas en comparación con las correspondientes que se desarrollaban en otros medios de cultivo (Agar Nutritivo y TSA). Holzapfel y Gerber (1983) propusieron el nombre de *L. divergens* para agrupar a una serie de “lactobacilos atípicos” que aislaron de carne envasada al vacío. Paralelamente, Shaw y Harding (1984), al realizar un

estudio taxonómico sobre bacterias acidolácticas de carne irradiada, concluyeron que uno de los taxones obtenidos representaba una nueva especie dentro de grupo de las estreptobacterias y lo relacionaron con el llamado “grupo 2 de Thornley y Sharpe”. Estos mismos autores (Shaw y Harding -1985-), a partir de sus estudios previos, describieron la especie *L. carnis* y establecieron las bases para diferenciarla de los representantes de la especie *L. divergens*. En 1984, mientras tanto, Hiu y colaboradores aislaron cepas de lactobacilos atípicos en pescado, a los cuales designaron con el nombre de *L. piscicola*. En 1987, Collins y colaboradores revisaron la posición taxonómica de estas tres especies y, teniendo en cuenta los trabajos simultáneos de Feresu y Jones (1988) con las cepas de los “grupos 2 y 3 de Thornley y Sharpe”, postularon la separación de dichos “lactobacilos atípicos” del género *Lactobacillus* y su inclusión en un nuevo género llamado *Carnobacterium*. Este nuevo género pasó a estar constituido por las siguientes especies: *C. piscicola* (que incluía a las cepas clasificadas como *L. carnis* y *L. piscicola*, así como a parte de las contenidas en el “grupo 2 de Thornley y Sharpe”, todas ellas pertenecientes al mismo grupo de hibridación del ADN), *C. divergens* (que incluía a las cepas conocidas como *L. divergens* y a las cepas restantes del “grupo 2 de Thornley y Sharpe”), *C. gallinarum* y *C. mobile* (que agrupaba a las cepas del “grupo 3 de Thornley y Sharpe”), siendo todas inmóviles con la excepción de la última. Los resultados de los análisis de la fracción 16S del ARN ribonucleico llevados a cabo por Wallbanks y col (1990) concordaban con los obtenidos por hibridación ADN-ARNr y con los resultantes del análisis de ácidos grasos celulares, por lo cual apoyaron el reconocimiento de *Carnobacterium* como un género nuevo y diferente de *Lactobacillus*. Franzman y col (1991) describieron dos nuevas especies dentro de este género, *C. alterfunditum* y *C. funditum*, aisladas en aguas de la Antártida.

Tradicionalmente, la identificación y clasificación de bacterias acidolácticas se ha basado, entre otros, en el estudio de características morfológicas, del crecimiento a diferentes temperaturas y a concentraciones elevadas de sal, así como en el patrón de fermentación de azúcares (Axelson, 1993). Actualmente, el análisis de composición en ácidos grasos, así como la secuenciación del ARN ribosómico, han sido reconocidos como los métodos más precisos para la identificación de este tipo de microorganismos, pero el elevado coste de los equipos necesarios para llevarlos a cabo supone un serio inconveniente en laboratorios de análisis de rutina de alimentos.

Las bacterias acidolácticas se han aislado a partir de una gran variedad de alimentos. En los percederos, tales como la carne, algunas especies de este grupo microbiano han venido siendo consideradas como responsables de su alteración, mientras otras han sido tenidas como flora beneficiosa (Döring y col, 1988). Por otro lado, y durante muchos años, a la presencia de bacterias acidolácticas en pescado fresco (cuyo origen podría ser terrestre - Kandler y Weiss, 1986- por la contaminación de las aguas con efluentes procedentes de los núcleos habitados) no se le dió mucha importancia debido, entre otras razones, al bajo contenido en hidratos de carbono del mismo, hacía pensar en que no era un hábitat ideal para el crecimiento de estos microorganismos. Valdimarsson y Gudbjörnsdóttir (1984) restaron importancia a la limitación de nutrientes como factor anti-bacterias acidolácticas ya que, de hecho, los lactobacilos que ellos aislaron podían obtener su energía a partir de la hidrólisis de la arginina. Por otra parte, los niveles iniciales de bacterias acidolácticas no pasaban de representar un bajo porcentaje de la flora total del pescado, inferior al 10% (Acuff y col, 1984; Pelroy y col, 1967), disminuyendo de manera acusada en los primeros estadios del almacenamiento a refrigeración. Sin embargo, el interés por este grupo microbiano en

pescado fresco ha aumentado considerablemente debido a varios factores. En primer lugar, por la descripción de nuevas especies de bacterias acidolácticas relacionadas con el medio acuático (Baya y col, 1991; Hiu y col, 1984). En segundo lugar, por la utilización de determinados procesos tecnológicos encaminados a prolongar la vida útil de los productos de la pesca (p.e. ahumado y envasado en atmósferas modificadas) los cuales favorecen la multiplicación de estos microorganismos frente al freno que suponen para otra flora mayoritaria en este sustrato (Lannelongue y col, 1982; Oberlender y col, 1983; Okafor y Nzeako, 1985; Stenström, 1985; Valdimarsson y Gudbjörnsdottir, 1984). Y, en último lugar, por la capacidad que tienen algunas bacterias acidolácticas de producir determinados compuestos antimicrobianos, las bacteriocinas, de utilidad para evitar el desarrollo de flora no deseable, patógena (*Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*) o alterante (*Pseudomonas*), en diversos alimentos (Fricourt y col, 1994; Jeppesen y Huss, 1993; Kim y Hearnberg, 1994; Mathieu y col, 1994; Pilet y col, 1995; Schillinger y col, 1993; Stoffels y col, 1992 y 1993). También hay que mencionar que se han aislado bacterias acidolácticas a partir de pescado empaquetado (Dalgaard, 1995).

Los objetivos del trabajo presentado en este capítulo han sido el conocer las especies integrantes de la flora acidoláctica de los peces de agua dulce empleando procedimientos clásicos de identificación (teniendo en cuenta sus características fenotípicas), el establecer, mediante técnicas de taxonomía numérica, la clasificación de dicha flora, así como las relaciones entre los distintos taxones y el evaluar la actividad de esta flora sobre algunos sustratos con vistas a estimar su capacidad alterante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas sometidas a estudio.

En el estudio taxonómico se incluyeron un total de 257 cepas. De éstas, 249 correspondieron a las cepas aisladas a partir de pescado de agua dulce (trucha común, trucha arco iris y lucio) y que reunían las siguientes condiciones (ver capítulo IV): bacterias Gram negativas, oxidasa y catalasa positivas, de morfología bacilar (237 cepas) y cocoide (12 cepas). La distribución de cocos y bacilos por especies de pescado y temperatura de aislamiento (recuentos de flora aerobia mesófila viable o flora aerobia psicrotrofa viable) se detalla en la tabla VIII.1.

Tabla VIII.1. Distribución de bacterias acidolácticas en función de su origen y temperatura de aislamiento.

Especie	Morfología microscópica			
	Bacilos		Cocos	
	mesófilos	psicrotrofos	mesófilos	psicrotrofos
Trucha común	132*	69	1	
Trucha arco iris	18	5	5	2
Lucio	11	2	4	

*, número de cepas.

También se emplearon las ocho cepas de referencia que se relacionan a continuación: *Carnobacterium divergens* (DSM 20623), *Carnobacterium piscicola* (ATCC 35586), *Lactobacillus fermentum* (ATCC 9328), *Lactobacillus sake* (DSM 20017), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Lactobacillus curvatus* (DSM 20019), *Enterococcus faecium* (ATCC 14432) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC 11007).

Propiedades examinadas en el análisis numérico y de utilidad en la identificación clásica.

Se han estudiado un total de 48 características fenotípicas, de las cuales nueve son morfológicas (aparición en medio de cultivo), nueve fisiológicas y las restantes bioquímicas.

Movilidad. En el medio GI de movilidad. La técnica empleada, así como el período de incubación, se han descrito en el capítulo II.

Morfología en medios sólido y líquido. Para ello se utilizó el Agar BM (Wilkinson y Jones, 1977), que es una modificación del medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe), en el cual se omite, durante su preparación, la adición de acetato sódico y citrato diamónico. Las cepas se sembraban por agotamiento en la superficie del medio sólido, y se incubaban durante 48 horas a 28°C. Tras este período se observaron las colonias y se anotaron las características tales como la aparición del borde (liso o rugoso), coloración (blanca, beige-cremosa, con el centro de la colonia más denso y otras coloraciones diferentes de

las anteriores), tamaño (menores de un milímetro y entre uno y dos milímetros) y convexidad de la colonia.

Crecimiento en Agar Acetato (Agar Rogosa -Oxoid-). Las placas se sembraban del mismo modo que en el caso anterior. En este caso, la incubación, a 28°C, se prolongó hasta los siete días con el fin de detectar cepas cuyo crecimiento se viese retrasado por alguno de los componentes constitutivos del medio. La presencia de crecimiento en la zona de inoculación se registró como resultado positivo.

Crecimiento a diferentes temperaturas. Las cepas se inocularon en tubos de Caldo BM (con una formulación similar al Agar BM -Wilkinson y Jones, 1977- pero sin agente gelificante) y se incubaron a diferentes temperaturas. Los tiempos de incubación variaron en función de la temperatura. Así, los tubos incubados a 4°C, 8°C y 45°C se mantuvieron diez días en el interior de un baño termostatzado, mientras que en los incubados a 37°C, 40°C y 42°C se realizaron las lecturas a las 48 horas. La presencia de turbidez se consideró indicativa de crecimiento a la temperatura correspondiente.

Crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Tubos de Caldo BM conteniendo 4%, 7% y 10% de NaCl fueron sembrados e incubados durante 48 horas. Como en el caso anterior, la presencia de turbidez en los tubos indicaba tolerancia a las distintas concentraciones de sal.

Para la realización de las siguientes pruebas bioquímicas la temperatura de incubación empleada fue de 28°C, mientras que las lecturas se llevaron a cabo transcurridas 48 h desde el momento en que fueron sembradas, con excepción de las pruebas correspondientes a la producción de ácido a partir de distintos azúcares, en las que las lecturas se realizaron a las 12, 24, 48 y 120 horas. En el caso de la producción de gas a partir de la glucosa, de la hidrólisis de la esculina y de la producción de dextrano a partir de la glucosa, la incubación se prolongó hasta los siete días.

Oxidación-Fermentación de la glucosa. Se realizó en el medio de Hugh y Leifson (Oxoid) del mismo modo al descrito en el capítulo II.

Producción de ácido a partir de distintos azúcares. Se llevaron a cabo de manera análoga a la empleada para microorganismos Gram negativos (ver capítulo V), si bien el medio de cultivo empleado fue diferente. Se utilizó Caldo BM (en el que se omitió la adición de extracto de carne y glucosa) como medio base, al que se le añadió rojo de clorofenol como colorante en la siguiente proporción: a 95 ml del medio base se le adicionaban 5 ml de una solución de rojo de clorofenol al 1%. A continuación, se añadieron los siguientes azúcares (Sigma) a una concentración final del 1%: L-arabinosa, amigdalina, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, gluconato, inulina, lactosa, maltosa, manitol, D-manosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, D-ribosa, salicina, sacarosa, sorbitol, L-sorbosa, trealosa, D-xilosa y xilitol. Tras el periodo de incubación se observaba si se había producido viraje del indicador hacia el color amarillo como consecuencia de la producción de ácido a partir del azúcar ensayado (Hiu y col, 1984).

Hidrólisis de la arginina. Se empleó el Caldo BM al que se le adicionaba clorhidrato de arginina (Sigma) al 0.3%. A los tres, cinco y siete días se tomaron alícuotas de los tubos sembrados y se depositaron en placas de microtítulo. A continuación, y en cada pocillo, se añadieron tres gotas de reactivo de Nessler recién preparado y, transcurridos unos segundos, se observaba la modificación del color hacia una tonalidad amarilla oscura o marrón, correspondiente a la hidrólisis de la arginina (Cowan, 1974).

Producción de gas a partir de glucosa. Para la realización de esta prueba se utilizaron dos medios que contenían glucosa al 2%. Ambos eran Agar BM, pero diferían en que uno de ellos estaba suplementado con clorhidrato de arginina (Sigma) al 0.3% mientras el otro no. Después de sembrar el inóculo (en masa, a 1 ml de Caldo BM de 18 horas se le añadían 5 ml de Agar BM fundido a 45°C), y antes de proceder a su incubación, se añadieron tapones de 10 mm de Agar Agua a cada uno de ellos. La producción de gas se caracterizaba por la presencia de burbujas en el interior del tubo.

Hidrólisis de la esculina. Las cepas se sembraron en Caldo Esculina (Cowan, 1974). La reacción positiva se manifestaba por el ennegrecimiento del medio de cultivo debido a la descomposición de la esculina.

Prueba del Voges-Proskauer. Para ello se empleó el medio MR-VP (Oxoid). La técnica empleada, así como la interpretación de los resultados, aparece descrita en los capítulos II y V.

Producción de H_2S . Se procedió a la siembra de las cepas problema en Agar Acetato de Plomo (Shay and Egan, 1981). Las cepas capaces de producir H_2S a partir del tiosulfato sódico adquirirían una coloración negruzca.

Producción de dextrano a partir de glucosa. Las cepas se inocularon en Agar BM, cuya concentración de glucosa se había incrementado hasta el 5%. Tras el período de incubación, se observaba la existencia de limosidad en la superficie de las colonias, de manera análoga a la producción de levano a partir de la sacarosa por parte de las bacterias Gram negativas (ver capítulo V).

Análisis numérico y test de reproducibilidad.

Los 48 caracteres se codificaron como 0, negativo, 1 positivo y 2, dudoso. Utilizando programas en VISUAL BASIC V3.0 (Microsoft Corp.) desarrollados por Prieto (1990), se obtuvo el coeficiente de similitud S_{SM} (Sokal y Michener, 1958) entre cada par de cepas. El agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) se realizó con el programa SPSS/PC+ V3.1 (SPSS Inc. Chicago).

El coeficiente de correlación (r) entre la matriz de similitud y los niveles en el fenograma derivados de los de la matriz (correlación cofenética -Sneath, 1978-) se calculó empleando el programa NTSYS-pc V1.80 (Exeter Software, New York). Las tablas de frecuencia se generaron mediante el programa LOTUS 1,2,3 V2.0 (Lotus Development Corporation, Texas) y fueron empleadas para determinar los caracteres más discriminantes (Sneath, 1978).

Todas las pruebas se repitieron en un 10% de las cepas. La probabilidad media de error (p) se calculó de acuerdo con Sneath y Johnson (1972).

Identificación clásica.

En el caso de las **bacterias acidolácticas de morfología bacilar** la identificación se realizó siguiendo, principalmente, los esquemas de Collins y col (1987), Hiu y col (1984) y Schillinger y Lücke (1987).

Las pruebas que se detallan a continuación fueron realizadas a un grupo representativo (10% de las cepas seleccionadas aleatoriamente) de bacilos que no fueron capaces de crecer en Agar Rogosa y que fueron adscritos tentativamente al género *Carnobacterium*, con el fin de proceder a su confirmación como pertenecientes a dicho género microbiano.

Producción de H₂S en Agar TSI (Triple Sugar Iron Agar, Oxoid). Las cepas se inocularon por picadura en tubos conteniendo Agar TSI inclinado y se incubaron durante 48 h a 28°C. Tras este período se procedió a la observación de la producción de H₂S por parte de las cepas, lo cual se manifestaba con un ennegrecimiento del medio alrededor de la zona de picadura (Koneman y col, 1989).

Acción -hemolítica sobre eritrocitos de oveja. Para ello se empleó la misma técnica descrita en el capítulo II. Este tipo de hemólisis se caracteriza por la lisis incompleta de los eritrocitos, con lo que alrededor de la zona de crecimiento aparece una coloración verdosa correspondiente a dicho fenómeno.

Para la identificación de las **bacterias acidolácticas de morfología cocoide** a nivel de especie, la cual se llevó a cabo siguiendo los esquemas de Collins y col (1989), Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), Wallbanks y col (1990) y Williams y col (1990), se realizaron las siguientes pruebas complementarias (las condiciones de incubación que se emplearon fueron de 48 h a 28°C) a las relacionadas en el apartado anterior:

Crecimiento a 10°C. Utilizando el Caldo Triptona de Soja (Oxoid) y siguiendo la metodología descrita en el capítulo V para microorganismos Gram negativos. La presencia de turbidez era registrada como positiva.

Tolerancia a concentraciones de NaCl del 6.5%. Empleando Caldo Nutritivo (Oxoid) al que se le añadía NaCl (Panreac) hasta completar la concentración requerida, tal y como aparece descrito en el capítulo V. La presencia de turbidez era indicativa de tolerancia a esa concentración salina.

Crecimiento a pH 9.6. En este caso se empleó Caldo Triptona de Soja (Oxoid) al que se le ajustó el pH a 9.6 con hidróxido sódico 1 N. Como en el caso anterior, la presencia de turbidez indicaba resistencia a las condiciones empleadas (Prieto y col, 1992a).

Crecimiento en presencia del 40% de bilis. Se llevó a cabo añadiendo sales biliares (Oxoid) al Caldo Triptona de Soja (Oxoid). Los microorganismos capaces de desarrollarse bajo estas

condiciones daban lugar a un crecimiento visible macroscópicamente (Jayne-Williams, 1976).

Producción de gas a partir de la glucosa. Siguiendo el procedimiento descrito para *Aeromonas* (ver capítulo II). Aquellos tubos sembrados con bacterias capaces de producir gas a partir de la glucosa mostraban burbujas de gas en la campana de Durham invertida.

Hidrólisis del almidón. Siguiendo la técnica de Mölin y Ternström (1979) y de modo análogo al utilizado para el análisis numérico de las cepas Gram negativas (capítulo V). Para visualizar las zonas de hidrólisis del almidón (zonas de aclaramiento alrededor de la colonia) las placas se inundaron con una solución de lugol.

Hidrólisis del hipurato. El Agar Hipurato se formuló siguiendo las instrucciones de Molin y Ternström (1982) con una concentración final de hipurato sódico del 3%. La hidrólisis del hipurato daba lugar a la aparición de coloración rosada alrededor de las zonas de crecimiento tras un periodo de incubación de hasta siete días a 30°C.

Fermentación de la tagatosa. Tanto la metodología empleada como la interpretación de los resultados se hicieron de acuerdo con lo expuesto anteriormente para el análisis numérico de las bacterias acidolácticas y referente a la producción de ácido a partir de distintos azúcares.

Acción -hemolítica sobre eritrocitos de oveja. De modo análogo al descrito para la confirmación de *Carnobacterium* spp.

Hidrólisis de diversos sustratos.

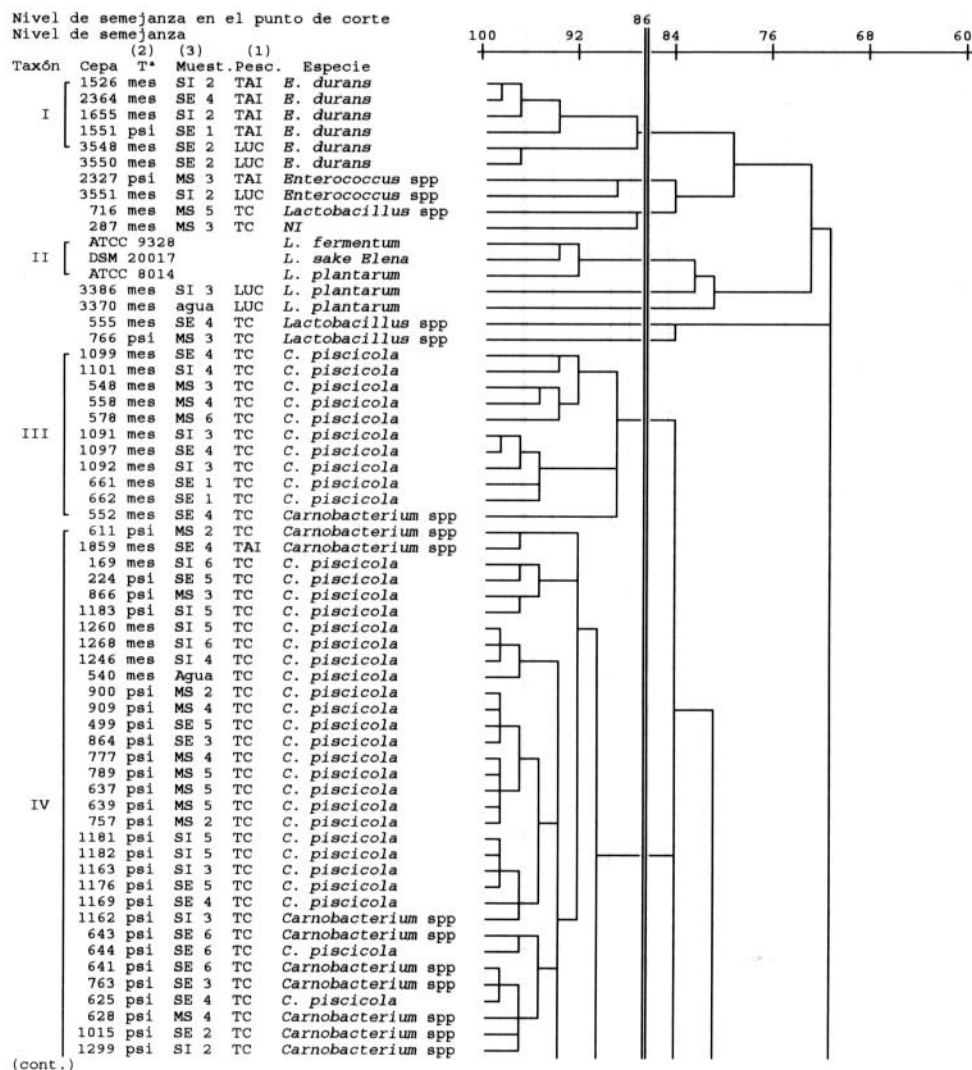
En este caso se empleó un grupo representativo de microorganismos de morfología bacilar (10% del total, es decir, 23 cepas) que se sometieron a una serie de pruebas conducentes a establecer su potencialidad como microorganismos alterantes de alimentos, en base a su capacidad para hidrolizar los siguientes sustratos: Tween 20, Tween 80, yema de huevo (analizando el aclaramiento y la precipitación de la misma), tributirina, caseína, gelatina y almidón. Para llevar a cabo dichos análisis se siguió la metodología descrita en el capítulo V para el estudio de microorganismos Gram negativos.

