

## Efectos del daño de la mosca del olivo y del atroje sobre la microflora en pasta y la acidez del aceite virgen de oliva

Por L.M. Torres-Vila<sup>a</sup>, M.C. Rodríguez-Molina<sup>b</sup> y J.A. Martínez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Avda. de Portugal s/n, E-06800 Mérida, Badajoz, Spain. E-mail: ltorresv@aym.juntaex.es

<sup>b</sup>Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico (SIA). Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Avda. de Portugal s/n, E-06800 Mérida, Badajoz, Spain

<sup>c</sup>Departamento de Producción Agraria. ETS de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo de Alfonso XIII, 52, E-30203 Cartagena, Spain

### RESUMEN

#### Efectos del daño de la mosca del olivo y del atroje sobre la microflora en pasta y la acidez del aceite virgen de oliva.

Se estudiaron los efectos del daño de mosca, atroje, fecha de recolección, parcela de olivo y de sus interacciones, sobre la microflora asociada a la pasta de aceituna y la acidez del aceite obtenido. Microflora y acidez se vieron significativamente afectados por los cuatro factores estudiados y por varias de sus interacciones. Daño y atroje interactuaron sinérgicamente para incrementar la acidez. La relación entre el daño de mosca y la acidez fue lineal aunque a veces no fue significativa dependiendo de la microflora. La relación entre la microflora y la acidez se ajustó a un modelo logarítmico. Los microorganismos predominantes en la pasta fueron bacterias (*Xanthomonas*), levaduras (fundamentalmente *Torulopsis* y *Candida*) y en menor medida otros hongos (principalmente *Fusarium* y *Penicillium*). Los resultados sugieren que un umbral de daño cualitativo basado en el porcentaje de frutos picados para inferir la acidez del aceite es de difícil implementación.

**PALABRAS-CLAVE:** Aceite de oliva virgen – Acidez – Atraje – *Bactrocera oleae* – Microflora – Mosca del olivo.

### SUMMARY

#### Olive fly damage and olive storage effects on paste microflora and virgin olive oil acidity.

The effects of olive fly damage, olive storage, harvest date, olive grove plot and their interactions on the microflora associated with olive paste and oil acidity were studied. Microflora and oil acidity were significantly affected by the four studied factors and by several interactions between them. Fly damage and olive storage interacted synergically increasing oil acidity. The relationship between fly damage and oil acidity was lineal although sometimes it was not significant depending on microflora populations. The relationship between microflora populations and oil acidity fitted to a logarithmic model. Major microorganisms in olive paste were bacteria (*Xanthomonas*), yeasts (mostly *Torulopsis* and *Candida*) and in a smaller measure moulds (mainly *Fusarium* and *Penicillium*). Results overall suggest that a qualitative damage threshold based on the percentage of damaged fruits in order to infer oil acidity may be unfeasible in most instances.

**KEY-WORDS:** *Bactrocera oleae* – Microflora – Oil acidity – Olive fly – Olive storage – Virgin olive oil.

### 1. INTRODUCCIÓN

El daño causado por las larvas de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmelin) en la aceituna "de vuelo" y el posterior atroje de los frutos en las almazaras están considerados como las principales causas de la pérdida de calidad del aceite de oliva virgen (Neuenschwander y Michelakis, 1978; Pucci et al., 1979; Neuenschwander et al., 1986; Civantos et al., 1992; De Andrés-Cantero, 1997). Los daños larvarios de la mosca favorecen la colonización y el desarrollo de una variada microflora saprofita que origina podredumbres y fermentaciones en los frutos. El atroje, especialmente si tiene lugar en malas condiciones, promueve asimismo en gran medida al desarrollo de la microflora. El efecto más adverso de la proliferación de la microflora es la hidrólisis de los triglicéridos catalizada por las lipasas microbianas, lo que se traduce en un incremento de la acidez del aceite a veces intolerable (Müller, 1981; Civantos et al., 1992). En consecuencia, la acidez del aceite es un fiel reflejo de la historia microbiológica de los frutos y garantía de calidad sanitaria y alimentaria. Ambos factores, daño de mosca y atroje, pueden tener por ello un efecto nefasto sobre la calidad del aceite, con lo que la obtención de aceite virgen extra se ve a menudo comprometida.

En este contexto, existe evidencia circunstancial de que la evolución de la acidez durante el atroje puede verse modulada en gran medida por el daño previo de mosca en los frutos atrojados. Sin embargo, el probable sinergismo entre ambos factores no está bien documentado. En consecuencia, en este trabajo se intentaron cuantificar los efectos respectivos del daño de mosca y del atroje sobre la acidez del aceite en un conjunto de muestras de aceituna que se molidieron, bien inmediatamente, o tras un atroje de una semana en condiciones controladas. Adicionalmente, en un subconjunto de esas muestras y siguiendo un diseño experimental más completo, se estudiaron los efectos relativos del daño de mosca, del atroje, del mes de recolección, de la par-

cela (i.e. del propio olivar) y de sus interacciones sobre la composición cuantitativa y cualitativa de la microflora asociada a la pasta y sobre la acidez del aceite obtenido de ella. Adicionalmente se investigaron las correlaciones existentes entre el daño larvario en fruto, la microflora en pasta y la acidez del aceite obtenido. Un objetivo intrínseco a dichas correlaciones fue el de evaluar la viabilidad de un umbral cualitativo de daño basado en el porcentaje de frutos picados que permitiese inferir la acidez del aceite obtenido.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestreos

Durante los años 1999-2001 se efectuaron 10 muestreos en olivares de Extremadura de distintas variedades (Tabla I) cuyos frutos se encontraban dañados, en mayor o menor medida, por la mosca del olivo. Se recolectaron 10-15 kg de aceitunas por muestreo, exclusivamente del árbol ("vuelo"), a partir de 3-6 árboles. Seis de los muestreos en la campaña 2000-2001 se llevaron a cabo en dos parcelas fijas (Montijo y La Nava), recolectando tres veces en cada parcela en los meses de noviembre, diciembre y enero, para así cubrir todo el periodo de recolección (Tabla I).

