



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

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA SAL EN
EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL JAMÓN CRUDO-CURADO,
CON ESPECIAL REFERENCIA A MICROCOCÁCEAS
DE INTERÉS TECNOLÓGICO.**

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

M^a DEL ROSARIO CORDERO GÓMEZ

León, Octubre de 1996

**JOSÉ MARÍA ZUMALACARRÉGUI RODRÍGUEZ, PROFESOR TITULAR
DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE “TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS” DEL
DEPARTAMENTO DE HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE LEÓN**

CERTIFICA:

Que la Tesis titulada “Estudio microbiológico de la sal en el proceso de elaboración del jamón crudo-curado, con especial referencia a Micrococáceas de interés tecnológico”, de la que es autora la Licenciada en Biología Dña. M^a del Rosario Cordero Gómez, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

León, Octubre 1996

Fdo. José María Zumalacárregui Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. José María Zumalacárregui Rodríguez por sus consejos, orientaciones y sincero apoyo como Director de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de Laboratorio Municipal de León, M^a Angeles González, Jesús Quirós, César de Prado, Elsa García e Irma Villanueva, por su constante apoyo.

Al Prof. Dr. D. Víctor Díez y a Angel Alvarez del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de León, por la colaboración prestada.

A Alfonso González y Jesús de Celis del Departamento de Informática del Ayuntamiento de León, así como a Pedro Gómez por su contribución a la puesta a punto de este trabajo.

Al Excelentísimo Ayuntamiento de León, por la ayuda que me brindó en la consecución de esta Tesis Doctoral.

A todos aquellos que de una manera u otra lo han hecho posible.

A mis padres

INDICE

I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
I.1. SALAZONADO-CURADO DE LAS CARNES	9
I.1.1. Historia.....	9
I.1.2. Acciones de la sal.....	11
I.1.3. Tipos de sal.....	13
I.1.4. Parámetros físico-químicos de la sal y salmueras	14
I.1.5. Acciones de los agentes de curado	15
I.1.6. Tecnología de la elaboración de los productos cárnicos crudo-curados elaborados a partir de piezas enteras. Jamones crudo-curados	17
I.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA SAL Y PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS	19
I.2.1. Características de las Micrococáceas	19
I.2.1.1. Género <i>Micrococcus</i>	19
I.2.1.2. Género <i>Staphylococcus</i>	21
I.2.1.3. Otros géneros	23
I.2.2. Problemática de la identificación de las Micrococáceas	23
I.2.3. Microbiología de la sal	28
I.2.4. Microbiología de las salmueras	29
I.2.5. Microbiología de los jamones y otros productos cárnicos elaborados a partir de piezas enteras.....	31
I.2.6. Microbiología de los embutidos fermentados.....	34
I.3. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LAS MICROCOCÁCEAS	35
I.3.1. Efecto de la temperatura.....	35
I.3.2. Actividad de agua.....	37
I.3.3. Actividad lipolítica.....	39
I.3.4. Actividad proteolítica.....	41
I.3.5. Reducción de nitratos a nitritos	42