RESULTADOS

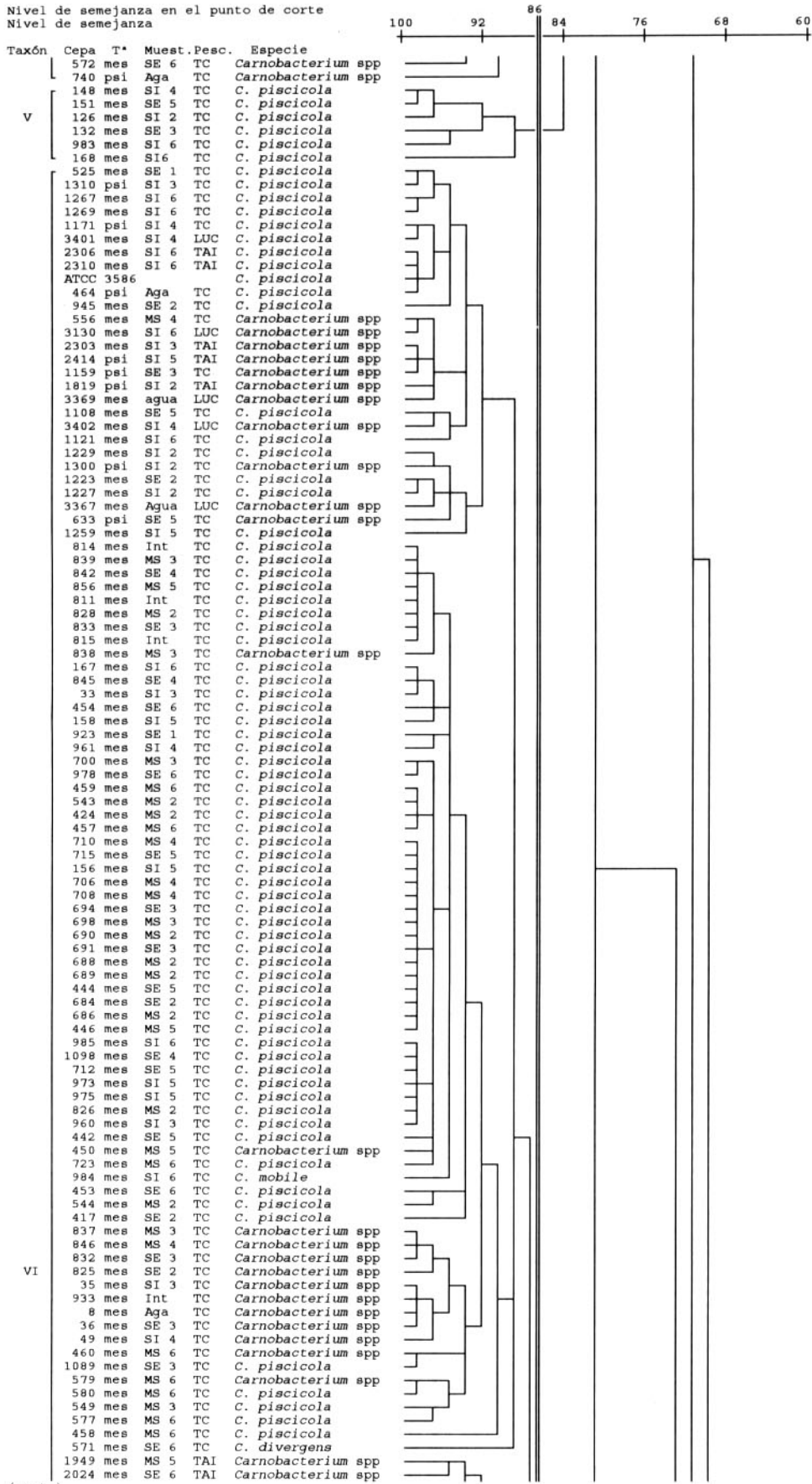
El resultado del análisis numérico de las bacterias acidolácticas se presenta en la figura VIII.1. Como puede verse a un 86% de semejanza (S_{SM}), se formaron siete grupos o taxones significativos (que contenían tres o más de tres cepas) y seis taxones no significativos (que contenían, únicamente, dos cepas). Un total de nueve cepas no pudieron ser agrupadas en ninguno de los taxones establecidos. Todas las cepas tipo incluídas en el estudio, a excepción de *L. curvatus* y *E. faecium*, fueron contenidas en alguno de los agrupamientos. De los siete grupos significativos, cuatro (n° III, IV, VI y VII) comprendieron, al menos, diez cepas cada uno. En la figura VIII.2 se muestra la representación gráfica simplificada del dendrograma que aparece en la figura VIII.1.

El coeficiente cofenético r fue 0.87934, valor que nos indica que no se produce distorsión significativa de la matriz triangular de similitudes.

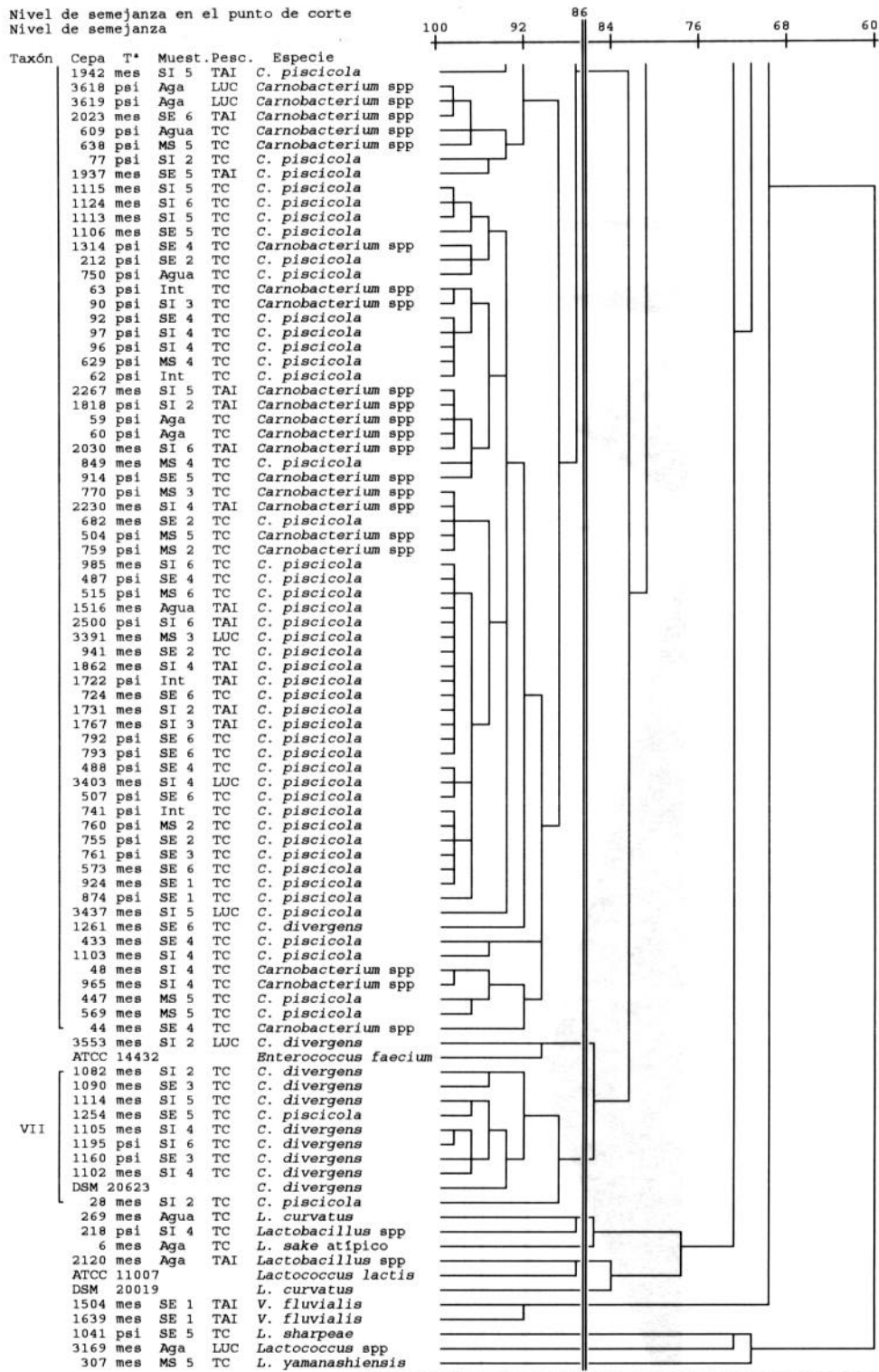
Figura VIII.1. Dendrograma resultante del análisis numérico de cepas de bacterias acidolácticas aisladas de pescado de agua dulce. Coeficiente S_{SM} . Agrupamiento UPGMA. Nivel de corte: 86%.



Nivel de semejanza en el punto de corte
 Nivel de semejanza

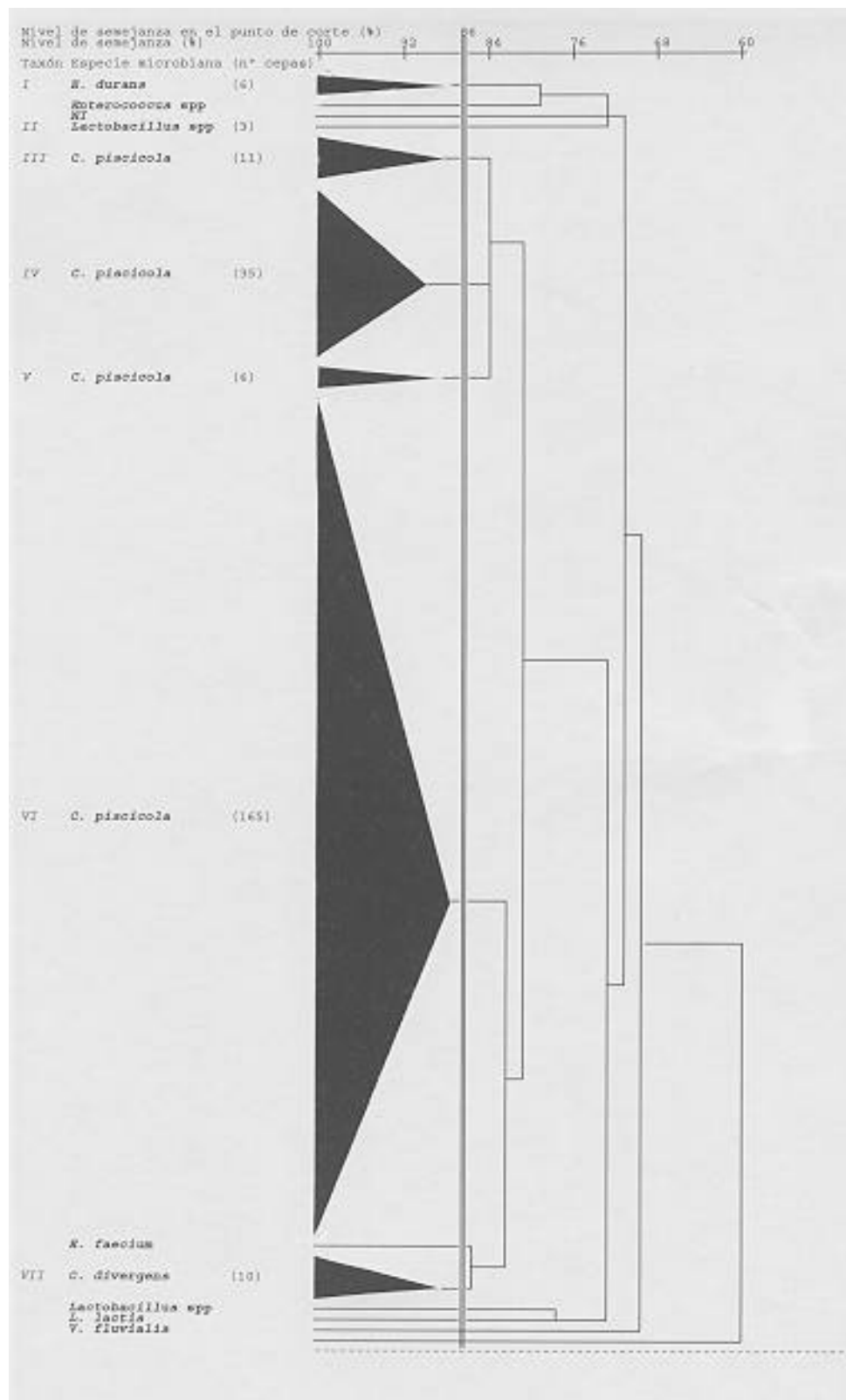


(cont.)



(1) Pesc., especie de pescado en la que fueron aisladas (TC, trucha común; TAI, trucha arco iris; LUC, lucio). (2) T*, grupo del que fueron aisladas (mes, mesófilos; psi, psicrotrofos). (3) Muest., muestra (SE, piel; SI, cavidad abdominal; MS, tejido muscular).

Figura VIII.2. Dendrograma simplificado correspondiente al análisis "cluster" llevado a cabo sobre bacterias acidolácticas aisladas de pescado de agua dulce.



En la tabla VIII.2 se muestran las cepas de bacterias acidolácticas que fueron identificadas a nivel de especie, en su caso, o de género, así como la distribución de las mismas en los diferentes agrupamientos o taxones que aparecen definidos en la figura VIII.1.

Tabla VIII.2. Distribución de las bacterias acidolácticas aisladas de agua dulce en los distintos taxones resultantes del análisis de taxonomía numérica (figura VIII.1).

Especie	TAXÓN							Total
	I§	III	IV	V	VI	VII	NA*	
<i>C. piscicola</i>		10	24	6	116	2		158
<i>C. divergens</i>					2	7	1	10
<i>C. mobile</i>					1			1
<i>Carnobacterium</i> spp.		1	11		45			57
<i>E. durans</i>	6‡							6
<i>Enterococcus</i> spp.							2	2
<i>Lactococcus</i> spp.							2	2
<i>V. fluvialis</i>							1	1
<i>L. plantarum</i>							2	2
<i>L. yamanashiensis</i>							1	1
<i>L. curvatus</i>							1	1
<i>L. sake</i>							1	1
<i>L. sharpae</i>							1	1
<i>Lactobacillus</i> spp.							5	5
NI†							1	1

*; NA, no agrupadas en ningún taxón; ‡, número de cepas; †, NI, no identificada; §, taxón I, adscrito a *E. durans*, taxones III a VI, asignados a *C. piscicola* y taxón VII, a *C. divergens*.

Todas las cepas analizadas en el presente estudio fueron capaces de producir ácido a partir de la celobiosa, pero incapaces de hacerlo a partir de la D-sorbosa y del xilitol. Tampoco ninguna cepa fue capaz de producir gas a partir de la glucosa en el medio MRS modificado. Algunas de ellas resultaron ser Gram variables como resultado de la decoloración con alcohol-acetona. Las características más discriminantes entre los taxones significativos formados en el análisis numérico (fig. VIII.1) aparecen en la tabla VIII.3.

Tabla VIII.3. Perfil morfológico, fisiológico y bioquímico de los siete taxones significativos obtenidos en la taxonomía numérica de bacterias acidolácticas.

Taxón	I	II	III	IV	V	VI	VII
Número de cepas	(6)	(3)	(11)	(35)	(6)	(165)	(10)
Movilidad	50*	0	0	0	0	1	0
Características de la colonia:							
consistencia cremosa	0	100	82	17	0	38	10
borde liso	100	100	0	0	0	94	100
colonia plana	0	0	0	100	17	0	0
colonia convexa	17	100	64	0	0	99	100
Tamaño de la colonia:							
1 mm	100	33	36	0	50	61	100
2 mm	0	67	55	94	50	40	0
Crecimiento en presencia de :							
7% NaCl	100	100	9	37	100	53	100
10% NaCl	50	67	0	0	0	0	0
Crecimiento a:							
4°C	0	0	0	97	0	54	70
37°C	100	100	100	97	100	100	100
40°C	100	100	0	0	0	2	70
42°C	100	100	0	0	0	1	30
45°C	100	0	0	0	0	0	0
Voges Proskauer	0	0	100	69	100	71	30
Hidrólisis de la arginina	100	0	0	12	80	6	100
Crecimiento en Agar Rogosa	0	100	0	0	0	0	0
Acido a partir de:							
Amigdalina	0	100	100	100	100	99	100
L-arabinosa	100	100	18	0	0	2	0
Galactosa	100	100	64	59	50	84	10
Gluconato	33	100	100	25	83	94	100
Inulina	17	0	64	17	0	47	0
Lactosa	0	100	17	0	0	6	0
Maltosa	50	100	100	100	100	99	100
Manitol	100	100	100	100	100	99	20
Melezitosa	33	100	0	11	83	41	100
Melibiosa	0	67	0	0	0	0	0
Rafinosa	25	67	0	0	0	3	10
Sacarosa	50	100	100	100	100	100	100
Salicina	50	100	100	100	100	100	100
Sorbitol	0	100	33	7	0	17	0

* porcentaje de cepas del taxón que presentaban dicha propiedad. Todas las cepas contenidas en los taxones 1 a 7 dieron lugar a colonias no pigmentadas, que crecían a concentraciones de NaCl del 4%, capaces de crecer a 8°C, que no producían H₂S a partir de la cisteína, ni gas a partir de la glucosa en el medio que contenía L-arginina, dextrano negativos y esculina positivos, que eran universalmente productoras de ácido a partir de D-fructosa, D-manosa y D-ribosa y eran incapaces de hacerlo a partir de la D-xilosa.

Tal y como se puede ver en la tabla VIII.3, las cepas adscritas al género *Carnobacterium* no fueron capaces de crecer en el Agar Rogosa. Cuando fueron observadas al microscopio, estas mismas cepas aparecían como bacilos finos, en pares (formando una “V” abierta) o en cadenas cortas. Asimismo, en estudios preliminares pudimos comprobar que la mayoría de estas cepas crecían con dificultad en el medio MRS.

El taxón I contenía seis cepas (tabla VIII.3). Todas ellas eran cocos Gram positivos, incapaces de crecer a 4°C, pero que sí lo hacían a 45°C. No hidrolizaban la arginina ni producían ácido a partir de la amigdalina. Teniendo en cuenta el esquema de identificación propuesto por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), el perfil bioquímico y fisiológico de estas cepas corresponde a la especie *Enterococcus durans*, excepto en lo que se refiere a la movilidad de algunas de las cepas y a la producción de ácido a partir de la L-arabinosa, de la melezitosa (en la descripción de Schleifer y Kilpper-Bälz -1987- *Enterococcus durans* es inmóvil e incapaz de fermentar ambos azúcares). Además fueron incapaces de hidrolizar el hipurato.

El taxón II estaba constituido por tres cepas patrón del género *Lactobacillus*, concretamente *L. fermentum*, *L. sake* y *L. plantarum*. Las características diferenciales más significativas de este grupo con respecto a los otros (tabla VIII.3) fueron la capacidad de crecer en Agar Rogosa y la producción de ácido a partir de la lactosa, características no compartidas por ningún otro taxón obtenido. Otras de las características más notables para distinguirlo de los otros taxones fueron que dos de las tres cepas produjeron ácido a partir de la melibiosa y su negatividad en la prueba del Voges Proskauer.

El agrupamiento III, por su parte, comprendía un total de 11 cepas (tabla VIII.3) incapaces de crecer a 4°C, así como a temperaturas de 40°C; también fueron universalmente positivas para la prueba del Voges Proskauer, y produjeron ácido a partir del gluconato, pero no a partir de la lactosa y la melezitosa. Todas las cepas, a excepción de una, se adscribieron a la especie *Carnobacterium piscicola*, si bien ninguna de ellas hidrolizó la arginina. La cepa restante, capaz de producir ácido a partir de la ramnosa (universalmente negativa para esta especie), fue identificada como *Carnobacterium* spp.