### 2.2. Preparación de las muestras de aceituna

En el laboratorio las aceitunas de cada muestreo se separaron en dos clases, con y sin agujero de salida del adulto de mosca. Los frutos dudosos que presentaron daños de otro tipo, sobremadurez o podredumbres sin daño visible de mosca se eliminaron (< 10%). A partir de ambas clases de aceituna ("sanas" y "picadas") se prepararon seis submuestras (~1 kg) con 0, 20, 40, 60, 80 y 100% (en peso) de aceituna picada. Tras mezclar bien los frutos cada una de las submuestras se dividió a su vez en otras dos (~0.5 kg) que se procesaron para la extracción del aceite, bien inmediatamente (< 24 h) o tras un almacenamiento en laboratorio de 7 días a 25°C con humedad relativa del 100% y en oscuridad, simulando las condiciones en el interior de los trojes.

### 2.3. Molturación, extracción y acidez del aceite

Las muestras se tritularon con un molino de martillos empezando por la de 0% y terminando por la de 100% de aceituna picada. Entre muestra y muestra el molino se limpió cuidadosamente de los restos de pasta de aceituna y se flameó con alcohol. La pasta resultante se centrifugó durante media hora a 4000 r.p.m. recuperando el aceite con una pipeta. Las muestras de aceite se almacenaron en viales de vi-

drio, reduciendo al máximo el espacio en cabeza, para su posterior análisis. La acidez del aceite (acidez libre o grado de acidez en % de ácido oleico) se determinó con un valorador automático Metrohm 716-DMS (precisión de 0.1°) siguiendo el método oficial, disolviendo el aceite en una solución neutralizada etanol-éter etílico (1:1) y valorando con KOH (0.1 N) usando fenoftaleína (1%) como indicador (Civantos et al., 1992).

### 2.4. Análisis de microflora

En las muestras recolectadas en la campaña 2000-2001 en las parcelas de Montijo y La Nava (muestreos nº 5-10, Tabla I) se efectuó además un análisis de microflora en la pasta de aceituna procedente de las aceitunas atrojadas y no atrojadas. Se recuperaron 50 g de pasta recién molturada en un erlenmeyer, enrasando hasta 200 ml con agua destilada. Tras agitación intensa se filtró la suspensión con una gasa estéril para eliminar la fracción grosera. A partir de esta suspensión "madre" se prepararon cinco diluciones decimales adicionales en agua ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). Las suspensiones así preparadas se sembraron en placas de Petri con medio agar-malta acidificado (25 ml de ácido cítrico al 1% por litro de medio), incorporando 1 ml de cada dilución por placa (3 repeticiones) al medio de cultivo en surfusión y homogeneizando por rotación. En total se inocularon hasta 216 placas por cada muestreo de aceituna (6 niveles de daño larvario x 6 diluciones x 2 tiempos de atroje x 3 repeticiones). Tras un periodo de incubación variable a la temperatura ambiente del laboratorio (7-14 días según el crecimiento de las colonias) se efectuó el recuento de la microflora. Las placas de las diluciones en las que la densidad de colonias fue muy alta o muy baja se desecharon, utilizando sólo las placas de la dilución en las que la densidad de colonias fue la adecuada para el recuento y estimación de la microflora (50-200 colonias/placa). Los resultados se expresan en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de pasta.

La entidad taxonómica de los mohos (en sentido amplio, hongos excluidas las levaduras) se determinó en base al aspecto de las colonias sobre los medios agar-malta acidificado y patata-dextrosa-agar (PDA) y a la observación microscópica de la morfología y pigmentación de los conidióforos, conidias y micelio (Barnett y Hunter, 1998). Para la identificación de las especies del género *Fusarium* se emplearon las claves taxonómicas de Messiaen y Cassini (1968).

Para la identificación de levaduras y bacterias se consideraron las características morfológicas de las células, el aspecto de las colonias en medio de cultivo sólido, la capacidad de formación de pseudomicelio y tipo de gemación en el caso de las levaduras, así como una serie de pruebas de diagnóstico tras el

Tabla I  
Muestras, localidades, variedades y fechas de recolección

Muestreo nº	Localidad	Variedad	Fecha de recolección
1	Casar de Cáceres, CC	Manzanilla Cacereña	26 enero 1999
2	Guadajira, BA	Verdial de Badajoz	20 diciembre 1999
3	Guadajira, BA	Picual	26 enero 2000
4	Guadajira, BA	Pico Limón	15 noviembre 2000
5	Montijo, BA	Verdial de Badajoz	16 noviembre 2000
6	La Nava, BA	Carrasqueña	22 noviembre 2000
7	Montijo, BA	Verdial de Badajoz	12 diciembre 2000
8	La Nava, BA	Carrasqueña	11 diciembre 2000
9	Montijo, BA	Verdial de Badajoz	15 enero 2001
10	La Nava, BA	Carrasqueña	17 enero 2001

repicado y cultivo en condiciones y medios específicos para su caracterización: agar de Czapeck-Dox y agar rosa de bengala con cloranfenicol (levaduras), agar nutritivo (bacterias) y agar de recuento total, PDA y agar O/F con glucosa (levaduras y bacterias). Las pruebas de diagnóstico incluyeron: morfología micelial y celular, efecto de la temperatura de incubación, prueba Gram, prueba de la catalasa, metabolismo de la glucosa oxidativo/fermentativo (O/F), sensibilidad a antibióticos (cloranfenicol), utilización del nitrato como única fuente de nitrógeno, determinados carbohidratos como única fuente de carbono (sacarosa y glucosa), sensibilidad al NaCl y pigmentación (producción de xanthomonadinas en medios glucosados) (Lodder, 1971; Andrés-Yeves et al., 1991; Holt et al., 2000).