I.4. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	43
II. MATERIAL Y MÉTODOS	47
II.1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	47
II.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	48
II.3. PLAN EXPERIMENTAL.-TOMA DE MUESTRAS.....	48
II.4. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS	52
II.4.1. Determinación de humedad.....	52
II.4.2. Determinación de cenizas.....	52
II.4.3. Determinación de nitritos	53
II.4.4. Determinación de nitratos	54
II.4.5. Determinación de pH	56
II.4.6. Determinación de la actividad de agua	56
II.5. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	56
II.5.1. Homogeneización y diluciones.....	56
II.5.2. Siembra y recuento de colonias en placa	56
II.5.3. Selección de colonias y purificación.....	57
II.5.4. Identificación de las colonias aisladas en agar MSA.....	57
II.5.4.1. Pruebas de adscripción a familia	57
II.5.4.2. Pruebas de adscripción a género	58
II.5.4.3. Pruebas de adscripción a especie.....	59
II.6. PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO.....	63
II.6.1. Efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano	63
II.6.2. Actividad lipolítica.....	65
II.6.3. Actividad proteolítica.....	67
II.6.4. Efecto de la actividad de agua	67
II.6.5. Capacidad de reducir los nitratos a nitritos	68
II.6.6. Capacidad inhibidora del nitrito en el crecimiento bacteriano.....	70
III. RESULTADOS.....	71
III.1. PARÁMETROS QUÍMICOS Y VALOR DEL pH DE LA SAL UTILIZADA EN EL SALAZONADO DE JAMONES CRUDO-CURADOS.....	71
III.1.1. Sal nueva	71
III.1.2. Sal de curado de cerdo ibérico (tiempo de salazón:4-6meses).....	71
III.1.3. Sal de curado de cerdo blanco (tiempo de salazón:4-6 meses).....	72
III.2. RECUENTOS DE GRUPOS MICROBIANOS EN LA SAL UTILIZADA EN LA ELABORACIÓN DE JAMONES CRUDO-CURADOS.....	75
III.2.1. Sal nueva	75
III.2.2. Sal de curado de cerdo ibérico (tiempo de salazón: 4-6meses).....	75
III.2.3. Sal de curado de cerdo blanco (tiempo de salazón: 4-6meses).....	76
III.3. EVOLUCIÓN DE LOS RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA SAL DE CERDO IBÉRICO Y DE CERDO BLANCO DURANTE EL PERÍODO DE SALAZÓN	82
III.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS MICROCOCÁCEAS.....	84
III.4.1. Adscripción a género de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de salazonado de jamones crudo-curados	85
III.4.2. Adscripción a especie de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de salazonado de jamones crudo-curados	85

Micrococcus	85
Staphylococcus	86
III.5. PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO.....	100
III.5.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano	100
III.5.1.1. Fase de latencia	102
III.5.1.2. Energía de activación	102
III.5.1.3. Constante de la velocidad de crecimiento y tiempo de generación.....	103
III.5.2. Actividad lipolítica	104
III.5.3. Capacidad proteolítica	104
III.5.4. Efecto de la actividad de agua.....	105
III.5.5. Reducción de nitratos a nitritos	106
III.5.6. Capacidad inhibidora del nitrito sobre el crecimiento bacteriano.....	106
IV. DISCUSIÓN.....	149
V. CONCLUSIONES.....	167
VI. BIBLIOGRAFÍA	169

I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. SALAZONADO-CURADO DE LAS CARNES

I.1.1 Historia

El salazonado es un procedimiento tecnológico al que se someten algunos alimentos desde tiempos inmemoriales con la finalidad de ser conservados.

La sal, ingrediente básico del proceso de salazonado, ha ocupado un papel casi sagrado en la historia de la humanidad. Los romanos daban sal a los recién nacidos para otorgarles sabiduría. Las víctimas de los sacrificios hebreos y romanos eran purificadas con sal para ser aceptadas por la divinidad. Por otra parte, la sal derramada tenía para estos pueblos un efecto negativo y la arrojaban en el suelo de las ciudades que destruían para hacerle estéril, según se recoge en el Libro de los jueces, IX, 45.

Platón escribió que la sal, como el agua y el fuego, era uno de los primeros y divinos ingredientes de la vida. A menudo relacionada con la pureza, la sal desempeñó un papel similar al del pan en relación con la divinidad y el hombre. Entre los símbolos de los rituales paganos, la sal era uno de los tributos que se cobraban los dioses. Los modernos nómadas del desierto, la ofrecen como signo de hospitalidad y para estrechar lazos de amistad.

En los primeros tiempos de Roma, los soldados recibían un puñado de sal diario, que fue sustituido posteriormente por una cantidad de dinero que les permitía comprarla, liberando a la intendencia del problema del transporte. La suma de dinero que recibían los soldados romanos era el *salarium*.

