

# Efecto de la cocción sobre la calidad microbiológica de camarones crudos provenientes del Lago de Maracaibo

*Marynés Montiel de Morales<sup>1\*</sup>, Zoraida Medina de Salcedo<sup>1</sup>,  
Gabriela Pérez Medina<sup>2</sup> y Yurimaua Perazzo<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Laboratorio de Microbiología Ambiental de Bacterias UIMA, <sup>2</sup>Laboratorio de Postgrado de Microbiología. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 20-07-05 Aceptado: 27-06-06

## Resumen

Los camarones son un producto altamente nutritivo por ser fuente de proteínas y otros componentes importantes para la dieta del ser humano. El manejo adecuado entre la captura, el transporte y el consumo es un elemento crucial en la calidad del producto final. El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la calidad microbiológica de los camarones que se expenden en la ciudad de Maracaibo y determinar los efectos de la temperatura en la misma. Treinta y un muestras de camarones fueron analizadas crudas y posterior a 2 min de cocción. Se realizaron análisis de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), aerobios mesófilos (AM) y *Staphylococcus aureus* siguiendo la metodología descrita por COVENIN. Valores de  $3 \times 10^1 - 1,8 \times 10^7$  UFC AM/g<sup>10</sup>;  $1,3 \times 10^2 - 2,4 \times 10^3$  de NMPCT/g y  $<2 - 2,4 \times 10^3$  de NMPCT/g fueron encontrados para camarones crudos y entre  $<3 \times 10^1 - 1,2 \times 10^5$  UFCAM/g;  $<2 - 1,6 \times 10^3$  NMPCT/g y  $<2 - 2,2 \times 10^1$  NMPCF/g para camarones cocidos. Los valores promedios encontrados para camarones crudos fueron  $2,4 \times 10^6$  UFC/g;  $1,6 \times 10^3$  NMP/g y  $5,2 \times 10^2$  NMP/g para AM, CT y CF, respectivamente y para camarones cocidos fueron de  $1,1 \times 10^4$  UFC AM/g,  $1,6 \times 10^2$  NMP CT/g y  $4,6 \times 10^0$  NMP CF/g. No se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* en la totalidad de las muestras analizadas. El porcentaje de reducción de AM, CT y CF fue de 99,5%, 89,7% y 99,2%. Los resultados demuestran que la cocción durante 2 min permite la reducción de los microorganismos estudiados a niveles aceptables por la normativa.

**Palabras clave:** Calidad; camarón; cocción; reducción microbiana.

## The effect of cooking on the microbiological quality of raw shrimp from Lake Maracaibo

### Abstract

Shrimp are a good source of protein and other dietary important source of components for human diet. Proper handling of shrimp between capture and delivery to the consumer is a crucial element in assuring quality of the final product. The objective of this research was to evaluate the microbiological quality of shrimp sold at Maracaibo city and to determine the temperature effect on this quality. Thirty one raw shrimp samples were studied before and after 2 min

\* Autor para la correspondencia. E-mail: mamontiel@luz.edu.ve

of boiling. Total coliforms (TC), fecal coliforms (FC), total aerobic plate count (APC) and *Staphylococcus aureus* were analyzed by COVENIN methods. Raw shrimp showed values between  $3 \times 10^1 - 1.8 \times 10^7$  for APC;  $1.3 \times 10^2 - 2.4 \times 10^3$  for TC and  $<2 - 2.4 \times 10^3$  for FC. By the other hand, in cooked shrimp values ranked between  $<3 \times 10^1 - 1.2 \times 10^5$  APC;  $<2 - 1.6 \times 10^3$  TC and  $<2 - 2.2 \times 10^1$  FC. The mean was  $2.4 \times 10^6$  CFU/g;  $1.6 \times 10^3$  MPN/g and  $5.2 \times 10^2$  MPN/g for APC, TC and FC, respectively in raw shrimp and  $1.1 \times 10^4$  CFU APC/g,  $1.6 \times 10^2$  MPN TC/g and  $4.6 \times 10^0$  MPN FC/g for cooked shrimp. *Staphylococcus aureus* was not isolated in any of the samples. APC, TC, and FC percent reduction of was 99.5%, 89.7% y 99.2%, respectively. We concluded that 2 min cooked shrimp are enough for microorganisms reduction to reach acceptable levels in national normative.