### 2.5. Análisis estadísticos

Los efectos del daño de mosca, del atroje y del muestreo sobre la acidez del aceite se estudiaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) a 3 vías, incluyendo los datos de todos los muestreos, exceptuando el muestreo nº 4 del que no se dispuso de datos de aceituna atrojada (Tabla I). En el cómputo del ANOVA se siguió un modelo mixto, con los factores daño larvario y atroje con efecto fijo y el factor muestreo considerado al azar (Sokal y Rohlf, 1995).

Con el subconjunto de las muestras procedentes de las parcelas de Montijo y La Nava (muestreos 5-10, Tabla I) se computó un ANOVA a cuatro vías. Se estudiaron los efectos del daño de mosca, del atroje, de la fecha de recolección, de la parcela y de sus interacciones, tanto sobre la acidez del aceite como sobre la microflora en pasta (mohos, levaduras, bacterias y microflora total). El modelo seguido en el

cómputo del ANOVA fue tipo I ya que los cuatro factores se consideraron con efecto fijo (Sokal y Rohlf, 1995). El factor parcela se consideró como fijo porque se pretendió establecer las diferencias entre ambas parcelas en las variables estudiadas.

Mediante análisis de regresión se examinó la existencia y modelo de relación entre el daño larvario y la acidez, así como entre la microflora total y la acidez. El coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) se empleó para estudiar la correlación entre el daño de mosca en fruto y la microflora en pasta así como para inferir relaciones entre las poblaciones de los géneros microbianos aislados en la pasta y la subida de acidez (Scherrer, 1984). Todos los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el programa SYSTAT (1990).

### 3. RESULTADOS

Los resultados del primer ANOVA (Tabla II) indicaron, como podía esperarse, que tanto el daño larvario de mosca como el atroje afectaron significativamente a la acidez del aceite obtenido. El efecto del muestreo (i.e. del origen de la aceituna) también fue significativo, así como todas las posibles interacciones entre los tres factores estudiados (Tabla II). Además, el daño larvario mostró en general una correlación lineal positiva con la acidez (Fig. 1), si bien los resultados fueron ostensiblemente diferentes en función de si se realizó o no el atroje. En las muestras atrojadas la correlación entre el daño y la acidez fue significativa en todos los casos, mientras que en las muestras no atrojadas sólo se obtuvieron correlaciones significativas en un 60% de las muestras (6 casos de 10, Fig. 1). Especial trascendencia biológica tuvo la significación de la interacción daño-atroje ya que la subida de la acidez tras el

Tabla II  
Efectos del daño larvario de mosca (D), del atroje (A), del muestreo (M) y de sus interacciones sobre la acidez del aceite de oliva virgen

Fuente	gl	CM	Error CM	F	p
D	5	0.171841	D x A	9.59	0.013
			D x M	17.61	< 0.001
A	1	1.086141	D x A	60.62	< 0.001
			A x M	25.69	< 0.001
M	8	1.109793	E	486.11	< 0.001
D x A	5	0.017917	E	7.84	< 0.001
D x M	40	0.009758	E	4.27	< 0.001
A x M	8	0.042269	E	18.51	< 0.001
Error (E)	40	0.002283			

El estadístico *F* calculado como se describe en Sokal y Rohlf (1995) para un ANOVA Mixto a tres vías con los factores D y A con efecto fijo y el factor M al azar. La acidez se normalizó con el cambio de variable  $\sqrt{x}$ . Análisis de todas los muestreos excluyendo el nº 4 del que no se tuvieron datos de aceituna atrojada (ver Tabla I y Fig. 1). CM: cuadrados medios; gl: grados de libertad.

atroje fue comparativamente mayor al aumentar el porcentaje de aceitunas picadas. El efecto de esta interacción se verificó gráficamente por el incremento general de la pendiente de las rectas de regresión de las muestras atrojadas en relación a las no atrojadas (Fig. 1). En algunas muestras la acidez del aceite obtenido de fruto completamente sano pero atrojado fue incluso superior a la obtenida de fruto 100% dañado que no experimentó atroje.

Los resultados del segundo ANOVA (Tabla III) indicaron que la acidez del aceite se vio significativamente afectada por los cuatro factores estudiados (daño de mosca, atroje, mes de recolección y parcela), así como por varias interacciones dobles y triples entre ellos. Estos resultados además de corroborar los del primer ANOVA ponen de manifiesto el efecto que la fecha de recolección y la parcela (i.e. el origen de la aceituna) pueden tener sobre la acidez del aceite obtenido. Los niveles de microflora en pasta (mohos, levaduras, bacterias y microflora total) se vieron significativamente afectados por el daño, el atroje y el mes de recolección (Tabla III). El efecto de la parcela sobre la microflora fue menos concluyente ya que sólo afectó a la carga bacteriana, si bien interactuó con otros factores, en especial con la fecha de recolección, afectando a los tres grupos de microflora estudiados (Tabla III). Entre las interacciones cabe destacar de nuevo el efecto significativo de la interacción daño-atroje sobre las poblaciones de levaduras y de microflora total, dado su efecto paralelo sobre la acidez ya constatado.