Desde que las monarquías sucedieron al Imperio Romano, la sal y sobre todo su control, se convirtieron en un derecho del rey. El primer acta relacionada con la legislación de la sal es un edicto del rey lombardo Liutprand, en el año 715, en el que se regula el comercio gravado con dos impuestos, uno para vendedores y el otro para compradores.

El primer tipo de sal comúnmente usada fue la del mar. Pero pronto los pueblos más alejados del mar descubrieron que existían zonas de la tierra en donde también podía encontrarse. En algunas zonas áridas del mundo, como Irak, Irán, suroeste de Estados Unidos, Australia o en el altiplano boliviano, los depósitos de sal existían en la superficie debido a movimientos geológicos. En las latitudes más altas, en las regiones más frías del planeta como en Canadá, los Urales o la Patagonia, los depósitos subterráneos de la sal son los restos de la presencia de océanos desaparecidos. Los cambios climáticos y los movimientos telúricos de la tierra capturaron grandes masas de agua, que una vez secas formaron inmensos lagos salados.

El hombre primitivo observó que la adición de sal a la carne, seguida de un proceso de reposo, aumentaba su vida útil, consiguiendo por otra parte un producto de sabor agradable; de esta forma, se logró conservar la carne de los animales cazados en verano para ser consumida durante la época invernal.

Es posible que la conservación de la carne por acción de la sal comenzara en los desiertos de Asia Central y en las zonas costeras. Las sales de los desiertos aportaban nitratos y bórax como impurezas, pero su efecto sobre el color de los productos cárnicos no fue descrito hasta épocas posteriores a la civilización romana. El salitre o nitro se recolectaba en China y la India mucho antes de la Era Cristiana en las paredes rocosas, empleándose en el curado de la carne.

Existen referencias de que los sumerios consumían carne y pescados salazonados en Mesopotamia en el año 3.000 (a.C.). En la época de Homero (900 a.C.) el salazonado y ahumado de la carne eran prácticas habituales. Los romanos aprendieron estas técnicas de los griegos y salazonaron distintos tipos de carnes, estableciendo un mercado para estos productos en todo el Imperio Romano (Jensen, 1954). La salmuera que empleaban contenía además de la sal, otros ingredientes.

Catón el viejo (243-149 a.C.) dio excelentes directrices para el curado en seco de los jamones. Este proceso incluía una selección de la materia prima, un frotado en aceite, ahumado y un nuevo frotado con una mezcla de aceite y vinagre.

Columella (siglo I a.C.) dio también una serie de consejos para el curado en seco de la carne de cerdo, recomendando además el empleo de sal tostada para el curado en climas cálidos; con ello, no está claro si trataba de eliminar la flora contaminante o transformar los nitratos en nitritos.

La primera vez que apareció el término **curado** fue en el norte de Alemania durante la Edad Media para describir el tratamiento de la carne y el pescado con sal común. A finales del siglo XVII se sospechó que el color típico de las carnes curadas se debía al nitrato (salpetre), aunque esta sospecha no fue confirmada hasta el siglo XIX. A finales de dicho siglo, en 1899 Lehman estableció que el color característico de los productos curados era debido al nitrito; previamente Polenski, en 1891, puso en evidencia que el nitrato era reducido a nitrito por acción bacteriana.

Durante el siglo XX, la tecnología empleada en el curado de la carne se ha diversificado enormemente, tanto en lo que se refiere a las mezclas empleadas en el proceso de salazonado, como en los sistemas de aplicar esta mezcla a los productos cárnicos. Los métodos más empleados de aplicación de los agentes del curado a este tipo de productos, son el frotado manual de la superficie de las piezas de carne, el apilado de las mismas en unión íntima con la sal, la inmersión en una salmuera, la aplicación de la sal en incisiones practicadas en el tejido muscular, el bombeo vascular de la salmuera y la inyección al producto por punción de múltiples agujas, etc.