El taxón IV estaba constituido por 35 cepas (tabla VIII.3) cuya característica común principal es que eran capaces de crecer a 4°C, pero incapaces de hacerlo a 40°C. Asimismo cuando se desarrollaban en medio sólido daban lugar a colonias de aspecto convexo y de 2mm de diámetro. Teniendo en cuenta su patrón de fermentación de azúcares, la mayor parte de las cepas fueron adscritas a la especie *C. piscicola*, aunque un 31% de ellas, negativas para la prueba del Voges-Proskauer, únicamente fueron adscritas a nivel de género (*Carnobacterium* spp). Este taxón también se asignó a *C. piscicola*.

El taxón V agrupaba un total de seis cepas (tabla VIII.3) que toleraban concentraciones del 7% de sal, incapaces de crecer a 4°C y a 40°C, positivas en la prueba del Voges Proskauer y capaces, con excepción de una, de producir NH_4^+ a partir de la arginina y de dar lugar a ácido a partir del gluconato y la melezitosa. Como en los dos agrupamientos anteriores este taxón fue adscrito a la especie *C. piscicola* siendo, todas las cepas contenidas en él, identificadas como pertenecientes a esta misma especie (figura VIII.1).

El agrupamiento VI contenía 164 cepas ambientales y la cepa patrón de *C. piscicola*, si bien este taxón podría considerarse como un supertaxón heterogéneo formado por varios grupos de menor tamaño si se daba un corte a un 94% de semejanza (figura VIII.1). Entre las características comunes para la mayoría de las cepas comprendidas en este grupo (tabla VIII.3) destacan las morfológicas, concretamente las referentes a la convexidad de las colonias cuando crecían en un medio sólido, así como a los bordes enteros de estas mismas colonias, en contraposición a los bordes irregulares de las cepas comprendidas en los taxones III, IV y V. La mayoría también producía ácido a partir del gluconato, pero sólo un porcentaje bajo de cepas hidrolizaba la arginina. Dentro de este grupo se incluyen, tal y como se ve en la tabla VIII.2, una cepa de la especie *C. mobile* (móvil), dos cepas de *C. divergens* (manitol negativas) y varias cepas de *Carnobacterium* no identificadas a nivel de especie (*Carnobacterium* spp; todas ellas Voges Proskauer negativas; al 94% de semejanza estarían perfectamente diferenciadas del resto de las cepas constitutivas de este supertaxón) y, la gran mayoría, cepas que fueron adscritas a la especie *C. piscicola*, entre las que se incluye la cepa tipo.

Por último, el taxón VII estaba constituido por un total de diez cepas, de las cuales nueve eran de origen ambiental y la restante era la cepa tipo de *C. divergens* incluida en el estudio (figura VIII.1). Por esta razón, y a pesar de que dos de las cepas fueron manitol positivas (posteriormente identificadas como *C. piscicola*), este agrupamiento se adscribió a dicha especie microbiana (tabla VIII.2). Las cepas fueron capaces de producir NH_4^+ a partir de la arginina, incapaces de producir ácido a partir de la galactosa, la inulina, la lactosa y el manitol (con la salvedad expuesta con anterioridad). La mayoría de las cepas se desarrollaron a temperaturas de 4 y 40°C. Otra de las características distintivas de este taxón fue que, al crecer en medio sólido, dieron lugar a colonias convexas y de bordes enteros.

Las pruebas complementarias encaminadas a confirmar la adscripción de las cepas identificadas como presuntas *Carnobacterium* a este mismo género dieron los siguientes resultados: todas las cepas elegidas aleatoriamente fueron incapaces de producir H_2S en el medio TSI y no exhibieron actividad -hemolítica sobre eritrocitos de oveja. Ambas respuestas son características de *Carnobacterium* spp. frente a microorganismos de otros géneros microbianos próximos tales como *Erysipelothrix*.

En la tabla VIII.4 se muestran los perfiles de las cepas adscritas al género *Lactobacillus* que no fueron agrupadas en ninguno de los taxones significativos.

Tabla VIII.4. Perfil fisiológico y bioquímico de las once cepas adscritas al género *Lactobacillus*.

Especie	<i>L. sake</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sharpae</i>	<i>Lactobac. spp</i>	<i>Lactobac. spp</i>	<i>L. yamanashiensis</i>	<i>Lactobac. spp</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>Lactobac. spp</i>	<i>Lactobac. spp.</i>	<i>L. plantarum</i>
Número de cepa	6	3370	1041	716	766	307	555	269	218	2120	3386
Movilidad	-(¹)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Crec. * en 7% sal	+(²)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Crec. en 10% sal	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec. a 4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Crec. a 40°C	+	+	+	+	+	+	+	v	-	v	-
Crec. a 42°C	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Crec. a 45°C	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
CO ₂ de arginina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NH ₄ de arginina	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Dextrano	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Crec. en Rogosa	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Hidrólisis esculina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción H ₂ S	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Acido a partir de:											
Amigdalina	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
L-arabinosa	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D-Fructosa	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Galactosa	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Gluconato	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Inulina	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Maltosa	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Manitol	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Manosa	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Melezitosa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Melibiosa	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Rafinosa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ramnosa	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
D-Ribosa	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Salicina	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Trealosa	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
D-xilosa	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

* crecimiento; (¹) cepa negativa para esa propiedad; (²) cepa positiva para esa propiedad. Todas las cepas crecieron a 8 y 37°C.

Ninguna de las cepas de bacterias acidoláticas de morfología cocoide fue capaz de hidrolizar el hipurato ni el almidón, y únicamente las cepas 1526, 2364 y 3169 fueron capaces de producir hemólisis. En la tabla VIII.5 se muestran las pruebas diagnósticas más útiles para diferenciar las cepas cocoides no agrupadas en el estudio numérico en ningún taxón significativo.

Tabla VIII.5. Cepas de bacterias acidoláticas de morfología cocoide no incluidas en ninguno de los taxones significativos y pruebas más interesantes para su discriminación.

Especie	cepa	Crecimiento			movilidad	ác. de tagatosa
		45°C	pH 9.6	6.5% NaCl		
<i>Enterococcus</i> spp	2327	+	+(²)	+	-(¹)	-
<i>Enterococcus</i> spp	3551	+	+	+	-	-
<i>Lactococcus</i> spp	3169	-	-	+	-	+
<i>Vagococcus fluvialis</i>	1504	-	-	-	-	-
<i>Vagococcus fluvialis</i>	1639	-	-	-	+	+
NI*	287	+	-	+	-	+

* NI, no identificadas; (¹) cepa negativa para esa propiedad; (²) cepa positiva para esa propiedad.

La cepa adscrita al género *Lactococcus* (3169) difería, en muchas de sus propiedades, de la especie *Lactococcus piscium* (Williams y col, 1990) y de otras especies descritas dentro de este género (Schleiffer y Kilpper-Bälz, 1987). Las cepas identificadas como *Vagococcus fluvialis* (1504, inmóvil, y 1639, móvil) diferían ligeramente del perfil de fermentación de azúcares mostrado por Collins y col (1989) en su descripción de la especie, fueron incapaces de fermentar la ribosa y la trealosa, pero dieron lugar a ácido a partir de la galactosa y de la lactosa. La cepa inmóvil (1504) presentaba un perfil fenotípico muy semejante al de las cepas descritas por Pot y col (1994). La cepa 287 (NI), por su parte, mostraba características propias de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus gallinarum*.

En la tabla VIII.6 se muestran las actividades enzimáticas de los “lactobacilos atípicos” (un total de 23) sobre diversos sustratos. Ninguna de las cepas analizadas fue capaz de degradar el almidón ni la gelatina.

Tabla VIII.6. Actividad hidrolítica sobre diversos sustratos de una selección de bacterias acidoláticas aisladas de peces de agua dulce.

Caseína	Tween 20	Tween 80	Precipitación Yema de huevo	Aclaramiento Yema de huevo	Tributirina
4.4*	8.8	4.4	4.4	8.8	74

*, porcentaje de cepas que hidrolizaban el sustrato.

DISCUSIÓN

Los microorganismos pertenecientes al género *Carnobacterium* se han aislado de alimentos de distintos orígenes, tales como carne envasada al vacío (Holzapfel y Gerber, 1983; Shaw y Harding -1984, 1985-), carne de pollo (Collins y col, 1987), queso tipo Brie (Milliere y col, 1994) y pescado. Su presencia en salmónidos, en Europa y Norteamérica, y en otros productos de la pesca ha sido descrita con anterioridad por diversos autores (Hiu y col, 1984; Mauguin y Novel, 1994). Su importancia radica no sólo en ser considerado como un agente de infecciones en pescado (Hiu y col, 1984), sino en su potencialidad como productor de bacteriocinas que pudieran ser de utilidad en la conservación de los alimentos. Tal y como se puede observar en la tabla VIII.2, la mayor parte de la cepas de bacterias acidolácticas aisladas de peces de agua dulce han sido adscritas al género *Carnobacterium*.

Collins y col (1987) describieron, desde un punto de vista fenotípico, a los microorganismos pertenecientes al género *Carnobacterium* como bacilos Gram positivos, catalasa negativos, inmóviles (exceptuando la especie *C. mobile*), capaces de crecer a 10°C, pero incapaces de hacerlo a 45°C, que no toleraban concentraciones de NaCl del 8% ni daban lugar a colonias visibles macroscópicamente en Agar Rogosa. En este mismo sentido, diversos autores (Holzapfel y Gerber, 1983; Milliere y col, 1994) han observado la dificultad que tienen los miembros de este género para desarrollarse en el medio MRS (De Man y col, 1960), el cual contiene sales que afectan a su crecimiento. Por ello, en el presente trabajo se ha empleado el agar, o caldo en su caso, BM (Wilkinson y Jones, 1977), con el que se pretendió evitar la inhibición o retraso del desarrollo de aquellas cepas de bacterias acidolácticas sensibles al acetato sódico y al citrato diamónico. Por el contrario, otros autores observaron que determinadas especies del género *Lactobacillus* tampoco eran capaces de desarrollarse en el Agar Rogosa (*L. casei* -Schillinger y Lücke, 1987-) o que lo hacían muy débilmente (Mauguin y Novel, 1994). De todos modos, la incapacidad de crecer en Agar Rogosa y a más de 40°C, han sido tomados como los criterios principales para diferenciar las cepas adscritas al género *Carnobacterium* de las pertenecientes al género *Lactobacillus*, tal y como diversos autores han propuesto (Baya y col, 1991; Collins y col, 1987; Feresu y Jones, 1988; Milliere y col, 1994; Montel y col, 1991). En este mismo sentido, Pilet y col (1995) identificaron a algunas de sus cepas aisladas a partir de pescado como carnobacterias en base a su capacidad para crecer a 5°C y a su incapacidad de hacerlo en Agar Acetato. El hecho de crecer con dificultad en el medio MRS (Oxoid) también ha sido una característica adicional tenida en cuenta para adscribir las cepas a *Carnobacterium*. Sin embargo, la mayor parte de los autores (Collins y col, 1987; Schillinger y Lücke, 1987) proponen la utilización de otras pruebas complementarias, como la composición en ácidos grasos, el estudio de la configuración del ácido láctico (producido a partir de glucosa) por métodos enzimáticos y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos. De hecho, Mauguin y Novel (1994) necesitaron emplear estas técnicas para diferenciar las cepas que identificaron como *C. piscicola* de otras que identificaron como *L. plantarum*, todas ellas obtenidas en pescado.

Microscópicamente, las cepas aisladas en nuestro trabajo son similares a las mostradas por Shaw y Harding (1984) y a las descripciones que de ellas hacen Holzapfel y Gerber (1983), Shaw y Harding (1985) y Milliere y col (1994). Al igual que Hiu y col (1984), en el

presente estudio observamos la existencia de cepas, pertenecientes al género *Carnobacterium*, que mostraron variabilidad en la prueba del Gram.

En cuanto a sus características de crecimiento en medio sólido, las cepas contenidas en los grupos VI y VIII coinciden plenamente con la descripción de las cepas aisladas por Milliere y col (1994) y Hiu y col (1984), si bien las de los grupos III, IV y V únicamente difieren de dichas descripciones en lo referente a la convexidad y al aspecto liso del borde de las colonias.

En general, y en lo que se refiere al perfil de fermentación de azúcares, nuestras cepas, identificadas como pertenecientes al género *Carnobacterium*, guardan mucha similitud con las aisladas por otros investigadores (Baya y col, 1991; Manguin y col, 1994).

Como se apuntaba en la introducción del presente capítulo, Wallbanks y col (1990) describieron una nueva especie microbiana a la que dieron el nombre de *Vagococcus salmoninarum*. Este hecho ha contribuido a dificultar la identificación de *Carnobacterium* por métodos tradicionales. En ese mismo trabajo se demostró que, filogenéticamente, *Carnobacterium* estaba más relacionado con los géneros *Vagococcus* y *Enterococcus* que con *Lactobacillus*. Esta nueva especie (*Vagococcus salmoninarum*) comparte con *Carnobacterium* su incapacidad de desarrollarse en Agar Rogosa y de crecer a 40°C. Las cepas contenidas en los taxones III a VI (figura VIII.1) difieren de esta especie de nueva descripción en que su morfología microscópica era bacilar (en contraste con la cocobacilar de *V. salmoninarum*), en que no producían α -hemólisis sobre eritrocitos de oveja (característica observada por Schmidtke y Carson -1994- en su revisión de la descripción de esta especie microbiana), y en que eran capaces de producir ácido a partir de la amigdalina y del manitol (tabla VIII.3) e incapaces de producir H₂S a partir del tiosulfato sódico. Las cepas del taxón número VII, por su parte, además de distinguirse de *V. salmoninarum* en la morfología microscópica y en la producción de H₂S, lo hacen por su capacidad de hidrolizar la arginina (Wallbanks y col, 1990). La distinción de las cepas pertenecientes a las especies *C. divergens*, *C. piscicola* y *C. gallinarum* de la otra especie descrita del género *Vagococcus* (*V. fluvialis*) se basa, entre otras características, en la morfología cocoide y en la movilidad de esta última (Collins y col, 1989). Por otra parte, las cepas inmóviles de *V. fluvialis* descritas por Pot y col (1994) además de ser cocoides, producían α -hemólisis en Agar Sangre.

La incapacidad de producir H₂S a partir del tiosulfato sódico nos sirvió también para distinguir el género *Carnobacterium* de una especie microbiana próxima a él (Gram positivos no esporulados) y también asociada al pescado, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Jones, 1986). Otras pruebas útiles empleadas tradicionalmente para distinguir bacterias acidolácticas de *E. rhusiopathiae* han sido la incapacidad de ésta para hidrolizar la esculina (todas las cepas contenidas en los grupos III a VI y VII degradaron la esculina) así como su capacidad de producir ácido a partir de la lactosa (sólo un porcentaje reducido de cepas de dichos taxones exhibieron esta capacidad). La capacidad de producir ácido a partir de celobiosa, maltosa, manosa y sacarosa, por parte de nuestras cepas (de acuerdo con el criterio de Feresu y Jones, 1988), y a partir del manitol, por parte de *C. piscicola* (Jones, 1986), sirvió para diferenciarlas de *E. rhusiopathiae*. La confirmación de esta diferenciación entre nuestras cepas y la especie *E. rhusiopathiae* se llevó a cabo estudiando la producción de H₂S en TSI

(Oxoid) y la aparición de áreas de α -hemólisis en placas conteniendo eritrocitos de oveja siguiendo los criterios de Jones (1986).

Por lo que respecta a la diferenciación de *Carnobacterium* del género *Brochothrix*, cabe decir que los representantes de este último género microbiano son catalasa positivos y no son capaces de crecer a 37°C (Sneath y Jones, 1986).

Pruebas tales como la producción de CO₂ a partir de la glucosa en el medio arginina-MRS descrito por Collins y col (1987) o la capacidad de hidrolizar la arginina en ese mismo medio no han sido de utilidad taxonómica en nuestro estudio; de hecho, ni siquiera las cepas tipo de *Carnobacterium*, empleadas como patrones internos, dieron muestras de actividad en dichos medios de cultivo. En el primer caso se podría haber debido a que en la formulación del medio el citrato amónico, del que se prescindió, no fue sustituido por citrato sódico, tal y como Collins y col (1987) prescribían, pero bien es cierto que la producción de gas a partir de la glucosa por parte de estos microorganismos es un carácter variable y, en ocasiones, difícil de detectar (Collins y col, 1987; Shaw y Harding, 1985; Collins y col, 1987). En la bibliografía se muestran disparidad de criterios acerca del carácter homo o heterofermentativo de las carnobacterias, es decir, de su incapacidad o no para producir gas a partir de la glucosa. Así, mientras la mayoría de los autores consideran a *Carnobacterium* spp. como microorganismos homofermentativos (Hiu y col, 1984; Milliere y col, 1994; Montel y col, 1991) y otros opinan que se trata de bacterias heterofermentativas (Hitchener y col -1982- y Holzapfel y Gerber -1983-, cuando todavía no se había establecido este género, y Pilet y col, 1995), un tercer grupo de investigadores (Collins y col, 1987) los define como microorganismos homofermentadores, y heterofermentadores en determinadas ocasiones. Por lo que se refiere el segundo caso, es decir, la incapacidad de hidrolizar la arginina por parte de las cepas objeto de nuestro estudio, ésta podría haber sido debida a que el medio contenía un 2% de glucosa. Diversos autores han observado que al emplear el medio MRS con un contenido bajo en glucosa, o exento de ella, la totalidad de las cepas consideradas como “lactobacilos atípicos” (*Carnobacterium* spp.) eran capaces de degradar la arginina (Baya y col, 1991; Collins y col, 1987; Pilet y col, 1995), pero a concentraciones de glucosa del orden del 2% algunas de esas cepas no mostraban dicha propiedad (Hitchener y col, 1982; Mauguin y Novel, 1994; Pilet y col, 1995; Shaw y Harding, 1984). Jeppesen y Huss (1993) afirmaron que el uso de un medio diseñado para la hidrólisis de la arginina que contuviese un 2% de glucosa podría tener como resultado la aparición de falsos negativos.

En la figura VIII.1 se puede apreciar que, en general y con excepción de una cepa patrón (*E. faecium*), existe una buena diferenciación entre las cepas adscritas al género *Carnobacterium* y el resto de las cepas de bacterias acidolácticas analizadas. De hecho, y para ahondar en esta diferenciación, mientras el agrupamiento de todos los clusters conteniendo cepas del género *Carnobacterium* se produce a un 80% de similitud, sóloamente a un nivel de semejanza del 72% se agrupan con un primer grupo de otras bacterias acidolácticas (las cepas tipo de *L. curvatus* y de *Lactococcus faecalis* y cuatro cepas ambientales). En el estudio taxonómico de cepas Gram positivas que Feresu y Jones (1988) llevaron a cabo, y en el que se incluyeron cepas pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix* y al grupo de las bacterias acidolácticas (tanto típicas como atípicas), se pudo observar que las cepas englobadas en el llamado “grupo 2 de Thornley y Sharpe” se agrupaban a un 83% de semejanza (coeficiente S_G). Dichas cepas formaban dos taxones constituidos por 14 y 15

cepas, respectivamente, que por las características fenotípicas observadas, bien podrían coincidir con la descripción de *C. piscicola* y *C. divergens*. Estas mismas cepas se agrupaban, a un 73% de semejanza (S_G), con las cepas del “grupo 3 de Thornley y Sharpe” (*C. mobile* - Collins y col, 1987-) y con algunas cepas de *L. plantarum*. A pesar de que en nuestro estudio hemos empleado un coeficiente (S_{SM}) distinto al utilizado por Feresu y Jones (S_G , 1988), se observa cierto paralelismo entre nuestros resultados y los obtenidos por estos investigadores. Por otro lado, los dos grupos de “Thornley y Sharpe” y las cepas del género *Erysipelothrix* se agruparon a un nivel de semejanza más bajo (62%, S_G). Estos autores (Feresu y Jones, 1988) concluyeron que las cepas de “lactobacilos atípicos” no estaban relacionadas con *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Brochotrix*, y sólo eran ligeramente próximas a algunos miembros de *Lactobacillus* y postularon que, debido a su incapacidad para crecer en Agar MRS, no eran miembros de este último género.