Se obtuvieron buenas correlaciones entre los niveles de microflora total en pasta y la acidez, con po-

blaciones de microflora y valores de acidez consistentemente más elevados en los frutos atrojados. Además, el análisis de regresión mostró que la relación entre la microflora en pasta y la acidez fue no lineal, ajustándose bien a un modelo logarítmico (Fig. 2). Dados los resultados hasta aquí expuestos, correlacionando en general el daño de mosca con la acidez (relación lineal) y la microflora total con la acidez (relación logarítmica), se comprobó por último que una mayor frecuencia de daño larvario en general también promovió un incremento de la microflora total en los frutos. La correlación entre el porcentaje de fruto dañado y las poblaciones de microflora total fue positiva y en general significativa en todas las muestras atrojadas o no ( $r_s > 0.83$  en todos los casos,  $p < 0.05$ ) a excepción de la muestra nº5 sin atrojar ( $r_s = 0.54$  ns) y de la nº9 atrojada ( $r_s = 0.49$  ns).

La microflora asociada a la pasta de aceituna estuvo constituida por un complejo microbiano diverso, de mohos, levaduras y bacterias (Tabla IV). Aunque la mayor diversidad correspondió al grupo de los mohos (12 géneros), estos hongos sólo contribuyeron cuantitativamente a la microflora total en menos del 4% en el caso más favorable. Tanto el nivel poblacional como la composición específica de la microflora en pasta se mostraron muy sensibles a la ejecución o no de atroje, si bien no se observaron claras tendencias generalizables en la sucesión de las poblaciones microbianas con el atroje. Así, mientras que en la parcela de Montijo aumentaron las levaduras y descendieron las bacterias tras el atroje, en la parcela de La Nava la evolución microbiana fue justo a la inversa (Tabla IV). Las poblaciones de algunos géne-

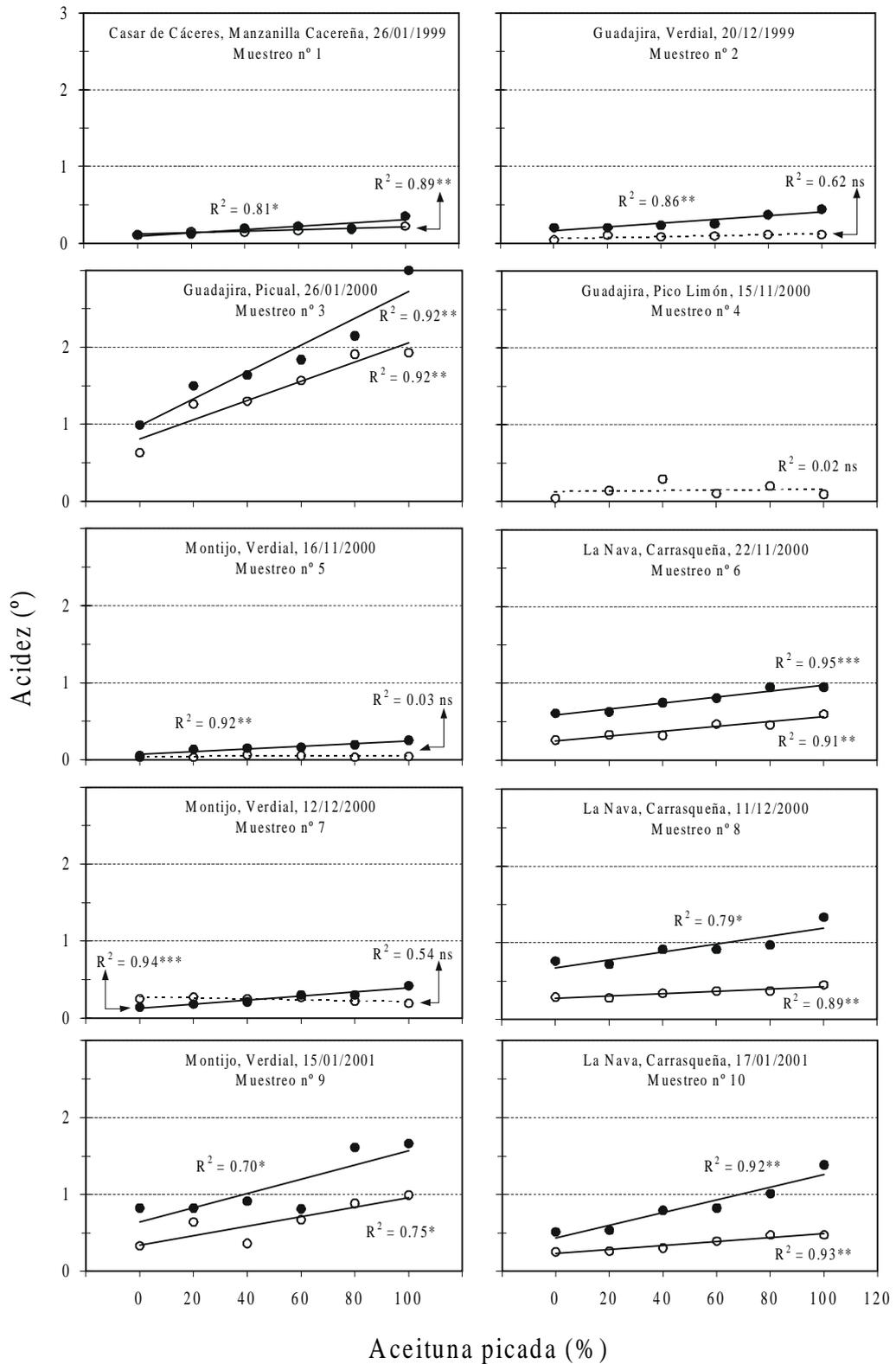


Figura 1

Regresión lineal entre el daño larvario de la mosca del olivo en fruto (x, porcentaje de aceituna picada) y la acidez (y, °) del aceite obtenido a partir de muestras de aceituna murturadas inmediatamente (círculos blancos) o atrojadadas 7 días a 25°C (círculos negros).