En la actualidad existe aún cierta confusión entre los términos **salazonado** y **curado**, entendiéndose por salazonado el tratamiento realizado únicamente con sal común, mientras que el curado se refiere a la aplicación de agentes de curado -nitritos y nitratos- y sal común.

I.1.2. Acciones de la sal

La sal es el ingrediente más importante en las mezclas de curado de las carnes. Entre sus funciones en los productos curados destacan la antimicrobiana, la aromatizante y la de solubilizar las proteínas musculares.

La tolerancia de las distintas especies microbianas frente a la sal varía en un amplio rango de concentración. Algunos microorganismos son inhibidos a niveles inferiores al 1%, mientras que otros pueden crecer en soluciones saturadas.

Muchas especies de bacterias alterantes de la carne cruda se inhiben por una concentración de 3-4% de ClNa en la fase acuosa, mientras que otras no se ven afectadas. Los microorganismos que no se inhiben pueden ser útiles, por ejemplo, en la maduración de los embutidos, u originar alteraciones o enfermedades.

Existen microorganismos que requieren unas concentraciones mínimas de sal para crecer, son los llamados halófilos. En general, la necesidad de sal no es necesariamente exclusiva del ClNa ya que algunos halófilos requieren niveles de K^+ , Mg^{++} y otros cationes y aniones añadidos al ClNa. Además para algunas bacterias el requerimiento aparente de ClNa no es específico ya que puede ser sustituida por otras sales y azúcares.

La clasificación de microorganismos halófilos se basa en el nivel de sal tolerado. Los débilmente halófilos crecen óptimamente en un medio que contenga 2-5% de sal; los moderadamente halófilos crecen en medios con 5-20% de sal y los halófilos extremos en medios que contienen entre 20 y 30% de sal. También existen microorganismos halotolerantes que crecen tanto en ausencia de sal como a concentraciones salinas superiores al 5%.

Hay autores que afirman que la sal es “per se” el principal responsable del aroma de los productos cárnicos curados (Price y Greene, 1978; Froehlich *et al.*, 1983), aunque es probable que a través de interacciones con otros componentes del tejido muscular y/o adiposo tenga lugar la formación de determinados compuestos aromáticos.

Además de los efectos que hemos comentado, la sal solubiliza las proteínas miofibrilares musculares. En los productos curado-cocidos las proteínas solubilizadas gelifican por la acción del calor ligando el agua y la grasa (Schmidt *et al.*, 1981; Sofos, 1983 a,b); en los embutidos fermentados la gelificación proteica -que permite la unión entre las partículas de carne y grasa-, se consigue por la acción de los bajos pHs (Lücke, 1985; Bacus, 1986).

Por otra parte, la sal no solo ejerce en el curado de la carne efectos beneficiosos, sino que también ocasiona efectos negativos. Varios autores han puesto de manifiesto la acción oxidante sobre la grasa en una gran variedad de productos cárnicos (Chang y Watts, 1950; Ellis *et al.*, 1968; Olson y Rust, 1973; Chen *et al.*, 1984; Barbut *et al.*, 1985; Shahidi *et al.*, 1988). Esta acción se debe probablemente a impurezas metálicas presentes en la misma o a una acción oxidativa directa debida a la reactividad del ión cloruro (Ellis *et al.*, 1968).

La sal cuando se usa como único ingrediente en el curado provoca una oxidación de la mioglobina que se transforma en metamioglobina y proporciona al producto cárnico una coloración gris oscura.

En la actualidad, por motivos sanitarios, con el fin de disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, existe una tendencia generalizada a la reducción del contenido en cloruro sódico en todos los alimentos procesados. Como consecuencia de esto, se han realizado numerosos trabajos para estudiar las características de los distintos productos cárnicos elaborados con un contenido reducido en cloruro sódico y se ha podido observar en muchos de ellos problemas tecnológicos, microbiológicos y en las propiedades sensoriales.