Dentro de las cuatro especies comprendidas en el género *Carnobacterium*, las que han sido aisladas en mayor número en nuestro trabajo, *C. piscicola* (comprendidas principalmente en los grupos III a VI) y *C. divergens* (todos ellos en el grupo VII) también son las que se han aislado más frecuentemente por otros autores en pescado de agua dulce (Baya y col, 1991; Hiu y col, 1984) y en distintos productos de la pesca (Pilet y col, 1995). Asimismo se ha detectado la presencia de una cepa de *C. mobile* (en el taxón VI) y de otras carnobacterias que no pudieron ser identificadas a nivel de especie (en los taxones III, IV y VI). La adscripción a especie de las cepas ambientales presentó dificultades al haberse basado, únicamente, en la realización de pruebas fisiológicas y bioquímicas tradicionales. De todos modos, podemos apreciar que el perfil fenotípico de las cepas identificadas por nosotros como *C. piscicola* (*L. piscicola*) presentaba ligeras variaciones con respecto al observado por Hiu y col (1984) y, principalmente, a los observados por Collins y col (1987) y al de las cepas V1 y V41 de Pilet y col (1995). Esto mismo se puede decir de las cepas identificadas como *C. divergens* con relación a la descripción de Collins y col (1987). Tal y como se puede observar en la tabla VIII.3, en lo referente al patrón de fermentación de azúcares, las cepas contenidas en los grupos III a VI fueron universalmente positivas para la producción de ácido a partir de la amigdalina, celobiosa, D-fructosa, maltosa, manitol, D-manosa, D-ribosa, sacarosa, salicina y trealosa, así como universalmente negativas (en más de un 80% de las cepas contenidas en el taxón) para la L-arabinosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, D-sorbosa, D-xilosa, xilitol y sorbitol (excepto el taxón III que fue variable). Los resultados fueron desiguales para galactosa, gluconato (positivos, principalmente, los grupos III y VI), inulina (negativos los grupos IV y V, y variables los otros dos) y melezitosa (negativos los taxones III y IV, y variable el VI). La variabilidad observada en algunos grupos con respecto a algunos azúcares podría deberse a las cepas de *Carnobacterium* que no pudieron ser clasificadas a nivel de especie. El perfil bioquímico del taxón VII es bastante similar al de los otros grupos, pero con ligeras excepciones tales como que fueron incapaces de producir ácido a partir de inulina, galactosa y manitol, pero capaces de hacerlo a partir del gluconato y de la melezitosa.

Hiu y col (1984) clasificaron a las cepas de *L. piscicola* como “estreptobacterias” por el hecho de ser homofermentadoras, de crecer a 15°C (y no ser capaces de hacerlo a 45°C) y por producir ácido a partir de la ribosa. Asimismo, las diferenciaban de otros lactobacilos, como *L. yamanashiensis*, en virtud de su incapacidad de producir dextrano a partir de la sacarosa y por ser capaces de fermentar manitol, maltosa y ribosa, características compartidas por las cepas analizadas en nuestro laboratorio. La mayoría de las cepas identificadas por Hiu

y col (1984) fueron, como en nuestro caso, incapaces de producir ácido a partir de rafinosa, melibiosa, lactosa y melezitosa, mientras que ninguna lo hizo a partir de inulina, sorbitol y L-arabinosa. Algunas cepas tampoco fueron capaces de fermentar la galactosa.

Por lo que se refiere a la utilización del esquema de Collins y col (1987) para la identificación a nivel de especie de cepas pertenecientes al género *Carnobacterium*, cabe decir que las cepas contenidas en los taxones III a VII, a pesar de no cumplir todas las propiedades que dichos autores (emplearon el API 50CHL y el API 10E) asignan a las especies *C. piscicola*, *C. divergens* y *C. mobile*, sí se aproximan a las descripciones que de cada una de ellas dan estos autores. Tal y como se observa en la tabla VIII.3, la mayoría de las cepas contenidas en el taxón VII (constituido mayoritariamente por cepas identificadas como *C. divergens*) son capaces de crecer a 40°C, una de las características que a Collins y col (1987) les sirve para diferenciar *C. divergens* de *C. piscicola*, mientras que las contenidas en los taxones III a VI son incapaces de desarrollarse a esa temperatura, propiedad observada por Stoffels y col (1992) en *C. piscicola*. Otro de los caracteres discriminantes entre ambas especies que Collins y col (1987) propusieron fue la fermentación de la galactosa, para la cual *C. divergens* era negativa. Como se ve en la tabla VIII.3, las cepas contenidas en los taxones III a VI muestran una gran variabilidad en cuanto a su respuesta frente a este azúcar, posiblemente influenciada por la presencia en dichos taxones de cepas de *Carnobacterium* no identificadas a nivel de especie, si bien también se puede observar que es negativo para la mayoría de las cepas contenidas en el grupo VII. Otras pruebas consideradas de valor taxonómico por Collins y col (1987) fueron: la fermentación del gluconato (lo hacen la mayoría de las cepas identificadas en nuestro trabajo como *C. piscicola* y ninguna de las pertenecientes a la especie *C. divergens*) y la producción de ácido a partir del manitol y de la inulina, ambas negativas para *C. divergens*. Esta última prueba dió resultados muy variables que fueron de poca utilidad en nuestro estudio. La producción, por parte de nuestras cepas, de ácido a partir del manitol (tabla VIII.3) fue de utilidad a la hora de adscribir los taxones III a VII a las distintas especies de *Carnobacterium* (figura VIII.1), ya que las cepas contenidas en los grupos III a VI fueron positivas para dicha prueba (característica de *C. piscicola*) mientras que la mayoría de las contenidas en el taxón VII (*C. divergens*) fueron negativas. En otros trabajos, como los de Shaw y Harding (1985) y Döring y col (1988), esta prueba resultó ser la más discriminante entre *L. carnis* y *L. divergens*. La diferenciación de *C. piscicola* y *C. divergens* de las otras especies descritas de *Carnobacterium* (*C. mobile* y *C. gallinarum*) se basó, entre otras pruebas, en la movilidad (*C. mobile* es móvil) y en la fermentación de la D-xilosa (*C. gallinarum* es capaz de producir ácido a partir de este azúcar frente a las otras tres especies que no lo son -Collins y col, 1987-).

El perfil de azúcares, correspondiente a *C. piscicola*, observado en nuestro trabajo es bastante similar al obtenido por Milliere y col (1994), excepto en lo referente al gluconato, a la melezitosa, a la inulina y a la lactosa (para los cuales todas sus cepas fueron positivas en el API 50CHL), y semejante al de Stoffels y col (1992) que observaron que galactosa y gluconato se mostraron como azúcares débilmente fermentables. Por otra parte, difieren del perfil de la cepa V1 de Pilet y col (1995) en que parte de nuestras cepas fermentaron la galactosa, la inulina y la melezitosa. Por lo que respecta a las cepas asignadas a *C. divergens*, éstas se aproximaron mucho al perfil de fermentación de azúcares de la cepa V41 de Pilet y col (1995), también adscrita por estos autores a *C. divergens*, con la excepción de la fermentación de la galactosa (positiva en su caso) y de la melezitosa (negativa en su estudio).

Otra de las pruebas que Collins y col (1987) consideran como universalmente positiva para las cepas de *C. divergens* y *C. piscicola* es la del Voges-Proskauer. Sin embargo, tanto en el presente trabajo (especialmente en las cepas contenidas en el taxón VII) como en el de Hiu y col (1984), algunas de las cepas se muestran como negativas. Aquellas cepas contenidas en los grupos III a VI que fueron negativas para esta prueba, pero similares a *C. piscicola* en el resto de sus características, no se adscribieron a ninguna especie (*Carnobacterium* spp.)

En cuanto a la no concordancia exacta de nuestros resultados con los de otros grupos de investigación (Collins y col, 1987), cabe hacer dos consideraciones. En primer lugar, las diferencias que se pueden encontrar al comparar los patrones de fermentación (y bioquímicos en general) de nuestras cepas con los publicados por otros autores se pueden deber al empleo, por su parte, de sistemas miniaturizados comerciales (API 50 CHL y API 10E), lo cual lleva aparejado el uso de medios de cultivo basales y períodos de incubación diferentes a los empleados en los métodos tradicionales que se han utilizado en nuestro estudio. Baya y col (1991) observaron falta de correspondencia entre ambos métodos de identificación (API frente a métodos tradicionales) en lo referente a algunas pruebas, tales como la producción de ácido a partir de inulina, lactosa, sorbitol y galactosa. Como hemos visto anteriormente, alguno de estos azúcares aparece, en el esquema de Collins y col (1987), como clave para la diferenciación entre *C. piscicola* y *C. divergens*. Mauguin y Novel (1994), por su parte, no fueron capaces de identificar sus cepas a nivel de especie empleando el API 50CHL. En segundo lugar, Hiu y col (1984) observaron que, a pesar de que entre las cepas que ellos asignaron a la especie *L. piscicola* existían variaciones en sus patrones de fermentación de azúcares, estaban muy relacionadas genéticamente. Por lo tanto, podríamos concluir que la existencia de pequeñas diferencias en cuanto a la fermentación de determinados azúcares, secundarios desde el punto de vista de la identificación, tampoco son muy importantes a la hora de asignar una cepa a una u otra especie o uno u otro género.

La separación entre las especies pertenecientes al género *Carnobacterium* por el método de taxonomía numérica empleado (figura VIII.1), es medianamente satisfactorio cuando se tienen en cuenta valores de semejanza altos, de cerca del 81% (S_{SM}), y únicamente para separar a las cepas identificadas como *C. piscicola* agrupadas en el taxón VI (117 cepas adscritas a esta especie) y las de *C. divergens* contenidas en el grupo número VII (8 cepas), sin contar con las cepas no identificadas de *Carnobacterium*. Este hecho pone de manifiesto la gran proximidad taxonómica, no sólo entre las especies pertenecientes a este género, sino entre todas las cepas adscritas a este género microbiano. Feresu y Jones (1988), que obtuvieron una nítida separación entre los taxones que contenían las distintas especies de carnobacterias, también observaron la proximidad existente entre *C. piscicola* y *C. divergens*, más próximas entre sí que con *C. mobile*. En este sentido, el taxón VII agrupa a ocho cepas de *C. divergens* y dos de *C. piscicola*, lo que subraya lo anteriormente expuesto acerca de la gran proximidad entre distintas especies de este género. Montel y col (1991), a pesar de que señalan que la taxonomía numérica no es el mejor sistema para establecer diferencias entre las distintas especies de *Carnobacterium* y que, incluso, hay desacuerdo para determinar cuales son los caracteres discriminantes más claros, afirman que la fermentación del manitol (como en nuestro caso) y de la inulina son de utilidad para separar *C. piscicola* de *C. divergens*. A diferencia de nosotros, Pilet y col (1995) consideraron que la fermentación de la inulina y del

manitol no permitía diferenciar entre las cepas de *C. piscicola* y *C. divergens*, ya que su cepa adscrita a *C. piscicola* sólo era capaz de fermentar el manitol, y no la inulina.

Las cepas patrón empleadas en nuestro trabajo (figura VIII.1) fueron agrupadas en los taxones VI (*C. piscicola*) y VII (*C. divergens*), mientras que otros autores (Mauguin y Novel, 1994) agruparon las cepas patrón de *C. piscicola* y *C. divergens* a un nivel más bajo de semejanza (77% S_{SM}) con las cepas que identificaron como pertenecientes al género *Carnobacterium* spp. Este hecho se debió, probablemente, a que ninguna de sus cepas pertenecía a ninguna de ambas especies descritas.

Otro aspecto interesante que se puede observar en la figura VIII.1 es la subdivisión del grupo VI, a un 94% de semejanza, en subgrupos, varios de los cuales incluyen a distintas cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de especie. Las cepas no identificadas a nivel de especie en el presente trabajo podrían tratarse de subespecies de *C. piscicola* (manitol positivas) que fuesen Voges-Proskauer positivas, o biovariedades de *C. gallinarum*, especie, por otra parte, muy próxima a *C. piscicola* (Feresu y Jones, 1988; Manchester y col, 1995). Montel y col (1991) hipotetizan acerca de la existencia de subespecies dentro de la especie *C. piscicola*. Manchester y col (1995), en un análisis de carnobacterias mediante espectrometría de masas, además de observar una gran heterogeneidad entre las cepas de *C. divergens*, reflejaron la existencia de diferentes taxones en los cuales se recogían las cepas de *C. piscicola*, y afirmaron que podrían corresponder a subespecies dentro de la anteriormente mencionada especie. Sin embargo, Collins y col (1987) no observaron heterogeneidad alguna entre las cepas de *C. piscicola* que analizaron.

De las once cepas que, tentativamente, se adscribieron al género *Lactobacillus*, únicamente seis pudieron ser identificadas, de manera aproximada (de ahí que puedan ser consideradas como *L. sake* atípica, *L. curvatus* atípica y *L. plantarum* atípicas), a nivel de especie siguiendo las claves propuestas por Schillinger y Lücke (1987). Una de ellas, la cepa 3370, identificada tentativamente como *L. plantarum*, poseía un perfil bioquímico (tabla VIII.4) que difería en tres pruebas (Voges Proskauer y producción de ácido a partir del sorbitol y de la trealosa) del descrito por estos autores. Las restantes cinco cepas (las denominadas *Lactobacillus* spp.) mostraron capacidad desigual de crecer en Agar Acetato y perfiles de fermentación de azúcares muy diferentes a los mostrados por Schillinger y Lücke (1987) para las especies descritas en aquel momento (Schillinger y Lücke -1987- y Mauguin y Novel -1994- han observado, además, que ciertas cepas de este género son incapaces de crecer en Agar Rogosa). A pesar de ello, las hemos adscrito al género *Lactobacillus* ya que mostraban propiedades muy diferentes a las exhibidas por las cepas del género *Carnobacterium*, tales como el crecimiento a 45°C, la incapacidad de fermentar amigdalina y fructosa, y la fermentación de D-xilosa. Aunque no han sido aislados con mucha frecuencia, representantes del género *Lactobacillus* han sido detectados en pescado fresco por algunos autores (Fricourt y col, 1994; Mauguin y Novel, 1994; Valdimarsson y Gudbjörnsdottir, 1984). Valdimarsson y Gudbjörnsdottir (1984) aislaron 21 cepas, de las cuales únicamente seis crecieron en los medios diseñados para su aislamiento y a pesar de lo cual fueron identificadas como *L. plantarum*. Mauguin y Novel (1994), al igual que en nuestro caso, encontraron dificultades para adscribir a especie las cepas de *Lactobacillus* que aislaron; de hecho, las cepas de *L. plantarum* que identificaron poseían perfiles “API” atípicos.

Del estudio de taxonomía numérica (figura VIII.1) se desprende que, a pesar del número reducido de pruebas empleadas, existe una clara separación entre las cepas identificadas como pertenecientes al género *Carnobacterium* y las del género *Lactobacillus*, tanto las cepas tipo como las de campo adscritas a este género.

Las bacterias acidolácticas de morfología cocoide aisladas fueron identificadas, como las cepas del género *Lactobacillus*, de manera aproximada dada las dificultades que entrañaba dicha tarea. Así, las cepas contenidas en el taxón 1 (tabla VIII.3) eran capaces de crecer a 45°C y no mostraron actividad hemolítica, por lo cual fueron adscritas al género *Enterococcus*. Tras comparar sus perfiles con los mostrados por Schleiffer y Kilpper-Bälz (1987) para las distintas cepas de este género, fueron clasificadas como *E. durans*, aunque poseyeran propiedades características de *E. faecium* (producían ácido a partir de la L-arabinosa), debido a su incapacidad para hidrolizar el hipurato. En cuanto a las cepas 2327 y 3551, agrupadas en un taxón “no significativo”, no fueron identificadas a nivel de especie, pero al ser no hemolíticas y crecer a 45°C (tabla VIII.5) se adscribieron al género *Enterococcus*. La cepa 287, mostraba características intermedias entre *Streptococcus mutans* y *E. gallinarum* (tabla VIII.5), lo que no nos permitió adscribirla a una u otra especie. La cepa adscrita al género *Lactococcus* difería ampliamente de la descripción de la especie *Lactococcus piscium* (Williams y col, 1990), especie láctica incapaz de crecer en Agar Acetato, cuyo hábitat es acuático y causa enfermedad en peces, y de otras especies descritas dentro de este género (Schleiffer y Kilpper-Bälz, 1987). Por lo que respecta a las cepas de *Vagococcus fluvialis*, cabe decir que la 1639 fue clasificada como tal a pesar de que difiere, en lo referente a la producción de ácido a partir de algunos azúcares, del perfil de mostrado por Collins y col (1989) en su descripción de la especie, mientras que la 1504 correspondía al grupo de *V. fluvialis* que son móviles, detectadas por Pot y col (1994) en lesiones de distintos animales domésticos. Un dato significativo es que ambas cepas de *V. fluvialis* se agruparon en un taxón no significativo a un 92% de similitud. Mauguin y Novel (1994) detectaron la presencia de bacterias acidolácticas de morfología cocoide u ovoidea en alimentos de origen marino, pero tampoco fueron capaces de llevar a cabo una identificación precisa de las cepas que aislaron; todas ellas fueron adscritas al género *Lactococcus*. Tampoco Pilet y col (1995) fueron capaces de hacer lo propio con cinco cepas de bacterias acidolácticas cocoides, aisladas de diversos productos de la pesca, a las que adscribieron a los géneros *Lactococcus* y *Enterococcus*.

En cuanto al papel que las cepas identificadas como *Carnobacterium* spp podrían desempeñar como microorganismos alterantes hay que decir que pocas de las cepas estudiadas son capaces de degradar algunos de los sustratos de naturaleza lipídica empleados y todas son incapaces de hidrolizar almidón y sustratos de naturaleza proteica (tabla VIII.6). Estos resultados coinciden, en parte, con los obtenidos por otros autores, que observan actividades proteolíticas y lipolíticas no muy marcadas. Feresu y Jones (1988) detectaron, en las cepas de los “grupos 2 y 3 de Thornley y Sharpe”, una actividad lipolítica (sobre Tween 80) y proteolítica (sobre caseína) media, así como ausencia de actividad amilasa, mientras otros autores, como Baya y col (1991) y Milliere y col (1994) sólo detectaron actividad caseinolítica y no observaron ningún tipo de actividad hidrolítica, respectivamente.

A modo de resumen, en el estudio llevado a cabo sobre la flora acidoláctica en el presente capítulo se ha probado la presencia de representantes de esta familia microbiana en

pescado de agua dulce mantenido a refrigeración. Asimismo se ha observado la gran homogeneidad existente entre el 90% de las bacterias estudiadas, la mayor parte de ellas procedentes de trucha común, y que pone de manifiesto la existencia de unas condiciones selectivas para este grupo microbiano en el transcurso de la conservación a bajas temperaturas. Dada su nula actividad perjudicial sobre los distintos sustratos analizados, se podrían investigar sus posibles efectos beneficiosos sobre el pescado, como la producción de bacteriocinas que retrasasen o inhibiesen el desarrollo de bacterias perjudiciales, alterantes o patógenas (especialmente *Listeria monocytogenes*). Diversos autores, como Pilet y col (1995) afirman que podrían ser de importante aplicación en los productos de la pesca desde el punto de vista de su salubridad.

CONCLUSIONES

PRIMERA.- Los recuentos microbianos (mesófilos, psicrotrofos, anaerobios, enterobacteriáceas, enterococos) del agua donde se capturan tres especies de peces de agua dulce (trucha arco iris -piscifactoría-, trucha común -río- y lucio -río-) no muestran diferencias significativas. Sin embargo, en las distintas zonas muestreadas (piel, agallas, intestino) de los peces recién capturados, los niveles de buena parte de estos grupos microbianos son significativamente inferiores en trucha arco iris que en las especies de vida libre.

SEGUNDA.- Con las limitaciones propias del tamaño de la población estudiada, y en relación con la importancia del pescado de agua dulce como vehículo de agentes de infección alimentaria, cabe concluir que, para *Salmonella* (a pesar de la incidencia ocasional en el agua de piscifactoría) y *Listeria monocytogenes*, el riesgo es limitado. El aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* y el carácter psicrotrofo de algunas de sus cepas, así como el carácter “emergente” de este microorganismo, sugieren no despreciar, desde un punto de vista sanitario, el riesgo potencial cuando el pescado se consume después de un tratamiento insuficiente.

TERCERA.- Aunque en el músculo de pescado de agua dulce almacenado a refrigeración los recuentos de *Aeromonas* únicamente alcanzan niveles detectables (superiores a 2.0 unidades logarítmicas por gramo) tras 6 o 12 días de almacenamiento, en otras zonas (piel, superficie de cavidad abdominal), las *Aeromonas* se multiplican activamente. *Aeromonas hydrophila* es la especie mayoritaria en trucha arco iris y trucha común, mientras que, en lucio, predomina *Aeromonas veronii sobria*. Tanto en las aguas libres como en los peces en ellas capturados, los recuentos de *Aeromonas* son superiores a los hallados en las piscifactorías (previsiblemente por el empleo en éstas de compuestos antimicrobianos en el agua y en el pienso). La mayor parte de las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado de agua dulce son lipolíticas y proteolíticas.

CUARTA.- Algunas de las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado de agua dulce poseen ciertos factores de virulencia que sugieren no infravalorar el riesgo potencial derivado de su presencia. Los más destacados son la actividad proteasa (para *A. veronii sobria*) y las actividades hemolítica, citotóxica y enterotoxigénica (para *A. hydrophila*). Por otra parte, la mayor expresión de determinados factores de virulencia a 4°C que a 37°C, aunque reduce, en

principio, la importancia derivada de la presencia de estas cepas como agentes de infecciones alimentarias, puede favorecer (en determinadas circunstancias) el desencadenamiento de intoxicaciones alimentarias *sensu stricto*.

QUINTA.- En pescado almacenado en hielo picado, la evisceración tras la captura prolonga su vida útil entre un 22 y un 40% (2-4 días). El final de la vida útil no parece guardar relación con el número de microorganismos mesófilos y/o psicrotrofos, aunque la alteración de los ejemplares no eviscerados se asocia con recuentos inferiores (ca. 2 unidades logarítmicas /cm² o g) a los que presentan los eviscerados en la misma etapa.