Niveles de significación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ; ns: no significativo.

La localidad, variedad, fecha de recolección y n° de muestreo se dan en la parte superior de cada gráfica y se corresponden con los de la Tabla I.

Tabla III  
Efectos del daño de mosca (D), del atroje (A), del mes de recolección (R), de la parcela (P) y de sus interacciones sobre la acidez del aceite de oliva virgen y sobre la microflora aislada en la pasta de aceituna

Fuente	gl	Variable				
		Acidez	Mohos <sup>1</sup>	Levaduras	Bacterias	Microflora total
D	5	23.6***	9.0**	34.7***	5.07*	28.6***
A	1	241.9***	126.5***	271.7***	235.2***	473.4***
R	2	148.3***	9.3**	21.1***	28.1***	46.8***
P	1	171.6***	2.4 ns	1.5 ns	6.4*	0.6 ns
D x A	5	3.3*	1.2 ns	3.3*	0.8 ns	3.6*
D x R	10	2.9 ns	1.6 ns	1.5 ns	0.6 ns	1.0 ns
D x P	5	0.8 ns	0.2 ns	2.0 ns	1.4 ns	0.8 ns
A x R	2	3.3 ns	5.0*	9.9**	7.7**	3.1 ns
A x P	1	28.9***	1.5 ns	4.7*	7.7*	0.1 ns
R x P	2	161.1***	5.7*	5.2*	10.7**	16.9***
D x A x R	10	0.7 ns	0.8 ns	1.3 ns	0.9 ns	0.4 ns
D x A x P	5	0.3 ns	0.7 ns	3.1 ns	2.0 ns	0.6 ns
D x R x P	10	1.1 ns	2.4 ns	0.9 ns	0.8 ns	1.0 ns
A x R x P	2	11.7**	6.9*	18.3***	0.3 ns	7.6**
Error	10					

<sup>1</sup>El término "moho" se utiliza en sentido amplio para designar a los hongos que no son levaduras. El análisis incluye los seis muestreos del nº 5 al nº 10 correspondientes a las parcelas de Montijo (var. Verdial de Badajoz) y la Nava (var. Carrasqueña) muestreadas consecutivamente en noviembre, diciembre y enero (ver Tabla I). Se dan los valores de la *F* del ANOVA modelo I con los cuatro factores estudiados, D, A, R y P con efecto fijo (ver texto). Niveles de significación, \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ; ns: no significativo. La acidez se normalizó con el cambio de variable  $\sqrt{x}$  y las restantes variables con  $\log_{10}(x + 1)$ .

ros microbianos mostraron una correlación significativa con el incremento de la acidez (valores de  $r_s$  en Tabla IV). Estas correlaciones fueron especialmente reseñables con la bacteria *Xanthomonas* y en menor medida con las levaduras *Candida* y *Torulopsis* y el moho *Penicillium*. Correlaciones significativas ocasionales también aparecieron con los mohos *Cladosporium* y algunos *Fusaria* (Tabla IV). Por grupos taxonómicos, las bacterias mostraron consistentemente la mejor correlación positiva con la subida de acidez (atribuible a la presencia casi exclusiva de *Xanthomonas*) seguidas por levaduras y mohos, en los que sólo se obtuvieron correlaciones significativas cuando la aceituna sufrió atroje. Considerando la microflora en su conjunto, las correlaciones entre nivel poblacional y acidez fueron significativas en las dos parcelas tanto con los frutos atrojados como en los no atrojados (Tabla IV).

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados corroboraron el nefasto efecto que tanto el daño larvario de la mosca del olivo como la

práctica del atroje pueden tener sobre la acidez del aceite virgen de oliva. El efecto significativo de la interacción daño x atroje (D x A) sobre la acidez puso además de manifiesto la crucial importancia de un aspecto menos estudiado, el efecto sinérgico del daño de mosca y del atroje. Así, los aceites obtenidos a partir de frutos muy dañados y atrojados tuvieron, en general, una acidez más elevada de la que cabría esperar considerando el daño o el atroje por separado. Señalar que la significación de la interacción D x A fue atribuible en cierta medida a que en 3 de las 9 submuestras no atrojadas incluidas en el ANOVA (Tabla II), la correlación daño-acidez no fue significativa (Fig. 1, ver más adelante). Los resultados también sugirieron que la subida de acidez no es consecuencia directa del daño de mosca ni de la práctica del atroje per se, sino que resulta del incremento concomitante de la microflora saprofita en las aceitunas. En otras palabras, tanto el daño como el atroje deben ser vistos como dos factores potencialmente favorecedores del incremento de la microflora saprofita, que a su vez es la causa real de la subida de acidez y pérdida de calidad del aceite.