I.1.3. Tipos de sal

El Decreto 704/1976, de 5 de marzo (B.O.E. núm. 130, de 1-6-1983), en el que se recoge la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la sal y salmueras comestibles, define la sal para alimentación, como el producto cristalino constituido fundamentalmente por ClNa en condiciones que le hacen apto para usos alimenticios.

Clasifica la sal de la siguiente manera:

- Sal gema.- Es la procedente de yacimientos salinos naturales.

- Sal marina.- Es la sal procedente del agua del mar.

- Sal de manantial.- Es la sal procedente de manantiales salinos obtenida por evaporación de las salmueras correspondientes.

- Sal refinada.- Es la sal gema, sal marina o sal de manantial purificada por lavado o también por disolución seguida de cristalización. Si esta cristalización se lleva a cabo al vacío se denomina “Sal vacuum”.

- Sal de salazón.- Es la sal comestible a la que se le tolera un contenido en magnesio superior al normal por ir destinada a la salazón.

- Sal de mesa.- Es la sal refinada cuyo tamaño de gránulo es igual o inferior a 2 milímetros, humedad 0,5% como máximo y que puede contener alguno o algunos de los agentes antiapelmazantes autorizados.

- Sal de cocina.- Es la sal refinada cuya humedad no excede del 5%.

- Sales especiales.- Son las constituídas por sal refinada a las que se les ha añadido sustancias autorizadas.

I.1.4. Parámetros físico-químicos de la sal y salmueras

Son escasos los estudios que se han realizado con el fin de conocer los parámetros físico-químicos de la sal y las salmueras utilizadas en los procesos de salazonado de jamones y otros productos cárnicos.

Shewan (1951) ha realizado un estudio en 33 muestras de sal pertenecientes a 3 tipos diferentes -solar, evaporada y de roca- determinando distintas sales -cloruro sódico, cloruro magnésico, cloruro cálcico, sulfato magnésico y sulfato cálcico-, así como la humedad de cada una de ellas; obteniendo en el caso de la sal solar para este parámetro un valor medio de 3,5%, en la evaporada de 0,20% y en la de roca un 0,50%.

En cuanto a las salmueras, Massacra (1964) determinó en 5 muestras de la utilizada en el salazonado de la bresaola, 2 de origen industrial y 3 de origen artesano, los siguientes parámetros: pH, nitratos, nitritos, cloruro sódico, ácido láctico, nitrógeno total y nitrógeno soluble.

Cantoni *et al.* (1967) investigaron la composición química de la salmuera de la coppa, determinando el pH, nitritos, concentración de ClNa y contenido de nitrógeno total, no proteico y amídico.

En la salmuera de jamón cocido, Cantoni *et al.* (1968) procedieron al estudio de los siguientes parámetros: pH, nitrógeno total y amínico, amoníaco libre y ligado, ClNa y nitritos.

I.1.5. Acciones de los agentes de curado

Los agentes de curado (nitratos y nitritos) cumplen importantes funciones en los productos cárnicos curados. Los nitritos adicionados directamente o formados por reducción microbiana de los nitratos, contribuyen al desarrollo del color, del aroma, poseen una acción antioxidante e inhiben el crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos.