SEXTA.- El coeficiente de correlación lineal para la regresión entre los recuentos (en unidades logarítmicas por unidad de peso, volumen o superficie) de microorganismos psicrotrofos y los de la flora aerobia mesófila viable se sitúa, para las muestras de ejemplares recién capturados en 0.89118, mientras que para la evolución de dichos recuentos durante el almacenamiento a refrigeración oscila entre 0.8489 y 0.9276.

SÉPTIMA.- Durante el almacenamiento en hielo picado, los recuentos de mesófilos y psicrotrofos siguen un patrón similar de evolución. Para ambos parámetros, el factor que parece condicionar en mayor medida su evolución lo constituyen las condiciones de mantenimiento de los peces desde su captura hasta la aplicación del frío (en general, a lo largo del almacenamiento, los recuentos de mesófilos y psicrotrofos se sitúan en niveles similares en lucio y trucha arco iris y son superiores en trucha común).

OCTAVA.- En el agua donde se capturan los peces, la flora mayoritaria está constituida por bacterias Gram negativas, aunque la diversidad e importancia de los distintos grupos microbianos dependen de la ubicación geográfica y de la flora analizada (mesófila o psicrotrofa). Por otra parte, la flora microbiana del agua es más heterogénea que la de los peces recién capturados. Los grupos microbianos predominantes en las distintas zonas de los peces recién capturados (agallas, intestino, piel) dependen de la especie de pescado, así, en lucio, predominan *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, en trucha común lo hacen las bacterias acidolácticas y las enterobacterias, mientras que en trucha arco iris (procedente de piscifactoría) destacan los bacilos Gram negativos aerobios, las vibrionáceas y las micrococáceas, no detectándose enterobacteriáceas.

NOVENA.- Las sucesiones microbianas durante el almacenamiento a refrigeración de los peces, están muy condicionadas por la composición de la flora inicial, de modo que, por un lado, en trucha común, la importancia porcentual de las asociaciones microbianas alterantes típicas (bacterias Gram negativas aerobias) se ve reducida por el predominio de las bacterias acidolácticas, cuya menor actividad alterante contribuye a explicar la reducida influencia que los mayores recuentos de microorganismos tienen en la vida útil de la trucha común. Durante el almacenamiento a refrigeración, la evolución de los grupos microbianos resulta en un predominio paulatino de las bacterias Gram negativas en detrimento de las Gram positivas. En general, la flora psicrotrofa refleja mucho mejor que la mesófila la composición de las asociaciones microbianas alterantes.

DÉCIMA.- Dentro de las bacterias Gram negativas aerobias móviles, la especie dominante varía con la especie de pescado, siendo *Pseudomonas fluorescens* en trucha común,

Pseudomonas putida en trucha arco iris y *Shewanella putrefaciens* en lucio. Entre las bacterias Gram negativas aerobias inmóviles aisladas de peces de agua dulce, son mayoritarias *Psychrobacter immobilis* (cuyas proporciones relativas tienden a aumentar durante el almacenamiento a refrigeración) y cepas, fenotípicamente próximas, de *Moraxella*.

UNDÉCIMA.- La mayor parte de las enterobacteriáceas aisladas de peces de agua dulce son capaces de multiplicarse a 4°C, lo que unido a su ubicuidad y las actividades bioquímicas de algunas cepas (de los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia* y *Proteus*, sobre todo) sugiere no despreciar su posible participación en la alteración de estos alimentos. Aunque los estudios genéticos revelan una gran proximidad entre el género *Aeromonas* y la familia *Enterobacteriaceae*, las cepas de ambos grupos microbianos procedentes de pescado de agua dulce son fenotípicamente bastante diferentes.

DUODÉCIMA.- La taxonomía numérica constituye un método satisfactorio para la clasificación de las bacterias Gram negativas aerobias móviles aisladas de peces de agua dulce. Empleando este método, las pruebas de mayor valor taxonómico corresponden a la utilización de determinados sustratos (L-arginina, L-lisina, etanol y glicocola) como única fuente de carbono, así como las capacidades hidrolizantes de gelatina y yema de huevo, junto con la actividad arginina dihidrolasa. La inclusión de cepas patrón como “guías” en la taxonomía numérica de cepas de bacterias Gram negativas mesófilas y psicrotrofas aisladas de peces de agua dulce tiene, en general, escasa utilidad, pues la mayor parte de las cepas de campo muestran un número considerable de características fenotípicas diferentes de las de los patrones.

DECIMOTERCERA.- La importancia de las micrococáceas en peces de agua dulce, considerando su relación con la contaminación de origen humano y/o animal, se deriva de su posible utilidad (sobre todo del género *Staphylococcus*, cuyas cepas son mayoritariamente mesófilas estrictas) como indicadores de las condiciones higiénicas durante la producción y manipulación del pescado.

DECIMOCUARTA.- La flora acidoláctica de los peces de agua dulce está constituida fundamentalmente por cepas de *Carnobacterium*, aunque tanto su evolución, como su escasa actividad bioquímica sugieren que su papel en la alteración de estos alimentos es muy reducido.

BIBLIOGRAFÍA

- ABABOUC, L.; M.M. ALAOUI y F.F. BUSTA. (1986) Histamine levels in commercially processed fish in Morocco. *J. Food Protect.* **49 (11)**, 904-908.
- ABBOT, S.L.; W.K.W. CHEUNG; S. KROSKE-BYSTROM; T. MALEKZADEM y J.M. JANDA. (1992) Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **30 (5)**, 1262-1266.
- ABEYTA, C.J.; C.A. KAYSNER; M.M. WEKELL; J.A. SULLIVAN y G.N. STELMA. (1986) Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *J. Food Protect.* **49 (8)**, 643-646.
- ABGRALL, B. y J.J. CLERET. (1990) Evaluation of Petrifilm™ SM for the enumeration of the aerobic flora of fish. *J. Food Protect.* **53 (3)**, 213-216.
- ABO, I.G. (1980) The bacterial flora of some freshwater fishes. *Arch. Lebensmittelhyg.* **31**, 181-183.
- ACUFF, G.; A.L. IZAT y G. FINNE. (1984) Microbial flora of pond-reared tilapia (*Tilapia aurea*) held on ice. *J. Food Protect.* **47 (10)**, 778-780.
- ADAMS, R.; L. FARBER y P. LERKE. (1964) Bacteriology of spoilage of fish muscle. II. Incidences of spoilers during spoilage. *Appl. Microbiol.* **12**, 277-279.
- ALDERSON G. (1985) *The current taxonomic status of the genus Micrococcus*. Ed. J. Jeljaszewicz. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. p. 117
- ALDOVA, E. (1995) *Plesiomonas shigelloides* in the Czech and Slovak Republics. *Alpe Adria Microbiol. J.* **2**, 95-104.
- ALLEN, D.A.; B. AUSTIN y R.R. COLLWELL. (1983a) *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 599-604.
- ALLEN, D.A.; B. AUSTIN y R.R. COLWELL. (1983b) Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2043-2062.
- ALSINA, M. y A.R. BLANCH. (1994) Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 719-721.

- ALTWEGG, M.; G. MARTINETTI-LUCCHINI; J. LÜTHY-HOTTENSTEIN y M. ROHRBACH. (1991) *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 44-45.
- ANDREWS, W.H.; C.R. WILSON; P.L. POELMA y A. ROMERO. (1977) Bacteriological survey of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at the retail level. *J. Food Sci.* **42**, 359-363.
- ANON. (1965) Recommendations of interest: Subcommittee of staphylococci and micrococci. *Int. Bull. Bacteriol. Taxo.* **15 (2)**, 107-110.
- ANON. (1978) *Bacteriology*. En: "Handbook of Manual Microtiter Procedures". Eds. T.B. Conrath y N.B. Coupe. The Whitefriars Press Ltd., London. p. 28
- ANON. (1986) "Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications". 2ª ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- ANON. (1989) "Iso-Grid^R Methods Manual". 3ª ed. Toronto.
- ANON. (1990) "The Oxoid Manual". 6ª ed. Oxoid, Basingtoke.
- APHA. (1984) "Standard methods for the examination of water and wastewater". 17ª ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington.
- APPLEYARD, J. y S.J. WALKER. (1995): Growth kinetics of three *Plesiomonas shigelloides* strains at chill temperatures. *5th Int. Aeromonas-Plesiomonas Symp.* (Edinburgh) p. 20 (Abstract).
- ARAI, T. y N. IKEJIMA. (1980) A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. *J. Hyg.* **84**, 203-211.
- ARAUJO, R.M.; R.M. ARRIBAS y R. PARES. (1991) Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 182-186.
- ARCOS, M.L.; A. VICENTE; M.A. MORIÑIGO; P. ROMERO y J.J. BORREGO. (1988) Evaluation of several selective media for recovery of *Aeromonas hydrophila* from polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **54 (11)**, 2786-2792.
- ASAO, T.; A. KINOSHITA; S. KOZAKI; T. UEMURA y G. SAKAGUCHI. (1984) Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.* **46**, 122-127.
- ASAO, T.; S. KOZAKI; Y. KINOSHITA; K. KATO; K. OTSU; T. UEMURA y G. SAKAGUCHI. (1986) Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 228-232.
- AUSTIN, B. (1982) Taxonomy of bacteria isolated from a coastal marine fish rearing unit. *J. Appl. Bacteriol.* **53**, 253-268.
- AUSTIN, B. (1985) Antibiotic pollution from fish farms: effects on aquatic microflora. *Microbiol. Sci.* **2**, 113-117.

- AUSTIN, B. y A.M.J. AL-ZAHRANI. (1988) The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* **33**, 1-14.
- AUSTIN, B. y D. ALLEN-AUSTIN. (1985) A review: bacterial pathogens of fish. *J. Appl. Bacteriol.* **58** (5), 483-506.
- AUSTIN, B. y D.A. AUSTIN. (1992) The sanitary quality of waters associated with fresh water aquaculture. *Microbiol. -Alim. -Nutr.* **10**, 303-311.
- AUSTIN B. y J.V. LEE. (1992) Aeromonadaceae and Vibrionaceae. En: "Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology". Ed. Society for Applied Bacteriology. p. 163
- AUSTIN, D.A.; D. McINTOSH y B. AUSTIN. (1989) Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp, with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **11** (3), 277-290.
- AXELSON T. (1993) *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. En: "Lactic acid bacteria". Ed. M.Dekker. New York, USA. p. 1
- BAIRD PARKER A.C. (1979) *Methods for identifying staphylococci and micrococci*. En: "Identification methods for microbiologists". Eds. F.A. Skinner y D.W. Lovelock. Academic Press, London. p. 201
- BAIRD PARKER, A.C. (1990) The staphylococci: an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 1s-8s.
- BAKER, D.A.; G. GENIGEORGIS; C. GLOVER y V. RAZAVILAR. (1990) Growth and toxigenesis of *Clostridium botulinum* type E in fishes packaged under modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 269-290.
- BARER, M.R.; S.E. MILLERSHIP y S. TABAQCHALI. (1986) Relationship of toxin production to species in the genus *Aeromonas*. *J. Med. Microbiol.* **22**, 303-309.
- BARILE, L.E.; M.H. ESTRADA; A.D. MILLA; A. REILLEY y A. VILLADSEN. (1985) Spoilage patterns of mackerel (*Rastrelliger faughni* Matsui). 2. mesophilic versus psychrophilic fish spoilage of tropical fish. *Asean Food J.* **1** (3).
- BARNES, E.M. (1985) Isolation methods for anaerobes in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **2**, 81-87.
- BAUMANN, L.; D. BAUMANN; M. MANDEL y R.A. ALLEN. (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.* **110**, 402-429.
- BAUMANN, P.; M. DOUDOROFF y R.J. STANIER. (1968a) A study of the *Moraxella* group I. Genus *Moraxella* and the *Neisseria catharralis* group. *J. Bacteriol.* **95**, 58-73.
- BAUMANN, P.; M. DOUDOROFF y R.J. STANIER. (1968b) A study of the *Moraxella* group II. Oxidase negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* **95**, 1520-1541.

- BAUMANN P.; M.J. GAUTHIER y L. BAUMANN. (1984b) *Genus Alteromonas*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; M.E. Sharpe; N.S. Mair y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 343
- BAUMANN P.; A.L. FURNISS y J.V. LEE. (1984a) *Genus Vibrio*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; M.E. Sharpe; N.S. Mair y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 518
- BAUMANN P. y R.H.W. SCHUBERT. (1984) *Family Vibrionaceae*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 516
- BAYA, A.M.; A.E. TORANZO; B. LUPIANI; T. LI; B.S. ROBERSON y F.M. HETRICK. (1991) Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp isolated from farmed and natural populations of stripped bass and catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (11), 3114-3120.
- BEN EMBAREK, P.K. (1994) Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 17-34.
- BENNOUR, M.; A. MARRAKCHI; N. BOUCHITRI; A. HAMAMA y M. OUADAA. (1991) Chemical and microbiological assessments of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. *J. Food Protect.* **54** (10), 789-792.
- BERNHEIMER, A.W. y L.S. AVIGAD. (1974) Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **9**, 1016-1021.
- BERGAN T. (1981) *Human and animal pathogenic members of the genus Pseudomonas*. En: "Prokaryotes. Vol. I". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows y H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. p. 666
- BERRANG, M.E.; R.E. BRACKET y L.R. BEUCHAT. (1989) Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2167-2171.
- BERTOLINI, J.M. y J.S. ROHOVEC. (1992) Electrophoretic detection of proteases from different *Flexibacter columnaris* strains and assessment of their variability. *Dis. Aquat. Org.* **12**, 121-128.
- BEUCHAT, L.R. (1991) Behaviour of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **13**, 217-224.
- BINTA, G.M.; T.B. TJABERG; P.N. NYAGA y M. VALLAND. (1982) Market fish hygiene in Kenya. *J. Hyg.* **89** (1), 47-52.
- BOULANGER, Y.; R. LALLIER y G. COISENEAU. (1977) Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Can. J. Microbiol.* **23**, 1161-1164.
- BOUVET, P.J.M. y P.A.D. GRIMONT. (1986) Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *A. baumannii* sp nov., *A. haemolyticus* sp nov., *A. johnsonii* sp nov. and *A. juni* sp nov. and emended descriptions of *A. calcoaceticus* and *A. lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 228-240.

- BOUVET, P.J.M. y S. JEAN-JEAN. (1989) Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol.* **140**, 291-299.
- BOVRE, K.; J.E. FLUGESANG; S.D. HENRIKSEN; S.P. LAPAGE; H.S. LAUTROP y J.J.S. SNELL. (1974) Studies on a collection of Gram negative bacterial strains showing resemblance to moraxellae: examination by conventional bacteriological methods. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **24**, 438-446.
- BOVRE K. (1984) *Genus Moraxella*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 296
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- BREMNER, A. (1991) To gut or not to gut?. *Austr. Fish.* **50 (1)**, 27.
- BRENDEN, R.A. y J.M. JANDA. (1987) Detection, quantitation and stability of the beta-haemolysin of *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.* **24**, 247-251.
- BRENDEN, R.A.; M.A. MILLER y J.M. JANDA. (1988) Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 303-316.
- BRENNER J. (1984) *Family Enterobacteriaceae*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 408
- BRYANT, T.N.; J.V. LEE; P.A. WEST y R.R. COLLWELL. (1986) Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 437-467.
- BURKE, V.; M. GRACEY; J. ROBINSON; D. PECK; J. BEAMAN y C. BUNDELL. (1983a) The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. *J. Infect. Dis.* **148**, 68-74.
- BURKE, V.; M. GRACEY; J. ROBINSON; D. PETERSON y K. PARTRIDGE. (1984) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 361-366.
- BURKE, V.; J. ROBINSON; H.M. ATKINSON; M. DIBLEY; R.J. BERRY y M. GRACEY. (1981a) Exotoxins of *Aeromonas hydrophila*. *AJEBAK* **59 (6)**, 753-761.
- BURKE, V.; J. ROBINSON; J. BEAMAN; M. GRACEY; M. LESMANA; P. ROCKHILL; P. ECHEVERRÍA y J.M. JANDA. (1983b) Correlation of enterotoxicity and biotype in *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1196-1200.
- BURKE, V.; J. ROBINSON; R.J. BERRY y M. GRACEY. (1981b) Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a suckling mouse test. *J. Med. Microbiol.* **4**, 401-408.

- BURT, J.R.; D.M. GIBSON; A.C. JASON y H.R. SANDERS. (1975) Comparison of methods of freshness assessment of wet fish. I.Sensory assessment of boxed experimental fish. *J. Food Technol.* **10**, 645-656.
- CAHILL, M.M. (1990) Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 1-16.
- CALLISTER, S.M. y W.P. AGGER. (1987) Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 249-253.
- CAMPBELL, A.C. y J.A. BUSWELL. (1983) The intestinal microflora of farmer dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 215-223.
- CARNAHAN, A.; T. CHAKRABORTY; G.R. FANNING; D. VERMA; A. ALI; J.M. JANDA y S.W. JOSEPH. (1991a) *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin susceptible species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1206-1210.
- CARNAHAN, A.; G.R. FANNING y S.W. JOSEPH. (1991b) *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *Aeromonas sobria*), a new sucrose negative species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 560-564.
- CARTWRIGHT, K.A.V. y B.G. EVANS. (1988) Salmon as food poisoning vehicle - two successive *Salmonella* outbreaks. *Epidem. Infect.* **101** (2), 249-257.
- CASTELL, C.H. y G.W. ANDERSON. (1948) Bacteria associated with spoilage of cod fillets. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **7**, 370-377.
- CASTELL, C.H.; J. DALE y M.F. GREENOUGH. (1959) Spoilage of fish in the vessels at sea. VI. Variations in the landed quality of trawler-caught Atlantic cod and haddock during a period of 13 months. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **16**, 223-233.
- CASTELL, C.H.; M.F. GREENOUGH y N.L. JENKINS. (1957) The action of *Pseudomonas* on fish muscle.2. Musty and potato-like odours. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **14**, 775-782.
- CASTELL, C.H. y M.F. GREENOUGH. (1957) The action of *Pseudomonas* on fish muscle.I. Organisms responsible for odours produced during incipient spoilage of chilled fish muscle. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **14**, 617-625.
- CASTELL, C.H. y E.G. MAPPLEBECK. (1952) The importance of *Flavobacterium* in fish spoilage. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **9**, 148
- CASTELL, C.H.; J.F. RICHARDS y I. WILMOTT. (1949) *Pseudomonas putrefaciens* from cod fillets. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **7**, 430-431.
- CAVARI, B.Z.; D.A. ALLEN y R.R. COLWELL. (1981) Effect of temperature on growth and activity of *Aeromonas* spp and mixed bacterial populations in the Anacostia river. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1052-1054.

- CHAI, T.; C. CHEN; A. ROSEN y R.E. LEVIN. (1968) Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish.II. Relative incidence of *Pseudomonas putrefaciens* and fluorescent pseudomonads on haddock fillets. *Appl. Microbiol.* **16**, 1738-1741.
- CHAKRABORTY, T.; M.A. MONTENEGRO; S.C. SANYAL; R. HELMUTH; E. BULLING y K.N. TIMMIS. (1984) Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.* **46**, 435-441.
- CHAMPION, A.B.; E.L. BARRET; N.J. PALLERONI; K.L. SODERBERG; R. KONISAWA; R. CONTOPOULOS; A.C. WILSON y M. DOUDOROFF. (1980) Evolution in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* **120**, 485-511.
- CHAMPSAUR, H.; A. ANDREMONT; D. MATHIEW; E. ROTTMAN y P. AUZEPY. (1982) Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*. *J. Infect. Dis.* **145**, 248
- CHARM, S.E.; S.J. LEARSON; L.J. RONSIVALLI y M.S. SCHWARZT. (1972) Organoleptic technique predicts refrigeration shelf life of fish. *Food Technol.* **26**, 65-68.
- CHOPRA, A.K. y C.W. HOUSTON. (1989) Purification and partial characterization of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* **35** (7), 719-727.
- CLAUS D. y R.C.W. BERKELEY. (1986) *Genus Bacillus*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1105
- COLLINS, M.D.; C. ASH; J.A.E. FARROW; S. WALLBANKS y A.M. WILLIAMS. (1989) 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov. sp. nov.. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 453-460.
- COLLINS, M.D.; J.A.E. FARROW; B.A. PHILLIPS; S. FERUSU y D. JONES. (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase negative, asporogenous, rod shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37** (4), 310-316.
- COLLINS, M.D.; A.M. WILLIAMS y S. WALLBANKS. (1990) The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 255-262.
- COLWELL, R.R. y J. LISTON. (1961) Taxonomic relationships among the Pseudomonads. *J. Bacteriol.* **82**, 1
- COLWELL, R.R.; M.T. McDONELL y J. DELEY. (1986) Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 473-477.
- CONDÓN, S.; M.L. GARCÍA; A. OTERO y F.J. SALA. (1992) Effect of culture age, preincubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 322-326.