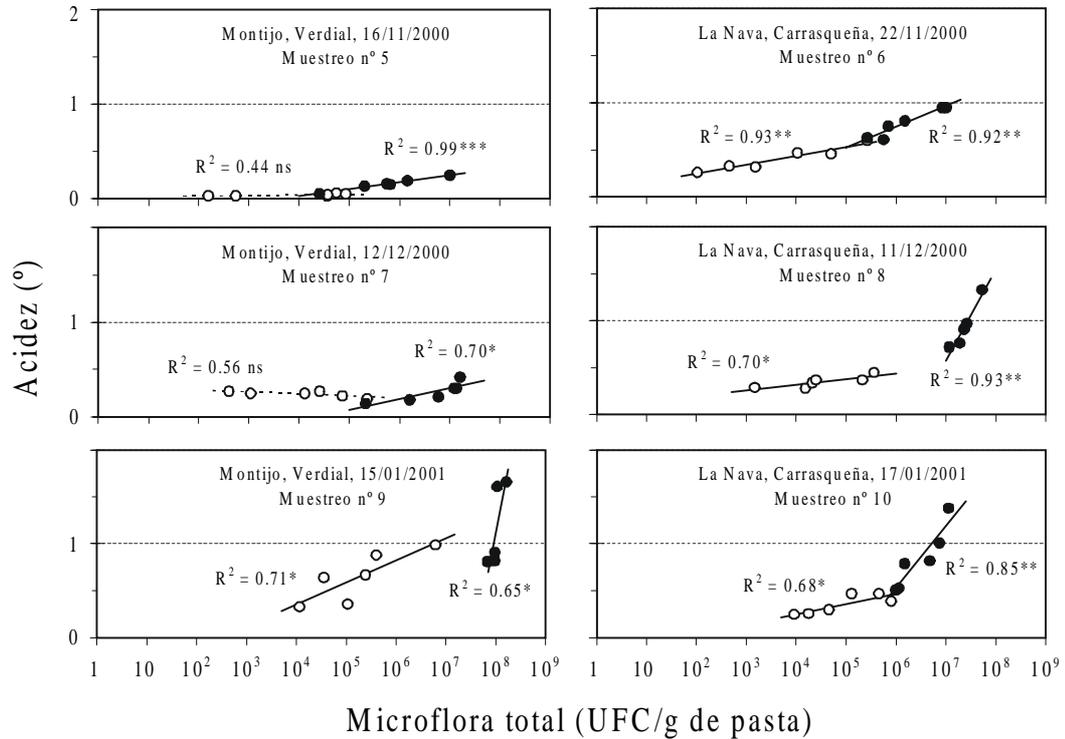


Figura 2

Regresión logarítmica entre la microflora total en la pasta de aceituna ( $x$ ,  $\log_{10}$ [UFC/g de pasta]) y la acidez ( $y$ ,  $^{\circ}$ ) del aceite obtenido a partir de muestras de aceituna molturadas inmediatamente (círculos blancos) o atrojadas 7 días a  $25^{\circ}\text{C}$  (círculos negros). Niveles de significación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ; ns: no significativo. Los datos corresponden a las parcelas de Montijo y La Nava muestreadas durante tres meses consecutivos (muestreros n° 5 a 10 de la Tabla I).

Los microorganismos aislados de la pasta de aceituna se comportaron como saprofitos, sólo proliferando adecuadamente en frutos sanos con heridas y/o necrosis, o en frutos senescentes o muertos. Algunos de los géneros han sido ya citados con anterioridad sobre aceitunas frescas o sus encurtidos (Sena et al., 1982; Civantos et al., 1992; Faid et al., 1994; García, 1995; Iglesias et al., 1998; Amelio y DeMauro, 2000; Asehrou et al., 2000). La vía de entrada de la microflora saprofita en las aceitunas en el árbol es doble, mediante el oviscapto de la hembra de la mosca al poner los huevos y especialmente a través del agujero de emergencia de las larvas (Neuenschwander y Michelakis, 1978; Neuenschwander et al., 1986). Una vez que los agujeros de emergencia posibilitan la entrada de aire al interior del fruto (aerobiosis), los requerimientos para el desarrollo de la microflora saprofita son óptimos en la pulpa dañada por las larvas de mosca (nutrientes y humedad).

Sin embargo, los resultados también indicaron que un elevado daño de mosca en las aceitunas no es condición necesaria ni suficiente para promover una subida significativa de la acidez del aceite. En concreto, en el 40% de las muestras no atrojadas en este estudio, la correlación entre daño y acidez no

fue significativa. Es de interés señalar que, en estas muestras, un elevado número de larvas emergieron en el laboratorio, antes o durante el proceso de clausificación de los frutos. Las aceitunas picadas presentaban por consiguiente un agujero de salida reciente y limpio, con poca o nula colonización microbiana en la pulpa. Este hecho sugiere la posible importancia de una variable no controlada en este estudio, el tiempo transcurrido entre la emergencia larvaria de los frutos y la molturación. Si la apertura del agujero larvario de salida es reciente, podría no haber tiempo suficiente para que la proliferación microbiana en aerobiosis ocasione un incremento significativo de la acidez.

El atroje, como podía esperarse, tuvo un efecto crucial en la subida de acidez. Además, nuestros resultados evidenciaron su importante papel potenciador del daño de mosca en cuanto a la acidez y a la carga microbiana se refiere (Sena et al., 1982). A título de ejemplo, en todas las muestras en las que las correlaciones daño-acidez no fueron significativas antes del atroje, si lo fueron después. Durante la maduración y la senescencia de los frutos, en especial si se encuentran caídos o atrojados, la degradación de las paredes celulares hace posible que la microflora pueda colonizar los frutos por cualquier sitio. Al

Tabla IV  
**Microflora aislada de la pasta de aceituna, abundancia relativa media (%) y su correlación con la acidez del aceite obtenido**