El color típico de las carnes curadas es el resultado de la reacción entre la mioglobina y el óxido nítrico (NO) formado a partir de los nitritos, bien por reducción o a partir del ácido nitroso sin disociar. La velocidad de la reacción depende de la temperatura, pH, oxígeno, presencia de sustancias reductoras, etc. La cantidad mínima de nitrito necesaria para producir un color adecuado se ha cifrado en 30-50 ppm (Wirth, 1989). Los nitritos ejercen también una acción antioxidante de las grasas en los productos cárnicos curados (MacDonald *et al.*, 1980; Igene *et al.*, 1985; Morrissey y Tichivangana, 1985). Igene *et al.* (1985) han establecido que al menos son tres los mecanismos responsables del efecto antioxidante de los nitritos durante el curado: 1) evitando la liberación del hierro de los pigmentos hemo, 2) interaccionando con el hierro liberado y 3) estabilizando los lípidos dentro de la membrana. Se desconoce cual es la concentración mínima de nitritos para el desarrollo de este efecto beneficioso (Müller, 1991).

La acción antimicrobiana de los nitritos en los productos cárnicos sigue siendo en la actualidad la razón más importante para su uso. En general se admite que el crecimiento de microorganismos responsables de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias se ve inhibido a concentraciones del orden de 80-150 ppm. Sin embargo, el efecto antimicrobiano de los nitritos debe considerarse siempre en combinación con otros factores como el pH, la actividad de agua o la temperatura (Wirth, 1989; Vösgen, 1992).

La intervención de los nitritos en el flavor de los productos cárnicos curados ha sido establecida mediante dos tipos de estudios. En unos, se ha determinado la presencia de diversos compuestos volátiles en dichos productos, en los que se llevó a cabo la adición de nitratos y/o nitritos, habiendo muchos estudios referidos concretamente a productos cárnicos crudo-curados -jamones y embutidos- (Ockerman *et al.*, 1964; Lillard y Ayres, 1969; Berger *et al.*, 1990; Berdagué *et al.*, 1991, 1993 a,b; Croizet *et al.*, 1992; Buscailhon *et al.*, 1993, 1994; Johansson *et al.*, 1994; Stahnke, 1994); sin embargo, en estos estudios no se hace referencia a la relación existente entre la presencia de nitritos y los volátiles identificados, probablemente por que se considera una práctica normal en el curado de las carnes la adición de agentes del curado. En un segundo tipo de estudios, se ha comparado la presencia de

volátiles en productos cárnicos curados y no curados, aunque siempre tratados por el calor (Cross y Ziegler, 1965; Mottram *et al.*, 1984; Ramarathnam *et al.*, 1991). En estos trabajos se ha puesto de manifiesto la ausencia o niveles muy bajos de compuestos característicos de la oxidación de los lípidos -hexanal y heptanal, principalmente- en los productos cárnicos con nitritos. Estos resultados sugieren que la acción de los nitritos en el flavor se establece principalmente, a través de su acción antioxidante. Sin embargo, debido a que el anión nitrito es muy reactivo, este podría participar en numerosas reacciones dando lugar a compuestos responsables del flavor (Dumont *et al.*, 1990; Dainty y Blom, 1995). En este sentido, Mottram *et al.* (1984) pusieron de manifiesto en bacon elaborado con nitritos, la presencia de diversos alquitratos y nitrilos y Barbieri *et al.* (1992) de benzonitrilo en jamones de Parma; se desconoce cual es la intervención en el flavor de este tipo de compuestos. No se han realizado estudios en los que se compare la presencia de volátiles en productos cárnicos crudo-curados, incluidos los embutidos, elaborados con nitritos o sin ellos.

El uso de nitritos puede causar problemas en la salud de los consumidores. Por sí mismos son tóxicos a altas concentraciones, dando lugar a una metahemoglobinemia. Pero la mayor preocupación proviene de las nitrosaminas (cancerígenas) que pueden formarse en el propio producto cárnico al reaccionar los nitritos con aminas secundarias o en el estómago del consumidor.

Las medidas tomadas por los distintos países para hacer frente a este último problema, ha sido regular el uso de los nitratos y nitritos en los alimentos. En general las acciones emprendidas consisten en una limitación en la adición de los nitratos a determinados productos y la disminución de los niveles máximos permitidos de nitritos.