**Key words:** Microbian; quality; reduction; shrimp.

## Introducción

Los productos pesqueros que se ingieren crudos pueden acarrear riesgos para la salud del consumidor si no se toman precauciones antes de su ingesta. La microflora de los crustáceos crudos refleja en gran parte la calidad del agua donde se capturan, el ambiente del barco donde se transportan y de la planta donde es procesado. Igualmente la microflora se ve influenciada por la duración y tipo de almacenamiento (1).

Los mariscos son más perecederos que cualquier otro alimento alto en proteínas. En alimentos preparados a base de mariscos los cambios producidos en el sabor, olor, textura y color reflejan el nivel de frescura y/o contaminación, causada primariamente por actividad microbiana. El porcentaje de descomposición está influenciado por el número inicial y tipo de bacteria además de las condiciones de almacenamiento tales como temperatura, humedad y atmósfera (2). Debido a que los productos marinos son altamente susceptibles al deterioro, existe un interés continuo en la aplicación de métodos que mantengan su calidad en el tiempo como alimento (3).

El manejo apropiado de los alimentos marinos entre su captura y la adquisición por el consumidor es un elemento crucial en la calidad del producto final. Los estándares de sanidad, métodos de manejo y tiempo-temperatura de mantenimiento son todos factores significativos de calidad (4). En camarones la presencia de microorganismos depende de factores tales como: la cali-

dad del agua, el método de recolección y el área de almacenamiento (5).

El interés que se tiene por determinar la presencia de contaminación bacteriana en mariscos está relacionado por su potencial de causar enfermedades e intoxicaciones alimentarias (6) así como producir cambios en la textura y sabor del alimento (7) en muchos casos como resultado del mal manejo durante y después de la preparación del producto (2). La prevención de este tipo de enfermedades se puede llevar a cabo mediante la cocción, evitando la contaminación cruzada y con una refrigeración adecuada de los mariscos crudos (8). Particularmente, la cocción disminuye significativamente los recuentos bacterianos de los crustáceos, al destruir las formas vegetativas de las bacterias tanto alterantes como patógenas (1). Según Buchanan, 1991 (9) el camarón cocido industrialmente, es manejado apropiadamente cuando recibe una cocción suficiente para inactivar células vegetativas de bacterias potencialmente patógenas a los humanos. La presencia de bacterias patógenas en el producto después de su procesamiento se debe principalmente a un procesamiento térmico insuficiente, a la reintroducción de bacterias post-procesamiento y a la supervivencia y crecimiento de bacterias patógenas formadoras de esporas (9).

Entre las bacterias patógenas que se aíslan con mas frecuencia en alimentos preparados a base de mariscos se encuentran: *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos representa un peligro potencial para la salud pública, ya que muchas de sus

cepas producen enterotoxinas termoestables que causan envenenamiento alimentario (1). La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos indica contaminación de la materia prima y/o contaminación post-proceso provocada por contacto humano o exposición inadecuada del alimento a superficies no higienizadas (10). En consecuencia este microorganismo es utilizado como indicador de la integridad del proceso de manufactura de los productos, ya que mide el nivel de reintroducción de patógenos donde existe manipulación humana (9).

Otro indicador de calidad microbiológica de alimentos es *Escherichia coli*. El mismo se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua y alimentos (7). Esta bacteria es parte de la flora normal del tacto intestinal de los humanos y de animales de sangre caliente por lo que puede crecer a temperaturas relativamente altas (44.5 a 45°C) (2). En la industria alimenticia, *Escherichia coli* también se utiliza como un indicador de la calidad del proceso de manufactura, particularmente como indicador de la reintroducción de patógenos provenientes de fuentes ambientales. Si la presencia de *Escherichia coli* se detecta luego de la aplicación de un proceso termal adecuado en el alimento indica que los procesos de sanitización y control de temperatura no son los correctos (9).