Géneros	Sin atroje				Con atroje			
	Montijo		La Nava		Montijo		La Nava	
	%	$r_s$	%	$r_s$	%	$r_s$	%	$r_s$
Hongos (mohos)								
<i>Penicillium</i>	1.7	ns	0.2	0.42*	0.6	0.76***	0.3	0.42*
<i>Cladosporium</i>	0.2	ns	< 0.1	0.58**	0.5	ns	0.1	ns
<i>Aspergillus</i>	< 0.1	—	0.1	—	< 0.1	0.41*	0.0	—
<i>Cephalosporium</i>	0.1	—	< 0.1	—	< 0.1	ns	0.0	—
<i>Fusarium moniliforme</i>	0.1	0.57**	< 0.1	ns	2.1	ns	< 0.1	—
<i>Fusarium solani</i>	0.0	—	< 0.1	—	0.1	—	< 0.1	ns
<i>Fusarium roseum</i>	0.0	—	< 0.1	—	< 0.1	—	< 0.1	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.0	—	0.1	—	0.0	0.67**	0.1	ns
otros <i>Fusarium</i>	0.1	ns	< 0.1	—	< 0.1	—	0.2	0.50*
<i>Aureobasidium</i>	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—
<i>Gloeosporium</i>	< 0.1	—	< 0.1	—	0.0	—	< 0.1	—
<i>Alternaria</i>	0.0	—	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—
<i>Rhizopus</i>	0.0	—	0.0	—	< 0.1	—	< 0.1	—
<i>Epicoccum</i>	0.0	—	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—
<i>Botrytis</i>	0.0	—	0.0	—	< 0.1	—	< 0.1	ns
<i>Geotrichum</i>	0.0	—	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—
otros mohos	0.1	—	< 0.1	—	0.1	—	< 0.1	—
Total mohos	2.3	ns	0.5	ns	3.4	0.79***	0.7	0.63**
Hongos (levaduras)								
<i>Candida</i>	3.7	ns	0.3	0.68**	18.2	0.78***	1.4	0.82***
<i>Torulopsis</i>	6.1	ns	46.6	0.43*	8.9	0.93***	13.9	0.84***
<i>Rhodotorula</i>	< 0.1	—	< 0.1	—	0.1	—	< 0.1	—
<i>Saccharomyces</i>	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—
<i>Brettanomyces</i>	0.0	—	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—
otras levaduras	< 0.1	—	< 0.1	—	0.0	—	0.0	—
Total levaduras	9.9	ns	46.9	0.72***	27.2	0.93***	15.3	0.86***
Bacterias								
<i>Xanthomonas</i>	87.8	0.83***	52.6	0.64**	69.4	0.98***	84.0	0.65**
otras bacterias	< 0.1	—	< 0.1	—	< 0.1	—	< 0.1	—
Total bacterias	87.8	0.83***	52.6	0.64**	69.4	0.98***	84.0	0.65**
Total microflora	100	0.46*	100	0.68**	100	0.99***	100	0.69**

Datos mensuales agrupados de las parcelas de Montijo (muestras 5, 7 y 9) y La Nava (muestras 6, 8 y 10) (ver Tabla I) según la realización o no de atroje. El coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) sólo se calculó para los géneros (o especies) en los que la frecuencia de aislamiento en los 18 análisis por parcela y atroje (6 niveles de daño x 3 fechas de recolección) fue superior a cinco. Niveles de significación de  $r_s$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ ; ns: no significativo (test unilateral).

no ser necesaria una puerta de entrada, la proliferación microbiana puede ser explosiva, dependiendo en particular del inóculo inicial por el daño de mosca.

La composición específica de la microflora en los frutos dañados y su sucesión durante el atroje (García, 1995) ligada a la senescencia y muerte de los frutos, es probable que desempeñe también un papel trascendente en el incremento de la acidez. Los niveles poblacionales de determinadas géneros mi-

crobianos mostraron claramente una mejor asociación con la subida de acidez que otros. Las curvas de la Figura 2 apuntan en esta dirección ya que cargas microbianas similares produjeron distintos valores de acidez según la muestra. En este sentido, se sabe que las levaduras tienen en general menor poder lipolítico que las bacterias y mohos (Müller, 1981). El género bacteriano *Xanthomonas* (en su mayor parte probablemente *X. campestris*) que fue

con diferencia el más frecuente y abundante en las muestras analizadas, no sólo contiene lipasas capaces de hidrolizar los triglicéridos liberando ácidos grasos y promoviendo importantes subidas de acidez, sino que además posee una importante actividad celulolítica en extractos parcialmente degradados (Garrido et al., 1997). Entre los mohos, se ha señalado que el efecto de *Penicillium* sobre la acidez es más reducido que el de *Fusarium* (Del Moral et al., 1986; García, 1995), si bien nuestros datos no son concluyentes en este sentido. También se ha sugerido que algunas especies con capacidad patogénica directa sobre los frutos pueden contribuir en gran medida al incremento de la acidez. Por ejemplo, la proliferación de *Gloeosporium olivarum* Alm. (= *Colletotrichum gloeosporoides* Penz.), agente causal de las "aceitunas jabonosas", es nefasta sobre la acidez del aceite (Mateo-Sagasta, 1967; De Andrés-Cantero, 1997). En este sentido, resultó sugerente que este hongo sólo se aisló en las dos muestras (de las analizadas para microflora) en las que las correlaciones acidez-daño y acidez-microflora no fueron significativas (nº 5 y 7), lo que sugiere que su presencia podría haber alterado dichas correlaciones. En cualquier caso, las complejas interacciones interespecíficas entre microorganismos que tienen lugar en los frutos dañados limitan el asociar fácilmente a determinadas especies o géneros con la subida de acidez. Por ello, las correlaciones entre las poblaciones microbianas en pasta y la acidez mostradas en la Tabla IV deben interpretarse con precaución, ya que tales interacciones interespecíficas no fueron controladas en este estudio basado en muestras de campo. Además, la existencia de una correlación significativa entre el nivel poblacional de una especie dada en la pasta y la acidez del aceite no implicaría necesariamente una relación causa-efecto. Por ejemplo, la existencia de dicha correlación en una especie "A" podría ser meramente un efecto secundario del incremento de acidez provocado por otra especie "B", si tal incremento propiciase a su vez la colonización de "A".