Además de los compuestos citados anteriormente, las mezclas del curado suelen incorporar azúcares, cuya acción principal -además de disminuir el sabor salado del producto- es la de reforzar el poder reductor del medio y la de servir de medio nutritivo a las bacterias responsables de la reducción de nitratos a nitritos (Gray y Pearson, 1984).

Por otra parte el uso de ácido ascórbico o sus sales los ascorbatos -a niveles de 500 ppm- permite la reducción del contenido en nitritos residuales y la producción de nitrosaminas. Estas acciones, en unión de su acción reductora en el proceso de formación del color, hacen del ácido ascórbico un aditivo prácticamente imprescindible en los sistemas modernos de curado de la carne.

I.1.6. Tecnología de la elaboración de los productos cárnicos crudo-curados elaborados a partir de piezas enteras.- Jamones crudo-curados

En España la elaboración de jamones crudo-curados se lleva a cabo a partir de cerdos de raza blanca o bien cerdos de raza ibérica. Entre los primeros hay algunos de reconocido prestigio como el jamón de Teruel, jamón andorrano, jamón asturiano, etc. Entre los de cerdo ibérico existen algunos con denominación de origen (Guijuelo, Dehesa de Extremadura, Huelva).

La elaboración de jamón curado está sometida a variaciones dependiendo de la zona, tipo de industria, etc., si bien los principios generales son bastante similares en todos los sistemas seguidos. Fundamentalmente se siguen dos procedimientos, uno que podemos considerar de tipo "artesanal" que se lleva a cabo por métodos tradicionales y que coincide con las épocas frías del año (de Noviembre a Marzo) y otro de tipo "industrial" o "semiindustrial" realizado en muchos casos haciendo uso de las técnicas modernas de curado de la carne y que se puede desarrollar durante todo el año, como consecuencia de la utilización de métodos de deshidratación y refrigeración.

El proceso comienza con la fase que se puede denominar preparación de los perniles y comprende las operaciones de sacrificio, despiece, perfilado y sangrado de la extremidad posterior. Una vez finalizada la preparación de los perniles, se realiza lo que a veces se denomina presalado y que consiste en la aplicación de la mezcla del curado sobre toda la superficie del jamón, bien mediante aplicación manual o a través de la utilización de los denominados bombos de maceración.

A continuación los jamones son sometidos al proceso de salazonado en seco en los locales destinados al efecto, mediante la formación de pilas, alternando capa de sal-capas de jamones hasta una altura de ocho piezas. Últimamente este proceso se lleva a cabo en containers, lo que facilita la práctica industrial. Los jamones permanecen en el saladero a razón de 0,65-1,5 días/Kg de peso. La temperatura del local no debe superar los 4°C y la humedad relativa oscila entre 85-95%. En el sistema tradicional, se utiliza sal marina de grano grueso como único ingrediente, mientras que en los sistemas industriales es frecuente además la adición de agentes del curado, ácido ascórbico y azúcares. Finalizado el período de salazón los jamones se cepillan y lavan para eliminar el exceso de sal.

Posteriormente los jamones sufren la fase de post-salado, también denominada fase de asentamiento, equilibrado, ecualización, etc., que tiene por objeto conseguir la distribución homogénea de la sal por toda la masa del jamón. En los casos en que este tipo de productos se elaboran de forma artesanal, fundamentalmente estacional, esta fase se lleva a cabo en condiciones naturales por la coincidencia con las bajas temperaturas ambientales. Sin embargo, cada vez es más frecuente realizar este proceso en cámaras donde se controla la temperatura y la humedad relativa, oscilando la primera entre 3-7°C y la segunda entre el 85 y el 90%. El tiempo de permanencia en estas cámaras es de 30-45 días.