La carne de camarón, en la cultura gastronómica occidental, es consumida después de un proceso de cocción el cual está indicado por el cambio de coloración de la musculatura (de grisáceo a rosado). Este margen de tiempo a temperatura de ebullición es corto, sin ser precisado exactamente, variando entre un minuto y dos.

La mayoría de los camarones consumidos en la ciudad de Maracaibo son obtenidos del Lago de Maracaibo y debido a la alta contaminación del mismo se han reportado coliformes fecales y *Staphylococcus aureus* en el músculo, así como *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas* en el exoesqueleto (5). La presencia de enterovirus en muestras de agua, sedimentos y camarones capturados en este cuerpo de agua también ha sido reportada previamente (11).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de los camarones provenientes del Lago de Maracaibo que se expenden en la ciudad de Maracaibo y determinar los efectos de la cocción en la misma.

## Materiales y Métodos

### Toma de Muestra

Treinta y un muestras (n=31) de camarones capturados del Lago de Maracaibo fueron recolectadas en mercados y vendedores ambulantes ubicados en las zonas de Santa Rita, La Cañada, San Francisco y Puerto Escondido. Los camarones fueron colocados en bolsas plásticas por el proveedor y transportados al laboratorio en una cava refrigerada hasta su procesamiento en un tiempo no mayor a 4 h.

### Procesamiento de la muestra

**Camarones crudos:** A los camarones se les removió la cabeza, cola, pedipodós y exoesqueleto (2).

**Camarones cocidos:** Los camarones fueron cocinados en agua destilada hirviendo durante dos minutos, posteriormente se procedió de la misma manera que los camarones crudos.

**Preparación del homogeneizado:** Se pesaron 25 g de muestra y se le agregaron a 225 mL de agua peptonada al 0,5%. Se homogeneizó en una licuadora en dos series de 30 segundos cada una (12).

### Estudios Microbiológicos

**Aerobios mesófilos (AM):** Para realizar el conteo de bacterias heterótrofas aeróbias mesófilas se prepararon diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$  en tubos con agua peptonada al 0,1%. Estas fueron sembradas en agar de conteo tripton-glucosa levadura (Merk, Germany) e incubadas a 37°C por 24-48 horas (13).

**Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF):** Series de 5 tubos con caldo Lauril Tripton (Merk, Germany) se inocularon con 10 mL, 1 mL y 0,1 mL del homogeneizado. Se incubaron a 37°C por 24-48 horas. Los tubos positivos se

inocularon en caldo Bilis Verde Brillante Lactosa 2% (Merk, Germany) para la determinación de coliformes totales y en caldo EC para la determinación de coliformes fecales (14).

**Aislamiento de *Escherichia coli*:** los CF se verificaron aislando en agar Eosina Azul de Metileno Levine (Merk, Germany) y realizando las respectivas pruebas bioquímicas para *E. coli* (14).

**Aislamiento de *Staphylococcus aureus*:** se inoculó por duplicado 0,1 mL de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en agar Baird Parker completo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas (15).

## Resultados y Discusión

La Tabla 1 presenta los valores de los rangos obtenidos de aerobios mesófilos (AM) (UFC/g), coliformes totales (CT) (NMP/g) y coliformes fecales (CF) (NMP/g) en camarones crudos y cocidos. Se encontraron valores entre  $<3 \times 10^1 - 1,8 \times 10^7$  de UFC AM/g;  $1,3 \times 10^2 - 2,4 \times 10^3$  de NMP CT/g y  $<2 - 2,4 \times 10^3$  de NMP CF/g para camarones crudos y entre  $<3 \times 10^1 - 1,2 \times 10^5$  UFC AM/g;  $<2 - 1,6 \times 10^3$  NMP CT/g y  $<2 - 2,2 \times 10^1$  NMP CF/g para camarones cocidos. Investigaciones previas muestran variabilidad en el rango de microorganismos en camarones crudos y cocidos. En camarones crudos congelados, se han reportado valores de AM entre  $1,2 \times 10^5 - 6 \times 10^7$  y  $1 \times 10^2 - 4,2 \times 10^6$  UFC/g (16, 17) y de CT  $1 \times 10^1 - 2,5 \times 10^3$  UFC/g y  $<3 - 2,3 \times 10^2$  NMP/g (17,18). Por otra parte en camarones cocidos los valores de AM se han encontrado entre  $1 \times 10^2 -$