Los resultados también subrayaron el importante efecto que otros factores como la parcela y el mes de recolección pueden tener sobre la microflora y la acidez (Ryan et al., 1998; Ranalli et al., 1999), bien directamente o interactuando con el daño y el atroje. Numerosas variables de distinta índole son susceptibles de promover las variaciones de acidez constataadas según la parcela y la fecha de recolección, incluyendo 1) la variedad, 2) el microclima afectando a la colonización de la microflora, 3) las fluctuaciones en la cantidad del reservorio microbiano y su composición específica, tanto en espacio (parcela) como en tiempo (mes de recolección), 4) la madurez del fruto actuando, entre otros factores, sobre las fitoalexinas que interfieren el desarrollo microbiano (García, 1995), 5) las eventuales caídas de fruto al

suelo afectando a la "dinámica poblacional" de los frutos en el árbol (Civantos et al., 1992): si las aceitunas con daños larvarios más tempranos son más propensas a caer del árbol, es muy probable que la calidad del aceite no disminuya a lo largo de la campaña en las aceitunas de vuelo (ver Fig. 1), y 6) el tiempo transcurrido entre la emergencia larvaria y la molturación del fruto, como ya se ha sugerido.

Todo lo expuesto sugiere que el establecimiento de un umbral económico de daño cualitativo basado en el daño de mosca, obtenido a partir de la regresión entre el porcentaje de fruto picado y la acidez del aceite obtenido es un necesario pero difícil objetivo, que sólo podría ser establecido a escala regional o local y tras varios años de estudio (Neuenschwander et al., 1986). Mientras tanto, nuestros resultados redundan en que las actuaciones encaminadas a controlar la proliferación de la microflora saprofita causante de la subida de acidez pasan inevitablemente por minimizar el daño de mosca, reducir el tiempo (o mejorar las condiciones) del atroje, o mejor aún, una adecuada combinación de ambas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a J. Pérez de Sande, E. Aguilera, E. Palo, D. González, D. García, J. Gragera y F. Pérez la ayuda prestada en laboratorio y/o campo. Este estudio fue financiado por el proyecto de investigación IPR98A008 de la Junta de Extremadura.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Amelio, M. y De Mauro, E. (2000). Naturally fermented black olives of Taggiasca variety (*Olea europaea* L.). *Grasas y Aceites*, **51**, 429-438.
- Andrés-Yeves, M.F., Arias, M., Bello, A., Borrueal, M.L., Fisac, R., Lacasa, A., López, M.M., Nombela, G., Noval, C., Rey, J.M., Tello, J., Valdeolivas, A. y Vares, F. (1991). Manual de Laboratorio: Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos. MAPA, Madrid.
- Asehrou, A., Peres, C., Brito, D., Faid, M. y Serhrouchni, M. (2000). Characterization of yeasts strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y Aceites*, **51**, 225-229.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4ª ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Civantos, L., Contreras, R. y Grana, R.M. (1992). Obtención del Aceite de Oliva Virgen. Agrícola Española, Madrid.
- De Andrés-Cantero, F. (1997). Enfermedades y Plagas del Olivo. Riquelme y Vargas, Jaén.
- Del Moral, J., Mazón, J.J. y Santiago, R. (1986). *Phlyctaena vagabunda* Desm. v. *Arx* y *Fusarium moniliforme* Sheldon, nuevos patógenos de la aceituna en España. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, **12**, 9-17.
- Faid, M., Akhartouf, R. y Asehrou, A. (1994). Microorganisms associated with post-harvest green olive deteriorations in Morocco. *Grasas y Aceites*, **45**, 313-317.

- García, F. (1995). Microflora asociada a la aceituna. *Agricultura*, **760**, 931-933.
- Garrido, A., Fernández, M.J. y Adams, M.R. (1997). Table Olives. Chapman and Hall, London.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Iglesias, C., Varés, L. y Sinobas, J. (1998). Incidencia de la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* Gmel. (Diptera, Tephritidae) durante la temporada 1997/98 en la Comunidad de Madrid. *Phytoma España*, **99**, 12-16.
- Lodder, J. (1971). The Yeasts. A Taxonomic Study. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Mateo-Sagasta, E. (1967). Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (Deuteromiceto: Melanconial). *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, **30**, 31-135.
- Messiaen, C.M. y Cassini, R. (1968). Recherches sur les Fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Annales des Epiphyties*, **19**, 387-454.
- Müller, G. (1981). Microbiología de los Alimentos Vegetales. Acribia, Zaragoza.
- Neuenschwander, P. y Michelakis, S. (1978). The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **86**, 420-433.
- Neuenschwander, P., Michelakis, S. y Kapatos, E. (1986). *Dacus oleae* (Gmel.) in *Traité d'Entomologie Oleicole*, pp. 115-159. Y. Arambourg (Ed). COI, Madrid.
- Pucci, C., Ceccarelli, S. y Filippucci, B. (1979). Incidence de l'infestation du *Dacus oleae* Gmel. sur la quantité et la qualité de la production des olives en Ombrie. *Redia*, **62**, 1-12.
- Ranalli, A., De Mattia, G., Patumi, M. y Proietti, P. (1999). Quality of virgin olive oil as influenced by origin area. *Grasas y Aceites*, **50**, 249-259.
- Ryan, D., Robards, K. y Lavee, S. (1998). Evaluación de la calidad del aceite de oliva. *Olivae*, **72**, 23-41.
- Scherrer, B. (1984). Biostatistique. Gaëtan Morin, Québec.
- Sena, A., Carrillo, R. y Mateo-Sagasta, E. (1982). Estudio de la flora micológica de aceitunas almacenadas en troje y su influencia sobre la acidez de los aceites. Serie Estudios y Experiencias 51/82, MAPA, Madrid.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1995). *Biometry*. Freeman and Co, New York.
- SYSTAT (1990). SYSTAT: The System for Statistics (v. 5.0). Systat Inc., Evanston, IL.

Recibido: Octubre 2002  
Aceptado: Febrero 2003