- COOPER, R.G. y G.W. BROWN. (1968) *Plesiomonas shigelloides* in South America. *J. Clin. Pathol.* **21**, 715-718.
- COWAN, S.T. (1962) An introduction to chaos, or the classification of micrococci and staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* **25** (3), 324-340.
- COWAN, S.T. (1974) "Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria". 2^a ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- COX, J.M. y I.C. McRAE. (1989) A numerical taxonomic study of proteolytic and lipolytic psychrotrophs isolated from caprine milk. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 137-152.
- CUMBERBATCH, N.; M.J. GURWITH; C. LANGSTON; R.B. SACK y J.L. BRUNTON. (1979) Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. Relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect. Immun.* **23**, 829-837.
- DAILY, O.P.; S.W. JOSEPH; J.C. COOLBAUGH; R.I. WALKER; B.R. MERREL; D.M. ROLLINS; R.J. SEIDLER; R.R. COLLWELL y C.R. LISSNER. (1981) Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 769-777.
- DALGAARD, P.; L. GRAM y H.H. HUSS. (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 283-294.
- D'AOUST, J.Y.; R. GELINAS y C. MAISHMENT. (1980) Presence of indicator organisms and recovery of *Salmonella* in fish and shellfish. *J. Food Protect.* **43** (9), 679-682.
- DAWOOD, A.A.; R.N. ROY y C.S. WILLIAMS. (1986a) Quality of rainbow trout chilled stored after post catch holding. *J. Food Sci. Agric.* **37**, 421-427.
- DAWOOD, A.A.; R.N. ROY y C.S. WILLIAMS. (1986b) Effect of delayed icing on the storage life of rainbow trout. *J. Food Technol.* **21**, 159-166.
- DAWSON, C.A. y P.H.A. SNEATH. (1985) A probability matrix for the identification of vibrios. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 407-423.
- DE LA ROSA, M.C.; M.R. MOHINO; M. MOHINO y M.A. MOSSO. (1990) Characteristics of micrococci and staphylococci from semi-preserved meat products. *Food Microbiol.* **7**, 207-215.
- DE MAN, J.C.; M. ROGOSA y M.E. SHARPE. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
- DE PAOLA, A.; J.T. PEELER y G.E. RODRICK. (1995) Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of Gram negative bacteria in catfish ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (6), 2335-2340.
- DE VOS, P.; A. LANDSCHOOT; P. SEGERS; R. TYTGAT; M. GILLIS; M. BAUWENS; R. ROSSAU; M. GOOR; B. POT; K. KESTERS; P. LIZZARAGA y J. LEY. (1989) Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid: ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** (1), 35-49.

- DE VOS, P.K.; K. KERSTERS; E. FALSEN; B. POT; M. GILLIS; P. SEGERS y J. DE LEY. (1985) *Comamonas* Davis and Park 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 443-453.
- DEAN, A.G.; Y.C. CHING; R.G. WILLIAMS y L.B. HARDEN. (1972) Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* **25** (4), 407-411.
- DÖRING, B.; S. EHRHARDT; F.K. LÜCKE y U. SCHILLINGER. (1988) Computer-assisted identification of lactic acid bacteria from meats. *Syst. Appl. Bacteriol.* **11**, 67-74.
- DOUDOROFF M. y N.J. PALLERONI. (1974) *Genus Pseudomonas*. En: "Bergeys Manual of Determinative Bacteriology". Eds. S.T. Cowan; J.G. Holt; J. Liston; R.G.E. Murray; C.F. Niven; A.W. Ravin y R.Y. Stanier. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 217
- EDDY, B.P. y K.P. CARPENTER. (1964) Further studies on *Aeromonas*. II. Taxonomy of *Aeromonas* and C27 strains. *J. Appl. Bacteriol.* **27**, 96-109.
- EL MARRACKCHI, A.; M. BENNOUR; N. BOUCHITRI; A. HAMMAMA y H. TAGAFAIT. (1990) Sensory, chemical and microbiological assessment of moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J. Food Protect.* **53** (7), 600-605.
- ELEY, A.; I. GEARY y M.H. WILCOX. (1993) Growth of *Aeromonas* spp at 4°C and related toxin production. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 36-39.
- ENRIGHT, M.C.; P.E. CARTER; I.A. McLEAN y H. McKENZIE. (1994) Phylogenetic relationships between some members of the genera *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Moraxella* and *Kingella* based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** (3), 387-391.
- ESQUIVEL, M.R. (1994) "Asociaciones bacterianas que participan en la alteración de canales de perdiz roja (*Alectoris rufa*)". Tesina de Licenciatura. Universidad de León. León.
- ESTEVE, C.; C. AMARO; E. GARAY; Y. SANTOS y A.E. TORANZO. (1995a) Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 555-562.
- ESTEVE, C.; M.C. GUTIÉRREZ y A. VENTOSA. (1995b) *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from european eels. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** (3), 462-466.
- ESTEVE, C.; M.C. GUTIÉRREZ y A. VENTOSA. (1995c) DNA relatedness among *Aeromonas allosaccharophila* strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45** (2), 390-391.
- EVANS, J.B.; W.L. BRADFORD y C.F. NIVEN. (1955) Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* **5**, 61-66.

- EVANS, J.B. y W.E. KLOOS. (1972) Use of shake cultures in a semisolid thyoglicolate medium for diferentiating staphylococci from micrococci. *Appl. Microbiol.* **23** (2), 326-331.
- EVELYN, T.P.T. y L.A. McDERMOTT. (1961) Bacteriological studies of freshwater fish. I. Isolation of aerobic bacteria from several species of Ontario fish. *Can. J. Microbiol.* **7**, 375
- EWING, W.H. (1986) "Edward's and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*". 4^a ed. Elsevier Science Publishing Co, Inc., New York.
- FACINELLI, B.; P.E. VARALDO; M. TONI; C. CASOLARI y V. FABIO. (1989) Ignorance about *Listeria*. *British Med. J.* **229**, 738
- FARBER, J.M. (1991) *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food Protect.* **54** (12), 922-924.
- FELTHAM R.K.A. (1981) *A study of the taxonomy of the Micrococcaceae*. En: "Staphylococci and staphylococcal diseases". Ed. J. Jeljaszewicz. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. p. 3
- FERESU, S.B. y D. JONES. (1988) Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1165-1183.
- FERNÁNDEZ SALGUERO, J. y I.M. MACKIE. (1987) Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea harengus*) as determined by the formation of nonvolatile and volatile amines. *Int. J. Food Sci. Technol.* **22**, 385-390.
- FEUERPFEL, I.; J. JACOBS y E. SCHULZE. (1992) Investigations into the occurrence of aeromonads in a drinking water reservoir. *Bundesgesundheitsblatt* **35** (2), 55-61.
- FRANZMANN, P.D.; P. HOPFL; N. WEISS y B.J. TINDALL. (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antartica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **156**, 235-262.
- FREITAS, A.C.; M.P. NUNES; A.M. MILHOMEN y I.D. RICCIARDI. (1993) Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.* **56**, 62-65.
- FRENEY, J.; Y. BRUN; M. BES; H. MEUGNIER; F. GRIMONT; P.A.D. GRIMONT; C. NERVI y J. FLEURETTE. (1988) *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32** (2), 168-172.
- FRICKER, C.R. y S. TOMPSETT. (1989) *Aeromonas* spp in foods: a significant cause of food poisoning?. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 17-23.
- FRICOURT, B.V.; S.F. BAREFOOT; R.F. TESTIN y S.S. HAYASAKA. (1994) Detection and activity of plantaricin F, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF 001 isolated from processed channel catfish. *J. Food Protect.* **57** (8), 698-702.

- GARCÍA, M.C.; A. OTERO; M.L. GARCÍA; M.R. GARCÍA y B. MORENO. (1988) Species identification of staphylococci and micrococci isolated from ewe's milk cheeses. *J. Dairy Res.* **55**, 269-276.
- GARCÍA-ARMESTO, M.R.; M. PRIETO; C. ALONSO; M.L. GARCÍA-LÓPEZ; M.C. GARCÍA-FERNÁNDEZ y A. OTERO. (1993) Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes milk. *J. Dairy Res.* **60**, 371-383.
- GAVINI, F.; B. HOLMES; D. IZARD; A. BEJI; A. BERNIGAUD y E. JAKUBCZAC. (1989) Numerical taxonomy of *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas stutzeri* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** (2), 135-144.
- GELMAN, A.; R. PASTEUR y M. RAVE. (1990) Quality changes and storage life of common carp (*Cyprinus carpio*) at various storage temperatures. *J. Sci. Food Agric.* **52** (2), 231-247.
- GEMMELL, C.G. (1984) Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *J. MFD Microbiol.* **17**, 217-235.
- GENNARI, M.; M. ALAQUA; F. FERRI y M. SERIO. (1989) Characterization by conventional methods and genetic transformation of *Neisseriaceae* (*Psychrobacter* and *Acinetobacter*) isolated of fresh and spoiled sardines. *Food Microbiol.* **6**, 199-210.
- GENNARI, M. y S. TOMASELLI. (1988) Changes in aerobic microflora of skin and gills of mediterranean sardines (*Sardina pilchardus*) during storage in ice. *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 341-347.
- GHANEN, E.H.; M.E. MUSSA y H.M. ERAKI. (1993) *Aeromonas*-associated gastroenteritis in Egypt. *Zentralbl. Mikrobiol.* **148** (6), 441-447.
- GIBSON, D.M. (1985) Predicting the shelf life of packaged fish from conductance measurements. *J. Appl. Bacteriol.* **58** (5), 465-469.
- GILLESPIE, N.C. (1981) A numerical taxonomy study of *Pseudomonas*-like bacteria isolated from fish in Southeastern Queensland and their association with spoilage. *J. Appl. Bacteriol.* **50** (1), 29-44.
- GILLESPIE, N.C. y N.M. MACRAE. (1975) The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *J. Appl. Bacteriol.* **39**, 91-100.
- GOBAT, P.F. y T. JEMMI. (1993) Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 117-120.
- GOBAT, P.F. y T. JEMMI. (1995) Comparison of seven selective media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 375-384.
- GOLDEN, D.A.; M.J. EYLES y L.R. BEUCHAT. (1989) Influence of modified atmosphere storage on the growth of uninjured and heat-injured *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (11), 3012-3015.

- GÓMEZ, M.C.; J. CAÑADA y A. MORAL. (1990) El valor K como índice de calidad del pescado. I. Fundamentos y factores que lo modifican. *Alimentaria* **Oct90**, 37-45.
- GOODFELLOW M.; G. ALDERSON; G. PETERS; F. SCHUMACHER-PERDREAU y G. PULVERER. (1981) *Numerical classification of coagulase negative staphylococci*. En: "Staphylococci and staphylococcal diseases". Ed. J. Jeljaszewicz. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 9
- GOODWIN, C.S.; W.E.S. HARPER; J.K. STEWART; M. GRACEY y V. BURKE. (1983) Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* and diarrhoea in adults. *Med. J. Austr.* **1**, 25-26.
- GRACEY, M.; V. BURKE y J. ROBINSON. (1982a) *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Lancet* **ii**, 1304-1306.
- GRACEY, M.; V. BURKE; R. ROCKHILL y G. SUHARYONO. (1982b) *Aeromonas* species as enteric pathogens. *Lancet* **1**, 223-224.
- GRAM, L. (1991) Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp on fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke and chilling. *J. Food Protect.* **54 (6)**, 436-442.
- GRAM, L. (1992) Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *Int. J. Food Microbiol.* **16**, 25-39.
- GRAM, L.; J. OUNDO y J. BON. (1989) Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) dependent on storage temperature and initial bacterial load. *Tropic. Sci.* **29**, 221-236.
- GRAM, L.; G. TROLLE y H.H. HUSS. (1987) Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **4**, 65-72.
- GRAM, L.; C. WEDELL-NEERGARD y H.H. HUSS. (1990) The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victoria Nile Perch (*Lates niloticus*). *J. Food Microbiol.* **10**, 303-316.
- GRAY, P.A. y D.J. STEWART. (1980) Numerical taxonomy of some marine Pseudomonads and Alteromonads. *J. Appl. Bacteriol.* **49**, 375-383.
- GRIMES, D.J.; D. JACOBS; D.G. SWARTZ; P.R. BRAYTON y R.R. COLWELL. (1993) Numerical taxonomy of Gram negative, oxidase positive rods from Carcharhinid sharks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43 (1)**, 88-98.
- GUYER, S. y T. JEMMI. (1990) Investigation in fish processing plants: incidence of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon. *Arch. Lebensmittelhyg.* **41**, 144-146.
- HAMES, B.D. Y D. RICKWOOD. (1990) "Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach". 2ª ed. Oxford University Press, Oxford.
- HÄNNINEN, M.L. (1994) Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 455-462.

- HÄNNINEN, M.L.; S. SALMI; V. HIRVELÄ-KOSKI y A. SIITONEN. (1994): Distribution of mesophilic *Aeromonas* spp in environmental and clinical samples. *7th Int. Congr. Bacteriol. Appl. Microbiol. Div.* (Prague) p. 28 (Abstract).
- HANSEN, P. (1973) Quality and storage life of iced trout. *A. R. Fiskerim. Forsøgslab (DK)* 42-50.
- HANSEN, P. y B.R. JORGENSEN. (1965) Storage life of vacuum packed iced trout. *J. Sci. Food Agric.* **16**, 150-152.
- HARRIGAN, W.F. Y M.E. McCANCE. (1979) "Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos". Ed. Academia, León.
- HARTEMINK, R. y F. GEORGSON. (1991) Incidence of *Listeria* species in seafoods and seafood salads. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 189-196.
- HATHA, A.A.M. y P. LAKSHMANAPERUMALSAMY. (1995) Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from fish and crustaceans. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 47-49.
- HAVELAAR, A.H. y M. VONK. (1988) The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* species in water. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**, 169-171.
- HAZEN, T.C.; C.B. FLIERMANS; R.P. HIRSCH y G.W. ESCH. (1978) Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the US. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 731-738.
- HENDRIE M.S. y J.M. SHEWAN. (1979) *The identification of Pseudomonas*. En: "Identification Methods for Microbiologists". Eds. F.A. Skinner y D.W. Lovelock. Academic Press, London. p. 1
- HENRIKSEN, S.D. (1973) *Moraxella, Acinetobacter & The Mimaee*. *Bacteriol. Rev.* **37**, 522-561.
- HENRIKSEN, S.D. (1976) *Moraxella, Neisseria, Brahmanella and Acinetobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.* **30**, 63-83.
- HERBERT, R.A. (1975) Microbial ecology of fish spoilage. *Process Biochem.* **10 (10)**, 9-11.
- HERBERT, R.A.; J.R. ELLIS y J.M. SHEWAN. (1975) Isolation and identification of the volatile sulphides produced during chill storage of North Sea cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* **26**, 1187-1194.
- HERBERT, R.A.; M.S. HENDRIE; D.M. GIBSON y J.M. SHEWAN. (1971) Bacteria active in the spoilage of certain seafood. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 41-50.
- HERBERT, R.A. y J.M. SHEWAN. (1976) Roles played by bacteria and autolytic enzymes in the production of volatile sulphides in spoiling north sea cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* **27**, 89-94.

- HERNÁNDEZ HABA, J. Y F. DUBÓN PÉREZ. (1992) "Sistemática Bacteriana". 3ª ed. Valencia.
- HICKMAN-BRENNER, F.W.; G.R. FANNING; W.J. ARDUINO; D.J. BREUNNER y J.J. FARMER III. (1988) *Aeromonas schuberti*, a new manitol-negative species found in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1561-1564.
- HICKMAN-BRENNER, F.W.; K.L. McDONALD; A.G. STEIGERWALT; G.R. FANNING; D.J. BREUNNER y J.J. FARMER III. (1987) *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 900-906.
- HITCHENER, B.J.; A.F. EGAN y P.J. ROGERS. (1982) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 31-37.
- HIU, S.F.; R.A. HOLT; N. SRIRINGANATHAN; R.J. SEIDLER y J.L. FRYER. (1984) *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 393-400.
- HOBBS G. (1983) *Microbial spoilage of fish*. En: "Food Microbiology: Advances and Prospects". Eds. T.A. Roberts y E.A. Skinner. Academic Press, London. p. 217
- HOBBS G. y W. HODGKISS. (1982) *The bacteriology of fish handling and processing*. En: "Developments in Food Microbiology 1". Applied Science Publishers, London. p. 71
- HOLMES B.; R.J. OWEN y T.A. MCMEEKIN. (1984) *Genus Flavobacterium*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; M.E. Sharpe; N.S. Mair y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 353
- HOLZAPFEL, W.H. y E.S. GERBER. (1983) *Lactobacillus divergens* sp. nov. a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L(+)-lactate. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 522-534.
- HONDA, T.; M. SATO; T. NISHIMURA; H. HIGASHITSUTSUMI; K. FUKAI y T. MIWATANI. (1985) Demonstration of cholera toxin related factors in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* **50**, 322-323.
- HORSLEY, R.W. (1973) The bacterial flora of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in relation to its environment. *J. Appl. Bacteriol.* **36**, 377-386.
- HUANG, Y.W. y C.K. LEUNG. (1993) Microbial assessment of channel catfish grown in cage and pond culture. *Food Microbiol.* **10**, 187-195.
- HUDSON, J.A. y K.M. LACY. (1991) Incidence of motile aeromonads in New Zealand retail foods. *J. Food Protect.* **54** (9), 696-699.
- HUGH, R. y E. LEIFSON. (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **66**, 24-26.
- HUNTER, P.R. y S.H. BURGE. (1987) Isolation of *Aeromonas caviae* from ice cream. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**, 45-46.

- HUSS, H.H.; D. DALSGAARD; L. HANSEN; H. LADEFOGED; A. PEDERSEN y L. ZITTAN. (1974) The influence of hygiene in catch handling on the storage life of cod and plaice. *J. Food Technol.* **9**, 213-221.
- INAMURA, H.; K. MUROGA y T. NAKAI. (1984) Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish. Pathol.* **19**, 89-96.
- INGHAM, S.C. y N.N. POTTER. (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 Protect.* **51 (12)**, 966-970.
- INGRAM, M. y J.M. SHEWAN. (1960) Introductory reflections on the *Pseudomonas-Achromobacter* group. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 373
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIBRIONACEAE. (1992) Minutes of the meeting. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 199-201.
- ITO, H. y H. IIZUKA. (1983) Genetic transformation of *Moraxella*-like psychrotrophic bacteria and their radiation sensitivity. *Agric. Biol. Chem.* **47 (3)**, 603-605.
- JANDA, J.M. (1991) Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* **4 (4)**, 397-410.
- JANDA, J.M.; R.B. CLARCK y R. BRENDEN. (1985) Virulence of *Aeromonas* species as assessed through mouse lethality studies. *Curr. Microbiol.* **12**, 163-168.
- JAY, J.M. (1987) The tentative recognition of Psychrotrophic bacteria in 48 h. by their surface growth at 10°C. *Int. J. Food Microbiol.* **4**, 25-32.
- JAY J.M. (1992) *Incidence and types of microorganisms in foods*. En: "Modern Food Microbiology". Eds . Van Nostram Reinhold, London. p. 63
- JAYNE-WILLIAMS, D.J. (1976) The application of miniaturized methods for characterization of various organisms isolated from the animal gut. *J. Appl. Bacteriol.* **40**, 189-200.
- JEMMI, T. y A. KEUSCH. (1994) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish smoking plants. *Food Microbiol.* **11**, 309-316.
- JEPPESEN, V.F. y H.H. HUSS. (1993) Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 179-186.
- JOHNSON, W.M. y H. LIOR. (1981) Cytotoxicity and suckling mouse reactivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from human sources. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1019-1027.
- JONES D. (1986) *The Genus Erysipelothrix*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 1245

- JORGENSEN, B.R.; D.M. GIBSON y H.H. HUSS. (1988) Microbial quality and shelf life prediction of chilled fish. *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 295-307.
- JORGENSEN, B.R. y H.H. HUSS. (1989) Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 51-62.
- JUNI E. (1984) *Genus Acinetobacter*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 303
- JUNI, E. y G. HEYM. (1980) Transformation assay for identification of psychrotrophic achromobacter. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 1106-1114.
- JUNI, E. y G. HEYM. (1986) *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of gram negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 388-391.
- KAIN, K.C. y M.T. KELLY. (1989) Antimicrobial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* from patients with diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33** (9), 1609-1610.
- KÄMPFER, P. y M. ALTWEGG. (1992) Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 341-351.
- KÄMPFER, P.; I. TJENBERG y J. URSING. (1993) Numerical classification and identification of *Acinetobacter* genomic species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 259-268.
- KANDLER O. y N. WEISS. (1986) *Genus Lactobacillus*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 1209
- KAPER, J.; R.J. SEIDLER; H. LOCKMAN y R.R. COLLWELL. (1979) Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **38** (5), 1023-1026.
- KAPER, J.B.; H. LOCKMAN y R.R. COLWELL. (1981) *Aeromonas hydrophila*: ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 359-377.
- KARNOP, G. (1982) Die Rolle der Proteolyten beim Fischverderb. I. Optimierung der Methodik des Proteolytennachweises. II. Vorkommen und bedeutung der Proteolyten als Bakterielle Verderbsindikatoren. *Arch. Lebensmittelhyg.* **33**, 57-66.
- KARUNAKARAN, T. y B.G. DEVI. (1994) Characterization of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidem. Infect.* **112** (2), 291-298.
- KAY, B.A.; C.E. GUERREO y B. SACK. (1985) Media for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 888-890.
- KAZANAS, N. (1968) Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish. *Appl. Microbiol.* **16**, 128-132.