$6,4 \times 10^4$  UFC/g y los de CT entre  $1 \times 10^1 - 1,8 \times 10^2$  UFC/g (17).

Los valores promedios encontrados para camarones crudos fueron  $2,4 \times 10^6$  UFC/g;  $1,6 \times 10^3$  NMP/g y  $5,2 \times 10^2$  NMP/g para AM, CT y CF, respectivamente (Tabla 1). Estudios previos han reportado valores de  $10^5$  UFC/g para camarones crudos conservados a 0°C (19-22).

En el presente trabajo se encontró un promedio de aerobios mesófilos en camarones crudos frescos de 10 veces más que lo reportado en camarones congelados. Estudios realizados por otros autores (16) han reportado valores similares en muestras de camarones frescos capturados en aguas costeras asiáticas. La presencia de microorganismos en estos animales pudiese estar relacionada con la procedencia del animal, ya que estudios han demostrado la presencia de microorganismos en camarones, agua y sedimento provenientes del Lago de Maracaibo (5, 11, 23), así mismo pudiese relacionarse con la manipulación y conservación de los animales, los cuales regularmente se almacenan en envases con agua fría o con poco hielo y son manipulados con las manos de los expendedores.

Los valores promedios en camarones cocidos fueron de  $1,1 \times 10^4$  UFC AM/g,  $1,6 \times 10^2$  NMP CT/g y  $4,6 \times 10^0$  NMP CF/g (Tabla 1). Reportes previos en muestras de camarones cocidos indican valores promedios de AM de entre  $1,7 \times 10^3$  y  $3 \times 10^3$  UFC/g (24, 25), valores de CT entre 0 y  $<3$  (20, 24) y valores de CF negativos (22, 25). Al

Tabla 1

Valores mínimos, máximos y promedios de microorganismos estudiados en muestras de camarones crudos y cocidos.

Microorganismos estudiados	Camarón crudo			Camarón cocido		
	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio
Aerobios mesófilos (UFC/g)	$<3 \times 10^1$	$1,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$<3 \times 10^1$	$1,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
Coliformes totales (NMP/g)	$1,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$<2$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$
Coliformes fecales (NMP/g)	$<2$	$2,4 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$<2$	$2,2 \times 10^1$	$4,6 \times 10^0$
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$<1$	$<1$	$<1$	$<1$	$<1$	$<1$

igual que en este trabajo los valores son menores en camarones cocidos que crudos.

No se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* en la totalidad de las muestras analizadas. Otros estudios han reportado la presencia de este organismo en camarones crudos y cocidos. Sedik y col, 1991 (20) encontraron valores de *S. aureus* entre  $3 \times 10^4$  y  $4 \times 10^2$  en camarones crudos y cocidos, respectivamente. Cunha y col, 2002 (26) reportaron valores de  $4 \times 10^2$  UFC/g de estafilococos en camarones crudos frescos. Hatha y col, 1995 (17) encontraron 0,1% en camarones crudos y 0% en camarones cocidos. La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos indica contaminación de la materia prima y/o contaminación post-proceso provocada por contacto humano o exposición inadecuada del alimento a superficies no higienizadas (10). En consecuencia este microorganismo es utilizado como indicador de la integridad del proceso de manufactura de los productos, ya que mide el nivel de reintroducción de patógenos donde existe manipulación humana (9).

Los camarones fueron evaluados crudos y después de 2 min de cocimiento en agua hirviendo. El porcentaje de reducción de AM, CT y CF fue de 99,5%, 89,7% y 99,2%, respectivamente (Figura 1). Harrison y Lee, 1968 (24) obtuvieron porcentajes de reducción similares (99,9%) para contajes de AM después de una cocción de 3 minutos en plantas procesadoras de camarones. Al realizar el análisis t de Student para cada una de las pruebas microbiológicas efectuadas se comprobó que existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre camarones crudos y cocidos, lo cual demuestra que la cocción del camarón durante 2 min permite la disminución de los contajes de aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales, haciendo del alimento un producto seguro y apto para el consumo humano.

En relación a las características organolépticas (aspecto, textura, olor y color), el 13% (4/31) de las muestras presentaron características no típicas según la norma COVENIN, 1993 (27) incluyendo olor desagradable, aspecto no fresco y textura poco consistente, sin embargo no hubo diferencia en relación a las muestras típicas con respecto a las can-

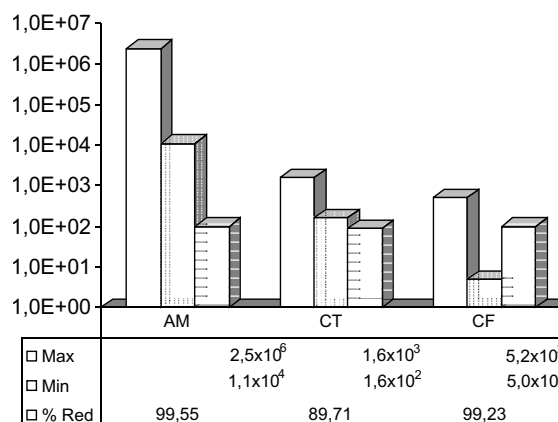


Figura 1. Mínimo, máximo y porcentaje de reducción de aerobios mesófilos (AM), coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en camarones crudos y cocidos.

tidades de microorganismos. Esto difiere por lo señalado por Cobb y col, 1977 (28) donde el desarrollo de olores pútridos en la mayoría de las instancias se relaciona a una alta densidad en el contaje de bacterias. Sin embargo debe tomarse en cuenta el tipo de bacterias presente en dichas muestras. Van Spreekens, 1977 (29) señala que olores fuertes son producidos en camarones presuntamente contaminados con *Alteromonas* o *Photobacterium*, lo cual altera su flora microbiana natural que esta compuesta por *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, y *Alteromonas* (16, 24, 30).

Los criterios microbiológicos para bacterias aerobias son ambiguos indicando en algunos casos valores de  $10^6$  como un producto deteriorado y en otros casos valores de  $10^8$ /g donde no se producen cambios objetables en la calidad (2). En Venezuela la única norma relacionada con calidad de camarones es la norma COVENIN 453-93 (27) la cual contiene los requisitos microbiológicos para camarones crudos congelados y cocidos congelados, estableciendo valores de  $1 \times 10^3$  UFC AM/g y  $1 \times 10^7$  UFC AM/g como límite mínimo y máximo respectivamente para camarones crudos y  $1 \times 10^6$  UFC AM/g y  $1 \times 10^7$  UFC AM/g en camarones cocidos. Al comparar con los resultados obtenidos en los camaro-

nes crudos observamos que el 10% (3/31) de las muestras sobrepasan dichos valores. Sin embargo una vez procesados todas las muestras cumplieron con la normativa establecida.

En relación a coliformes fecales el 29% (9/31) de los camarones crudos excedieron los límites máximos promedios permitidos por esta norma ( $4,6 \times 10^0$  NMP CF/g) alcanzando valores promedios de 520 NMP/g. En los camarones cocidos el tiempo de cocción aplicado fue suficiente para disminuir los valores a aceptables.

Se concluye con este trabajo que el tiempo de cocción de 2 minutos disminuye los valores de los indicadores y microorganismos estudiados en un porcentaje significativo alcanzando valores permitidos por la normativa nacional para camarones congelados cocidos.