- KAZNOWSKI, A.; K. WLODARCZAC y H. PAEZT. (1989) A numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from water, sewage, water-oil emulsion and fishes. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**, 172-178.
- KEDDIE R.M.; M.D. COLLINS y D. JONES. (1986) *Genus Arthrobacter*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; M.E. Sharpe; N.S. Mair y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1288
- KERSTERS K. y J. DE LEY. (1984) *Genus Alcaligenes*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 361
- KIM, C.R. y J.O. HEARNSBERG. (1994) Gram negative bacteria inhibition by lactic acid culture and food preservatives on catfish fillets during refrigerated storage. *J. Food Sci.* **59** (3), 513-516.
- KIROV, S.M. (1993) The public health significance of *Aeromonas* spp in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 179-198.
- KIROV, S.M.; M.J. ANDERSON y T.A. Mc MEEKIN. (1990) A note on *Aeromonas* spp from chickens as possible foodborne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 327-334.
- KIROV, S.M.; E.K. ARDESTANI y L.J. HAYWARD. (1993) The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 159-168.
- KIROV, S.M. y F. BRODRIBB. (1993) Exotoxin production by *Aeromonas* spp in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 208-211.
- KIROV, S.M.; J.A. HUDSON; L.J. HAYWARD y S.J. MOTT. (1994) Distribution of *Aeromonas hydrophila* hybridization groups and their virulence properties in Australasian clinical and environmental strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 71-73.
- KIROV, S.M.; B. REES; R.C. WELLOCK; J.M. GOLDSMID y A.D. VAN GALEN. (1986) Virulence characteristics of *Aeromonas* spp in relation to source and biotype. *J. Clin. Microbiol.* **24** (5), 827-834.
- KLESZIUS, P.H. y V.T. SCHUHARDT. (1968) Use of lysostaphin in the isolation of highly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic *Micrococcaceae*. *J. Bacteriol.* **95** (3), 739-743.
- KLOOS, W.E. (1982) Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Newslett.* **4** (11), 75-78.
- KLOOS, W.E. (1990) Systematics and the natural history of staphylococci. 1. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 25S-27S.
- KLOOS, W.E. y T.L. BANNERMAN. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7** (1), 117-140.
- KLOOS, W.E. y K.H. SCHLEIFER. (1975) Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **1** (1), 82-88.

- KLOOS W.E. y K.H. SCHLEIFER. (1981) *The Genus Staphylococcus*. En: "Prokaryotes. Vol. II". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows y H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. p. 1548
- KLOOS W.E. y K.H. SCHLEIFER. (1986) *Genus IV. Staphylococcus*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 1013
- KLOOS, W.E.; T.G. TORNABENE y K.H. SCHLEIFER. (1974) Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *M. lylae* and *M. kristinae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24** (1), 79-101.
- KNOCHEL, S. (1989a) The suitability of four media for enumerating *Aeromonas* spp from environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 67-69.
- KNOCHEL, S. (1989b) Effect of temperature on haemolysin production in *Aeromonas* spp isolated from warm and cold environments. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 225-235.
- KNOCHEL, S. (1990) Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp isolated from different environments. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 235-244.
- KNOCHEL, S. y C. JEPPESEN. (1990) Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 317-322.
- KOBATAKE, M.; N.J.W. KREGER VAN RIG; M. TERESA; L.C. PLACIDO y N. VAN UDEN. (1992) Isolation of proteolytic psychrotrophic yeasts from fresh raw seafoods. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 37-42.
- KOBURGER, J.A. y C.L. WALCQUIST. (1979) Identification of *Enterobacteriaceae* isolated from seafoods. *J. Food Protect.* **42** (12), 956-957.
- KOCUR M. (1986) *Genus I. Micrococcus*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 1004
- KOCUR M. y K.H. SCHLEIFER. (1981) *The Genus Planococcus*. En: "Prokaryotes. Vol. II". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows y H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. p. 1570
- KODAMA, H.; M. MOUSTAFA; S. ISHIGURO; T. MIKAMI y H. IZAWA. (1984) Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. *Am. J. Vet. Res.* **45** (10), 2203-2207.
- KONEMANN, E.W.; S.D. ALLEN; V.R. DOWELL Y H.M. SOMMERS. (1989) "Diagnóstico microbiológico". Ed. Médica Panamericana, Mexico.
- KOZAKI, S.; K. KATO; T. ASAO; Y. KAMATA y G. SAKAGUCHI. (1987) Activities of *Aeromonas hydrophila* hemolysins and their interaction with erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* **55**, 1594-1599.

- KROVACEK, K.; A. FARIS y I. MANSSON. (1991) Growth and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **13** (2), 165-172.
- KROVACEK, K.; A. FARIS; S.B. BALODA; T. LINDBERG; M. PETERZ y I. MANSSON. (1992) Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol.* **9**, 215-222.
- KROVACEK, K.; V. PASQUALE; S.J. BALODA; V. SOPRANO; M. CONTE y S. DUMONTET. (1994) Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in southern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (4), 1379-1382.
- KUIJPER, E.J.; A.G. STEIGERWALT; B.S.C.I.M. SCHOENMAKERS; M.F. PEETERS; H.C. ZANEN y D.J. BRENNER. (1989) Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 132-138.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
- LANNELONGUE, M.; M.O. HANNA; G. FINNE; R. NICKELSON II y C. VANDERZANT. (1982) Storage characteristics of finfish fillets (*Archosargus probatocephalus*) packaged in modified gas atmospheres containing carbon dioxide. *J. Food Protect.* **46** (5), 434-440.
- LAYCOCK, R.A. y L.Q. REGIER. (1970) *Pseudomonas* and achromobacters in the spoilage of irradiated haddock of different preirradiation quality. *Appl. Microbiol.* **20**, 333-334.
- LE CHEVALLIER, M.W.; T.M. EVANS; R.J. SEIDLER; O.P. DAILY; B.R. MERREL; D.M. ROLLINS y S.W. JOSEPH. (1982) *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supply. *Microb. Ecol.* **8**, 325-333.
- LEE, J.V. y T.N. BRYANT. (1984) A numerical taxonomic study of *Aeromonas*. *J. Appl. Bacteriol.* **57** (3), xvii
- LEE, J.S. y D.K. PFEIFFER. (1975) Microbiological characteristic of Dungeness Crab (*Cancer magister*). *Appl. Microbiol.* **30**, 72-78.
- LEE, J.V.; D.M. GIBSON y J.M. SHEWAN. (1977) A numerical study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 439-451.
- LEE, S.S. y M. HARRISON. (1968) Microbial flora of Pacific Hake (*Merluccius productus*). *Appl. Microbiol.* **16**, 1937-1938.
- LELLIOT, R.A.; E. BILLING y A.C. HAYWARD. (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* **29**, 470-489.
- LENNON, D.; B. LEWIS; C. MANTELL; D. BECROFT; B. DOVE; K. FARMER; S. TONKIN; N. YEATES; R. STAMP y K. MICKELSON. (1984) Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis.* **3**, 30-34.
- LEÓN FAJARDO, L.R. y E.H. MARTH. (1979) Bacterial flora of fish from tropical seawater. *J. Food Protect.* **42** (9), 724-728.

- LERKE, P.; R. ADAMS y L. FARBER. (1963) Bacteriology of spoilage of fish muscle. I. Sterile press juice as a suitable experimental medium. *Appl. Microbiol.* **11**, 458-462.
- LERKE, P.; L. FARBER y R. ADAMS. (1967) Bacteriology of spoilage of fish muscle. IV. Role of protein. *Appl. Microbiol.* **15**, 770
- LEUNG, C.K.; Y.W. HUANG y M.A. HARRISON. (1992a) Fate of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* on packaged channel catfish fillets stored at 4°C. *J. Food Protect.* **55 (9)**, 728-730.
- LEUNG, C.K.; Y.W. HUANG y O.C. PANCORBO. (1992b) Bacterial pathogens and indicator in catfish and pond environments. *J. Food Protect.* **55 (6)**, 424-427.
- LEUNG, K.Y. y R.M.W. STEVENSON. (1988) Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 151-160.
- LEVINE, R.E. (1968) Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. I. Methodology. *Appl. Microbiol.* **16**, 1734-1737.
- LISTON, J. (1960) The bacterial flora of fish caught in the pacific. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 462-470.
- LISTON J. (1980a) *Fish, shellfish and their products*. En: "Microbial Ecology of Foods vol 2. Food Commodities". Ed. I.C.M.S.F. Academic Press, London. p. 567
- LISTON J. (1980b) *Microbiology in fishery science*. En: "Advances in Fishery Science and Technology". Ed. J.J. Connell. Fishing News Books, Farnham, Surrey. p. 138
- LJUNGH, A. y T. WADSTRÖM. (1982-1983) Toxins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **1**, 257-307.
- LJUNGH, A.; B. WRETLIND y R. MÖLLBY. (1981) Separation and characterization of enterotoxin and two hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* **89**, 387-397.
- LOBBEN, J.C. y J.S. LEE. (1968) Roles of microorganisms in the deterioration of rockfish. *Appl. Microbiol.* **16**, 1320
- LÓPEZ-SABATER, E.I.; J.J. RODRÍGUEZ-JEREZ; A.X. ROIG-SAGUES y M.T. MORA-VENTURA. (1994) Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tunna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J. Food Protect.* **57 (4)**, 318-323.
- LORIAN, V. (1989) In vitro simulation of in vitro conditions: physical state of the culture medium. *J. Clin. Microbiol.* **27 (11)**, 2403-2406.
- LOVETT, J.; D.W. FRANCIS y J.M. HUNT. (1988) *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Protect.* **50**, 188-192.
- MAJEED, K.; A. EGAN y I.C. McRAE. (1989) Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 165-170.
- MAJEED, K.N. y I.C. McRAE. (1991) Experimental evidence for toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in a meat extract at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 181-188.

- MAKARIOS-LAHAM, I.K. y R.W. TRAXLER. (1991) Kinetics of extracellular protease from the obligately psychrophilic *Vibrio* OP7 of fish origin. *J. Food Protect.* **54 (8)**, 578-581.
- MANCHESTER, L.N.; A. TOOLE y R. GOODACRE. (1995) Characterization of *Carnobacterium* species by pyrolysis mass spectrometry. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 88-96.
- MANTHEY, M.; KARNOP y H. REHBEN. (1988) Quality changes of european catfish (*Silurus glanis*) from warm water aquaculture during storage in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.* **23**, 1-9.
- MARTIN, R.E.; R.J.H. GRAY y M.D. PIERSON. (1978) Quality assessment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora. *FAO Comm. Ref. Series* **32 (5)**, 188-192.
- MARTÍNEZ MURCIA, A.J.; S. BENLLOCH y M.D. COLLINS. (1992a) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42 (3)**, 412-421.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J.; C. ESTEVE; E. GARAY y M.D. COLLINS. (1992b) *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**, 199-206.
- MATEOS, D.; J. ANGUITA; G. NAHARRO y C. PANIAGUA. (1993) Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 111-118.
- MATHIEU, F.; M. MICHEL; A. LEBRIHI y G. LEFEBVRE. (1994) Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk at various incubation temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 155-172.
- MAUGUIN, S. y G. NOVEL. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 616-625.
- McMEEKIN, T.A. y J.M. SHEWAN. (1978) Taxonomy strategies for *Flavobacterium* and related genera. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 321-332.
- McDONELL, M.T. y R.R. COLLWELL. (1985) Phylogeny of the *Vibrionaceae* and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 171-182.
- MILLER, M.L. y J.A. KOBURGER. (1986) Tolerance of *Plesiomonas shigelloides* to pH, sodium chloride and temperature. *J. Food Protect.* **49 (11)**, 877-879.
- MILLIERE, J.B.; M. MICHEL; F. MATHIEU y G. LEFEBVRE. (1994) Presence of *Carnobacterium* spp in french surface mould-ripened soft-cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 264-269.

- MITCHELL, T.G.; M.S. HENDRIE y J.M. SHEWAN. (1969) The taxonomy, differentiation and identification of *Cytophaga* species. *J. Appl. Bacteriol.* **32**, 40
- MÖLIN, G. y A. TERNSTRÖM. (1986b) *P. lundensis*, a new bacterial species isolated from meat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 328-331.
- MÖLIN, G. y A. TERNSTRÖM. (1986a) Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic pseudomonads isolated from spoiled meat, water and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 257-274.
- MÖLIN, G. y A. TERNSTRÖM. (1982) Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1249-1264.
- MOLITORIS, E.; M.A. MARI; S.W. JOSEPH; M.I. KRICHENSKY; G.R. FANNING; G. LAST; A.M. EL-MISHAD; Y.A. EL BATALI y R.R. COLWELL. (1989) Numerical taxonomy and deoxyribonucleic acid relatedness of environmental and clinical *Vibrio* species isolated in Indonesia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** (4), 442-449.
- MONFORT, P. y B. BALEUX. (1990) Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (7), 1999-2006.
- MONTEL, M.C.; R. TALON; J. FOURNAUD y M.C. CHAMPOMIER. (1991) A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp from meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 469-472.
- MORAL-RAMA, A. (1987) Métodos físico-químicos de control de calidad de pescados. *Alim. Equip. Tecnol.* **Mayo-Junio**, 115-122.
- MORAL-RAMA, A. y A. BELTRÁN. (1989) Tecnologías usadas en el pescado y su influencia sobre la calidad. *Alimentaria Dic89*, 37-45.
- MOSS, C.W.; P.L. WALLACE; D.G. HOLLIS y R.E. WEAVER. (1988) Cultural and chemical characterization of CDC group EO-2, M-5, and M-6, *Moraxella* sp., *Oligella uretralis*, *Acinetobacter* sp. & *Psychrobacter immobilis*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 484-492.
- MOSSEL, D.A.A. Y B. MORENO. (1985) "Microbiología de los Alimentos". Ed. Acibia S.A., Zaragoza.
- MYERS, B.R.; R.T. MARSHALL; J.E. EDMONSON y W.C. STRINGER. (1982) Isolation of pectinolytic *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* from vacuum packaged pork. *J. Food Protect.* **45**, 33-37.
- NAMDARI, H. y E.J. BOTTONE. (1988) Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1796-1798.
- NAMDARI, H. y V.J. CABELLI. (1989) The suicide phenomenon in motile *Aeromonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (3), 543-547.
- NEDOHULA, P.C. y D. WESTHOFF. (1993) Microbiological flora of aquacultured hybrid striped bass. *J. Food Protect.* **56** (12), 1054-1060.

- NEWMAN, J.T.; B.J. COSENZA y J.D. BUCK. (1972) Aerobic microflora of the blue fish (*Pomatomus saltatrix*) intestine. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **29**, 333-336.
- NISHIKAWA, Y. y T. KISHI. (1988) Isolation and characterization of motile aeromonas from human, food and environmental specimens. *Epidem. Infect.* **101**, 213-223.
- NISHIMURA, Y.; M. KINPARA y H. IIZUKA. (1989) *Mesophilobacter marinus* gen. nov., sp. nov.: an aerobic coccobacillus isolated from seawater. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** (4), 378-381.
- NÚÑEZ, J.A.; F.J. CHÁVARRI y M. NÚÑEZ. (1984) Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk, with particular reference to Gram negative rods. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 23-29.
- NZEAKO, B.C.; T.S. HASTINGS y A.E. ELLIS. (1991) Cultural conditions for *Aeromonas hydrophila* affect the production of haemolysins with differing host specificities. *Antonie van Leeuwenhoek* **60**, 67-72.
- O'CONNOR, R.E.; K.N. EWINGS; A.C. HAYWARD y P.K. ROURKE. (1986) Numerical taxonomy of proteolytic psychrotrophs from Queensland raw milk. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 25-38.
- OBERLENDER, V.; M.O. HANNA; R. MIGET; C. VANDERZANT y G. FINNE. (1983) Storage characteristics of fresh swordfish steaks stored in carbon dioxide-enriched controlled (flow-through) atmospheres. *J. Food Protect.* **46** (5), 434-440.
- OGDEN, I.D.; I.G. MILLAR; A.J. WATT y L. WOOD. (1994) A comparison of three identification kits for the confirmation of *Aeromonas* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 97-99.
- OKAFOR, N. y B.C. NZEAKO. (1985) Microbial flora of fresh and smoked fish from Nigeria fresh water. *Food Microbiol.* **2**, 71-75.
- OLIVIER, G.; R. LALLIER y S. LARIVIERE. (1981) A toxigenic profile of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* isolated from fish. *Can. J. Microbiol.* **27**, 330-333.
- ORTIGOSA, M.; E. GARAY y M.J. PUJALTE. (1993): Numerical taxonomy of aerobic, gram negative heterotrophic bacteria isolated from marine environment. *FEMS Meeting "Identification of bacteria present trends-future prospects"* (Granada) p. 121 (Abstract).
- PAGEL, J.E. y P.L. SEYFRIED. (1976) Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. *J. Gen. Microbiol.* **95**, 220-232.
- PALLERONI N.J. (1981) *Introduction to the family Pseudomonaceae*. En: "Prokaryotes. Vol. I". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows y H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. p. 655
- PALLERONI N.J. (1984) *Genus Pseudomonas*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 141

- PALLERONI, N.J. y M. DOUDOROFF. (1972) Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Annual. Rev. Phytopath.* **10**, 73-100.
- PALUMBO, S.A.; M.M. BENCIVENGO; F. CORRAL; A.C. WILLIAMS y R.L. BUCHANAN. (1989) Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 854-859.
- PALUMBO, S.A.; F. MAXINO; A.C. WILLIAMS; R.L. BUCHANAN y D.W. THAYER. (1985) Starch ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1027-1030.
- PALUMBO, S.A.; A.C. WILLIAMS; R.L. BUCHANAN y J.G. PHILLIPS. (1987) Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* **50**, 761-764.
- PALUMBO, S.A.; A.C. WILLIAMS; R.L. BUCHANAN y J.G. PHILLIPS. (1991) Model for the aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Protect.* **54** (6), 429-435.
- PANIAGUA, C.; O. RIVERO; J. ANGUITA y G. NAHARRO. (1990) Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 350-355.
- PARIZA, M.W. (1992) Rick assessment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **31** (3), 205-210.
- PATHAK, S.P.; J.W. BHATTACHERJEE; N. KALRA y S. CHANDRA. (1988) Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* in river water and isolation from river fish. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 347-352.
- PEDROSA-MENABRITO, A. y J.M. REGENSTEIN. (1988) Shelf-life extension of fresh fish- A review. I. Spoilage of fish. *J. Food Qual.* **11** (2), 117-127.
- PELÁEZ, C. (1989) Microbiología y control de calidad en el pescado. *Prod. Mar* **24**, 21-24.
- PELROY, G.A.; J.P. SEMAN y M.W. EKLUND. (1967) Changes in the microflora of irradiated petrale sole (*Eopsetta jordani*) fillets stored aerobically at 0.5°C. *Appl. Microbiol.* **15**, 92-96.
- PENN, R.G.; D.K. GIGER; F.C. KNOOP y L.C. PREHEIM. (1982) *Plesiomonas shigelloides* overgrowth in small intestine. *J. Clin. Microbiol.* **15**, 869-872.
- PETIT, A. (1987) Microbiologie des poissons. *RTVA Jun.*, 22-25.
- PILET, M.F.; X. DOUSSET; R. BARRE; G. NOVEL; M. DESMAZEAUD y J.C. PIARD. (1995) Evidence of two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* **58** (3), 256-262.
- PIN, C.; M.L. MARÍN; M.L. GARCÍA; J. TORMO y C. CASAS. (1994) Comparison of different media for the isolation and enumeration of *Aeromonas* spp in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 190-192.
- PIN, C.; M.L. MARÍN; D. SELGAS; M.L. GARCÍA; J. TORMO y C. CASAS. (1995) Differences in production of several extracellular virulence factors in clinical and food *Aeromonas* spp strains. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 175-179.