### Referencias Bibliográficas

- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD. (ICMSF) **Microorganisms in Food 1: Their significance and methods of enumeration**, 2<sup>nd</sup> Ed. University of Toronto Press. (Canada), 1978.
- NICKELSON R., MC CARTHY S., FINNE, G. Fish, crustaceans and precooked seafoods (Eds. Vanderzant C., Splittstoesser, D.) En: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4<sup>th</sup> Ed. APHA. (USA), pp. 497-505, 2001.
- MIGET R. Microbiology of crustacean processing: shrimp, crawfish and prawns, (Eds. Ward D and Hackney C.) En: **Microbiology of marine food products**, Van Nostrand Reinhold, New York (USA), pp. 65-87, 1991.
- ALAM S., MOSTAFA G., HOSSAIN D. **Internat Journal of Food Safety** V: 21-23, 2005.
- MARCHESI L. Identificación de algunas bacterias patógenas para el hombre presentes en el camarón blanco (*Penaeus schmitti*) obtenidos del Lago de Maracaibo (Trabajo de Grado). Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), 1983.
- LAMMERDING A., FAZIL A., PAOLI G. Microbial food safety risk assessment. En: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> Ed. APHA. (USA), pp. 267-282, 2001.
- JENSEN M., WRIGHT D., ROBINSON R. **Microorganisms in foods. The scope of Microbiology**. 4<sup>th</sup> Ed. Prentice Hall Publ., pp.22-23, 201-202, 291, 302-303, 1997.
- GOH K. **Epidemiological News Bulletin** 28:15-17, 2002.
- BUCHANAN R. **Food Technology** 4:157-160, 1991.
- LANCET G., BENNET R. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. En: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> Ed. APHA. (USA), pp.387-403, 2001.
- BOTERO L., MONTIEL M., PORTO L. **Environmental Science Health A** 27: 2213-2226, 1992.
- COVENIN. Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. (1ra. Revisión) N°1126-89. Caracas. Fondonorma. 1989.
- COVENIN. Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri. (2da. Revisión). N°902-87. Caracas. Fondonorma. 1987.
- COVENIN. Determinación del Número Más Probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*. N°1104-96. Caracas. Fondonorma. 1996.
- COVENIN. Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. (1ra. Revisión) N°1292-89. Caracas. Fondonorma. 1989.
- ZUBERI R., QADRI R., SIDDIQUI P. **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene B** 181:418-429, 1985.

17. HATHA A., PAU, N., RAO B. **International Journal of Food Microbiology** 28:101-113, 1995.
18. BAER E., DURAN A., LEININGER H., READ R., SCHWAB A., SWARTZENTRUBER A. **Applied and Environmental Microbiology** 31:337-341, 1976.
19. SWARTZENTRUBER A., SCHWAB A., DURAN A., WENTZ B., READ R. **Applied and Environmental Microbiology** 40:765-769, 1980.
20. SEDIK M., ROUSHDY S., KHALAFALLA F., AWAD H. **Nahrung** 35:39-46, 1991.
21. SEYDI M., NIANG P. **Dakar Medicine** 38:17-22, 1993.
22. HATHA A., MAQBOOL T., KUMAR S. **International Journal of Food Microbiology** 81:113-121, 2003.
23. BOTERO L., MONTIEL M., PORTO L. **International Journal of Environmental Health Research** 6: 103-108, 1996.
24. HARRISON J., LEE J. **Applied Microbiology** 18:188-192, 1968.
25. VALDIMARSSON G., EINARSSON H., GUDBJÖRNSDOTTIR B., MAGNUSSON H. **Food Microbiology** 15: 511-519, 1998.
26. CUNHA A., SILVA C., STAMFORD T. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 22:263-271, 2002.
27. **COVENIN**. Camarones congelados. N°453-93. Caracas. Fondonorma. 1993.
28. COBB B., YEH C., CHRISTOPHER F., VANDERZANT C. **J. Food Protection** 40:256-260, 1977.
29. VAN SPREERKENS K. **Antonie Van Leeuwenhoek** 43:283-303, 1977.
30. LEE J., PKEIFER D. **Applied and Environmental Microbiology** 33:853-859, 1977.