- POFFÉ, R. y E. OP DE BECK. (1991) Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 366-370.
- POPOFF M. (1984) *Genus Aeromonas*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 545
- POPOFF, M. y M. VERON. (1976) A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.* **94**, 11-22.
- POT, B.; L.A. DEVRIESE; J. HOMMEZ; C. MIRY; K. VANDEMEULEBROECKE; K. KERSTERS y F.M. HAESBROUCK. (1994) Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 362-369.
- POTOMSKI, J.; V. BURKE; J. ROBINSON; D. FUMAROLA y G. MIRAGLIOTTA. (1987) *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross-reactive with cholera toxin. *J. Med. Microbiol.* **235**, 179-186.
- POULTER, N.H. y L. NICOLAIDES. (1985) Quality changes in bolivian freshwater fish species during storage in ice. *FAO Fish. Rep.* **317 (Suppl.)**, 11-28.
- PRIEST F.G. y S.T. WILLIAMS. (1993) *Computer assisted classification*. En: "Handbook of new bacterial systematics". Eds. M. Goodfellow y A.G. O'Donell. Academic Press, London. p. 361
- PRIETO, M. (1990) "Asociaciones bacterianas que participan en la alteración de canales de ovino refrigeradas. Taxonomía, evolución e influencia de diversos factores". Tesis Doctoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de León, León.
- PRIETO, M. (1994) Integrated software for probabilistic identification of microorganisms. *Comp. Appl. Biosci.* **10 (1)**, 71-73.
- PRIETO, M.; M.R. GARCÍA-ARMESTO; M.L. GARCÍA-LÓPEZ; C. ALONSO y A. OTERO. (1992a) Species of *Pseudomonas* obtained at 7°C and 30°C during aerobic storage of lamb carcasses. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 317-323.
- PRIETO, M.; M.R. GARCÍA-ARMESTO; M.L. GARCÍA-LÓPEZ; A. OTERO y B. MORENO. (1992b) Numerical taxonomy of Gram-negative, nonmotile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **58 (7)**, 2245-2249.
- PRIETO, M.; M.R. GARCÍA-ARMESTO; C. GONZÁLEZ; A. OTERO y M.L. GARCÍA. (1995) Numerical characterization study of *Micrococcaceae* associated with lamb spoilage. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 251-263.
- RAHIM, Z.; S.C. SANYAL; H.M.S. AZIZ; M.I. HUQ y A.A. CHOWDHURY. (1984) Isolation of enterotoxigenic, hemolytic and antibiotic resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 865-867.

- RAUTELIN, H.; M.L. HÄNNINEN; A. SIVONEN; U. TURUNEN y V. VALTONEN. (1995) Chronic diarrhea due to a single strain of *Aeromonas caviae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14** (1), 51-53.
- RIPPEY, S.R. y V.J. CABELLI. (1979) Membrane filter for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 108-113.
- RIVERO, O.; J. ANGUITA; D. MATEOS; C. PANIAGUA y G. NAHARRO. (1991) Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 1-8.
- RIVERO, O.; J. ANGUITA; C. PANIAGUA y G. NAHARRO. (1990) Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **172**, 3905-3908.
- RODRÍGUEZ, R. (1994) La trucha: pionera de la acuicultura. *Prod. Mar* **73-74**, 77
- ROGOSA, M.; J.A. MITCHELL y R.F. WISEMAN. (1951) A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* **62**, 132-133.
- RORVIK, L.M.; D.A. CAUGANT y M. YNDESTAD. (1995) Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 19-27.
- ROSSAU, P.; A. VAN LANDSCHOOT; M. GILLIS y J. DELEY. (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41** (2), 310-319.
- ROUF, M.A. y M.M. RIGNEY. (1971) Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. *Appl. Microbiol.* **22**, 503-506.
- RUIMY, R.; V. BREITTMAYER; P. ELBAZE; O. BOUSSEMART; M. GAUTHIER y R. CHRISTEN. (1994) Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** (3), 416-426.
- RUTALA, W.A.; F.A. SARUBBI; C.S. FINCH; J.N. McCORMACK y G.E. STEINKRAUS. (1982) Oyster-associated outbreak of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *Lancet* **1**, 739
- RYDER, J.M.; G.C. FLETCHER; M.G. STEC y R.J. SEELYE. (1993) Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.* **28**, 169-180.
- SACKIN M.J. y D. JONES. (1993) *Computer-assisted classification*. En: "Handbook of new bacterial systematics". Eds. M. Goodfellow y A.G. O'Donell. Academic Press, London. p. 282
- SALAMA, N.A. y G.M. KHALAFALLA. (1992) Chemical, bacteriological and sensory changes in eel fish (*Anguilla vulgaris*) during smoking and storage. *Arch. Lebensmittelhyg.* **44**, 6-9.

- SANTOS, J. (1994) "Calidad microbiológica y control de *Aeromonas hydrophila* en queso de Villalón". Tesis Doctoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de León. León.
- SANTOS, J.A.; C.J. GONZÁLEZ; T.M. LÓPEZ-DÍAZ; M.L. GARCÍA-LÓPEZ y A. OTERO. (1996) Extracellular protease production by dairy strains of *Aeromonas hydrophila* as affected by growth media and incubation temperature. *Food Microbiol.* **13**, 47-51.
- SANYAL.S.C.; S.J. SINGH y P.C. SEHN. (1975) Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *J. Med. Microbiol.* **8**, 195-198.
- SCHILLINGER, U. y F.K. LÜCKE. (1987) Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* **4**, 199-208.
- SCHILLINGER, U.; M.E. STILES y W.H. HOLZAPFEL. (1993) Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 131-147.
- SCHLEIFER K.H. (1986) *Family Micrococcaceae*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1003
- SCHLEIFER, K.H. y R. KILPPER-BÄLZ. (1984) Transfer of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 31-34.
- SCHLEIFER, K.H. y R. KILPPER-BÄLZ. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 1-19.
- SCHLEIFER K.H.; W.E. KLOOS y M. KOCUR. (1981) *The Genus Micrococcus*. En: "Prokaryotes. Vol. II". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows; H.G. Schlegel y S. Springer-Verlag, Berlin. p. 1539
- SCHLEIFER K.H. y W.E. KLOOS. (1976) *Separation of staphylococci from micrococci*. En: "Staphylococci and staphylococcal diseases". Ed. J. Jeljaszewicz. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 3
- SCHLEIFER, K.H. y W.E. KLOOS. (1975) A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.* **1 (3)**, 337-338.
- SCHLEIFER, K.H.; J. KRAUS; C. DVORAK; R. KILPPER-BÄLZ; M.D. COLLINS y W. FISCHER. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 183-195.
- SCHMIDTKE, L.M. y J. CARSON. (1994) Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 229-236.
- SCHOEBITZ, R.; R. TAMAYO y M. DAVIS. (1985) Microbiological quality of the fish species *Trachurus murphyi*, sold at the retail level in the town of Valdivia, Chile. *Food Microbiol.* **2**, 243-247.

- SCHROTH M.N.; D.C. HILDEBRAND y M.P. STARR. (1981) *Phytopathogenic members of the Genus Pseudomonas*. En: "Prokaryotes. Vol. I". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows y H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. p. 701
- SCHUBERT R.H.W. (1984) *Genus Plesiomonas*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 548
- SCHUBERT, R.H.W. (1991) Aeromonads and their significance as potential pathogens in water. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **708**, 131S-135S.
- SCHUBERT, R.W. y M. HEGAZI. (1988) *Aeromonas eucrenophila* species nova, *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A* **268**, 34-39.
- SCHUMACHER F.; F. SCHUMACHER-PERDREAU y G. PULVERER. (1985) *Differentiation of micrococci and staphylococci: implications for routine diagnosis*. En: "The staphylococci". Ed. J. Jeljaszewicz. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 181
- SCOTT, D.N.; G.C. FLETCHER; M.G. HOGG y J.M. RYDER. (1986) Comparison of whole with headed and gutted orange roughy stored in ice: sensory, microbiology and chemical assessment. *J. Food Sci.* **51**, 79-83.
- SEIDLER, R.J.; D.A. ALLEN; H. LOCKMAN; R.R. COLLWELL; S.W. JOSEPH y O.P. DAILY. (1980) Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1010-1018.
- SHAW, B.G. y J.B. LATTY. (1988) A numerical taxonomy study of non-motile non-fermentative Gram negative bacteria from foods. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 7-21.
- SHAW, B.G. y C.G. HARDING. (1984) A numerical taxonomy study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. Bacteriol.* **56**, 25-40.
- SHAW, B.G. y C.G. HARDING. (1985) Atypical lactobacilli from vacuum packaged meats: comparison by DNA hybridization, cell composition and biochemical tests with a description of *Lactobacillus carnis* sp.nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 291-297.
- SHAW, B.G. y J.B. LATTY. (1982) A numerical taxonomy study of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled meat. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 219-228.
- SHAW, B.G. y J.M. SHEWAN. (1968) Psychrophilic spoilage of fish. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 89-96.
- SHAW, J.G.; J.P. THORNLEY y I. GEARY. (1995): Invasion of the tissue culture cells HEp-2 and CaCo-2 by *A. caviae*. *5th Int. Aeromonas-Plesiomonas Symp.* (Edinburgh) p. 11 (Abstract)
- SHAY B.J. y A.F. EGAN. (1981) *Hydrogen sulphide production and spoilage of vacuum-packaged beef by a Lactobacillus*. En: "Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity". Academic Press, London. p. 241

- SHELLEY, A.W.; H.C. DEETH y I.C. McCRAE. (1987) A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 197-207.
- SHEWAN, J.M. (1970) Bacteriological standards for fish and fishery products. *Chem. Ind.* 193
- SHEWAN, J.M. (1971) The microbiology of fish and fishery products. A progress report. *J. Appl. Bacteriol.* **34**, 299-315.
- SHEWAN, J.M.; G. HOBBS y W. HODGKISS. (1960b) A determinative scheme for the identification of certain genera of gram negative bacteria with special reference to *Pseudomonadaceae*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 379-390.
- SHEWAN, J.M.; G. HOBBS y W. HODGKISS. (1960a) The pseudomonas and achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 463-468.
- SHEWAN, J.M. y G. HOBBS. (1967) The bacteriology of fish spoilage and preservation. *Prog. Ind. Microbiol.* **6**, 169-208.
- SILVA, J.L. y T.D. WHITE. (1994) Bacteriological and color changes in modified atmosphere packaged refrigerated channel catfish. *J. Food Protect.* **57 (8)**, 715-719.
- SIMIDU, U.; K. KITA-TSUKAMOTO; T. YASUMOTO y M. YOTSU. (1990) Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **10**, 331-336.
- SINGH, D.V. y S.C. SANYAL. (1992) Haemolysin and enterotoxin production by *Aeromonas caviae* isolated from diarrhoeal patients, fish and environment. *J. Diarr. Dis. Res.* **10 (1)**, 16-20.
- SIRIMACO NEVES, M.; M. NUNES y I.D. RICCIARDI. (1990) Incidence of motile aeromonas species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.* **53 (1)**, 78-80.
- SKERMAN, V.B.D.; V. MCGOWAN y P.H.A. SNEATH. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 225-420.
- SLADE, P.J.; M.A. FALAH y A.M.R. AI-GHADY. (1986) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from bottled waters and domestic water supplies in Saudi Arabia. *J. Food Protect.* **49 (6)**, 471-476.
- SNEATH, P.H.A. (1957) The application of computers to taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* **17**, 201-226.
- SNEATH P.H.A. (1978a) *Classification of microorganisms*. En: "Essays in Microbiology". Eds. J.R. Norris y M.H. Richmond. John Wiley & sons ltd., Chichester. p. 1
- SNEATH P.H.A. (1978b) *Identification of microorganisms*. En: "Essays in Microbiology". Eds. J.R. Norris y M.H. Richmond. John Wiley and sons ltd., Chichester. p. 1

- SNEATH, P.H.A. y R. JOHNSON. (1972) The influence on numerical taxonomy similarities of errors in microbiological tests. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 377-392.
- SNEATH P.H.A. y D. JONES. (1986) *Genus Brochothrix*. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II". Eds. P.H.A. Sneath; N.S. Mair; M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1249
- SNEATH, P.H.A. Y R.R. SOKAL. (1973) "Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification". W.H. Freeman, San Francisco.
- SODDEL, J.A.; A.M. BEACHAM y R.J. SEVIOUR. (1993) Phenotypic identification of non-clinical isolates of *Acinetobacter* species. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 210-214.
- SOKAL, R.R. y C.D. MICHENER. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Kansas Univ. Bull.* **38**, 1409-1438.
- STACKEBRANDT, E.; R.G.E. MURRAY y H.G. TRUPER. (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes "the purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 321-325.
- STANIER, R.Y.; N.J. PALLERONI y M. DOUDOROFF. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomy study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-271.
- STECCHINI, M.L.; I. SARAIS y S. MILANI. (1993) The effect of incubation temperature, sodium chloride and ascorbic acid on the growth kinetics of *Aeromonas hydrophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 238-241.
- STELMA, G.N.; C.H. JOHNSON y P. SPAULDING. (1986) Evidence for the direct involvement of α -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.* **14**, 71-77.
- STENSTRÖM, I.M. (1985) Microbial flora of cod fillets (*Gadus morhua*) stored at 2°C in different mixtures of carbon dioxide and nitrogen/oxygen. *J. Food Protect.* **48**, 585-589.
- STENSTRÖM, I.M. y G. MÖLIN. (1990) Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 601-612.
- STOFFELS, G.; F.I. NES y A. GUOMUNSDÖTTIR. (1992) Isolation and properties of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* **73** (4), 309-316.
- STOFFELS, G.; H.G. SAHL y A. GUDMUNSDÖTTIR. (1993) Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various Gram positive bacteria including *Listeria* sp. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 199-210.
- STROM, A.R. y H. LARSEN. (1979) Anaerobic fish spoilage by bacteria. Biochemical changes in herring extracts. *J. Appl. Bacteriol.* **46**, 531-543.
- SUGITA, H.; T. NAKAMURA; K. TANAKA y Y. DEGUCHI. (1994) Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (8), 3036-3038.

- SUGITA, H.; T. NAKAMURA y Y. DEGUCHI. (1993) Identification of *Plesiomonas shigelloides* isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. *J. Food Protect.* **56 (11)**, 949-953.
- SUGITA, H.; K. TOKUYAMA y Y. DEGUCHI. (1985) The intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and tilapia (*Sarotherodon niloticus*). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **51**, 1325-1329.
- TANASUPAWAT, S.; Y. HASHIMOTO; T. EZAKI; M. KOZAKI y K. KOMATAGA. (1992) *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov. from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 577-581.
- TEJADA, M.; A. MORAL y A.J. BORDERÍAS. (1979) Quality indices in chilled trout: comparison of the K-values, the conventional indices and the values obtained by a panel of tasters. *XVth Int. Congr. Refrig. Proceed.* **Vol II**, 881-888.
- TERNSTRÖM, A.; A.M. LINDBERG y G. MOLIN. (1993) Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 25-34.
- THATCHER, F.S. y D.S. CLARK. (1968) Microorganisms in foods. *University of Toronto Press. Toronto.* 234
- THORNLEY, M.J. y M.E. SHARPE. (1959) Microorganisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic sporeformers. *J. Appl. Bacteriol.* **22**, 368-376.
- THORNLEY, M.J. (1960) The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 37-52.
- THORNLEY, M.J. (1967) A taxonomic study of *Acinetobacter* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **49**, 211-257.
- THUNE, R.L.; T.E. GRAHAM; L.M. RIDDLE y R.L. AMBORSKI. (1982) Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effects on age-0 channel fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **111**, 749-754.
- TODD, E.C.D. (1987) Impact of spoilage and foodborne diseases on national and international economies. *Int. J. Food Microbiol.* **4**, 83-100.
- TODD, E.C.D. (1989) Preliminary estimates of foodborne disease in the United States. *J. Food Protect.* **52 (8)**, 595-601.
- TORANZO, A.E.; Y. SANTON; T.P. NIETO y J.L. BARJA. (1986) Evaluation of different assay systems for identification of environmental *Aeromonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 652-656.
- TRÜPER H.G. y J. KRAMER. (1981) *Principles of characterization and identification of Prokaryotes*. En: "Prokaryotes. Vol.I". Eds. M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Trüper; A. Ballows y H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. p. 176
- TRUST, T.J. (1975) Bacteria associated with the gills of salmonid fishes in fresh water. *J. Appl. Bacteriol.* **38**, 225

- TRUST, T.J.; L.M. BULL; B.R. CURRIE y J.T. BUCKLEY. (1979) Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), golffish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **36**, 1174-1179.
- TRUST, T.J. y R.A.H. SPARROW. (1974) The bacterial flora in the alimentary tract of fresh water salmonid fish. *Can. J. Microbiol.* **20**, 1219-1228.
- TURNER, F.J. y B.S. SCHWARTZ. (1958) The use of lyophilized human plasm standardized for blood coagulations factors in the coagulase and fibrinolytic tests. *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 888-894.
- VADIVELU, J.; S.D. PUTHUCHEARY y P. NAVARATNAM. (1991) Exotoxin profiles of clinical isolates of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* **34 (6)**, 363-367.
- VALDIMARSSON, G. y B. GUDBJORNSDOTTIR. (1984) The microbiology of stockfish during the drying process. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 413-421.
- VAN LANDSCHOOT; R. ROSSAU y J. LEY. (1986) Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acinetobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36 (2)**, 150-160.
- VAN LANDSCHOOT, A. y J. DE LEY. (1983) Intra and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other Gram negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3057-3074.
- VAN SPREEKENS, K.J.A. (1977) Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **43**, 283-303.
- VARALDO, P.E.; R. KILPPER-BÄLZ; F. BIAVASCO; G. SATTA y K.H. SCHLEIFER. (1988) *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38 (4)**, 436-439.
- VARNAM, A.H. Y M.G. EVANS. (1991) "Foodborne pathogens. An illustrated text". Wolfe Publ., London.
- VENUGOPAL, R.J.; S.C. INGRAM; A.R. McCURDY y G.A. JONES. (1993) Anaerobic microbiology of fresh beef packaged under modified atmosphere or vacuum. *J. Food Sci.* **58**, 935-938.
- VENUGOPAL, R.J.; S.C. INGHAM y A.R. McCURDY. (1994) Identification of psychrotrophic *Micrococcaceae* spp isolated from fresh beef stored under carbon dioxide or vacuum. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 167-178.
- VENUGOPAL, V. (1990) Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: a review. *J. Food Protect.* **53 (4)**, 341-350.
- VON GRAEVENITZ A. y M. ALTWEGG. (1991) *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: "Manual of Clinical Microbiology". Eds. A. Ballows; W.J. Hausler; K.L. Herrmann; H.D. Isenberg y H.J. Shadomy. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 396

- VON GRAEVENITZ, A. y C. BUCHER. (1983) Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp from human feces. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 16-21.
- VON RHEINBABEN, K.E. y R.M. HADLOCK. (1981) Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **47**, 41-51.
- WADSTRÖM, T. y A. LJUNGH. (1988) Correlation between toxin formation and diarrhoea in *Aeromonas*. *J. Diarrh. Dis. Res.* **6**, 113-119.
- WALKER, S.J. y M.F. STRINGER. (1987) Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, xx
- WALLBANKS, S.; A.J. MARTÍNEZ-MURCIA; J.L. FRYER; B.A. PHILLIPS y M.D. COLLINS. (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** (3), 224-230.
- WARD, D.R. y N.J. BAJ. (1988) Factors affecting microbiological quality of seafoods. *J. Food Technol.* **42** (3), 85-89.
- WEAGANT, S.D.; P.N. SADO; K.G. COLBURN; J.D. TORKLESON; F.A. STANLEY; M.H. KRANE; S.C. SHIELDS y C.F. THAYER. (1988) The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Protect.* **51**, 655-657.
- WEMPE, J.W. y P.M. DAVIDSON. (1992) Bacteriological profile and shelflife prediction of White Amur (*Ctenopharyngodon idella*). *J. Food Sci.* **57** (1), 66-68,102.
- WEST, P.A.; P.R. BRAYTON; T.N. BRYANT y R.R. COLWELL. (1986) Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 531-543.
- WEST, P.A.; J.V. LEE y T.N. BRYANT. (1983) A numerical taxonomic study of species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 263-282.
- WILKINSON, B.J. y D. JONES. (1977) A numerical taxonomy survey of *Listeria* and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 399-421.
- WILLCOX, W.R.; S.P. LAPAGE; S. BASCOMB y M.A. CURTIS. (1973) Identification of bacteria by computer: theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 317-330.
- WILLIAMS, M.L.B. (1967) A new method for evaluating surface contamination of raw meat. *J. Appl. Bacteriol.* **30**, 498-499.
- WILLIAMS, A.M.; J.L. FRYER y D.M. COLLINS. (1990) *Lactococcus piscium* sp. nov. A new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 109-114.
- WILLIAMS, K.; K.D. PHILLIPS y A.T. WILLIS. (1988) A simple and sensitive method for detecting bacterial elastase production. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**, 173-176.
- WOESE, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbial Rev.* **51**, 221-271.

WYATT, L.E.; R. NICKELSON II y C. VANDERZANT. (1980) Effects of sampling procedures on *Salmonella* recovery from fresh water catfish. *J. Food Protect.* **43 (1)**, 44-45.

YOUSSEF, H.; A.K. EL-TIMAWY y S. AHMED. (1992) Role of aerobic intestinal pathogens of fresh water fish in transmission of human diseases. *J. Food Protect.* **55 (9)**, 739-740.

YOUSSEFF, H.; A. EL-TIMAWY y Y. HERNAWY. (1985) Microbial quality of freshwater fish. *Assiut Vet. Med. J.* **14**, 109-114.

ZORN, W.; E. GREUEL y J. KRÄMER. (1993) Beurteilung des Hygienestatus geräucherter, vacuumverpackter Forellenfilets. *Arch. Lebensmittelhyg.* **44**, 81-104.

FE DE ERRATAS

- En la figura V.14, los taxones VIII y IX no son "*P. fluorescens*" sino "*Pseudomonas* spp", el taxón X no es "*Pseudomonas* spp" sino "*P. fragi*" y el taxón XVI no es "NI" sino "*Pseudomonas* spp".

- En la página VIII.9, tabla VIII.2, el número real de cepas adscritas a *Vagococcus fluvialis* es de dos, mientras que sólo una se adscribió a *Lactococcus* spp.