Los jamones sufren posteriormente un proceso de secado, que en el caso del ibérico y aquellos otros elaborados artesanalmente se lleva a cabo normalmente de forma natural, en secaderos donde la regulación de la temperatura y de la humedad se consigue por métodos empíricos, abriendo o cerrando las ventanas de los locales según las condiciones climáticas ambientales. En algunos casos (como en la zona de Jabugo), el secado se realiza en naves expuestas a la intemperie, protegidas únicamente de la acción directa de los rayos solares y de la lluvia por tejados soportados por columnas, sin paredes que pudieran obstaculizar la circulación del aire típico de la zona de producción. Esta fase se da por concluída cuando se ha conseguido la fusión de la grasa del jamón tanto externa como interna (“sudado”), fenómeno que tiene una gran importancia en el aroma, pasando después a las bodegas donde se continúa el proceso de maduración. El tiempo de permanencia en las mismas es variable dependiendo de su peso, aunque en el caso del jamón de cerdo ibérico elaborado en Guijuelo es de al menos 9 meses.

En el caso de los jamones de cerdo blanco, el secado tiene lugar en cámaras donde la temperatura, humedad y velocidad del aire se controlan artificialmente. En general hay una tendencia cada vez más acentuada a realizar esta fase en una serie de ciclos (3-4) aumentando paulatinamente la temperatura. Siendo por lo tanto muy difícil especificar cuales son la temperatura y humedad realmente utilizadas, aunque generalmente la primera oscila entre los 25-45°C y la segunda entre el 65-80%. Una vez transcurridos 4-5 meses, incluso menos, los jamones sufren el proceso de “estufado” utilizando temperaturas elevadas (25-45°C), con el fin de acelerar las reacciones del curado. El fin del proceso madurativo se decide por especialistas merced a la "cala" (pinchazo con un hueso de tibia de caballo o vaca a nivel de la articulación coxofemoral).

I.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA SAL Y PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

Tanto en la sal como en distintos productos cárnicos curados son diversas las investigaciones llevadas a cabo para conocer la flora microbiana presente en los mismos. Además de establecer los recuentos alcanzados por diversos grupos microbianos (halotolerantes, aerobios mesófilos, flora ácido-láctica, micrococáceas, hongos, levaduras, etc.), se ha llevado a cabo también la identificación de diversas especies pertenecientes a las familias Micrococcaceae y Lactobacillaceae.

A continuación y antes de hacer referencia a estos aspectos describiremos las características de las micrococáceas y la problemática que representa la identificación de géneros y especies de dicha familia.

I.2.1. Características de las Micrococáceas

En el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986), la Familia de las Micrococáceas se divide en 4 géneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus*.

La familia Micrococcaceae comprende una serie de microorganismos de forma esférica cuya división se realiza en más de un plano por lo que dan lugar a la aparición de racimos o paquetes cúbicos. Aunque algunas especies son móviles con un número variable de flagelos, la mayoría carecen de motilidad. No son formadoras de esporas y siempre presentan una reacción positiva al método de Gram. Su metabolismo es respiratorio o fermentativo produciendo ácido a partir de la glucosa pero nunca gas. Son aerobias o anaerobias facultativas y productoras de catalasa.

Todas las especies de esta familia pueden crecer en presencia de un 5% de ClNa y la mayoría lo hacen a concentraciones de ClNa del 10-15%.

I.2.1.1. Género *Micrococcus*

Las especies de este género se dividen en más de un plano pudiendo aparecer aisladas, formando parejas, racimos irregulares, tetradas o paquetes cúbicos. Son todas inmóviles. Su metabolismo es estrictamente oxidativo. Oxidan la glucosa a acetato o, más intensamente a

CO₂ y agua. Son productoras de catalasa. Son aerobias obligadas, siendo capaces de crecer en presencia de más del 5% de ClNa. Son resistentes a la acción de la lisostafina. La especie tipo es *Micrococcus luteus*.

En el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) se describen 9 especies pertenecientes al género *Micrococcus*. Las características de las especies que más frecuentemente han sido aisladas de los productos cárnicos curados se describen a continuación:

M. lylae.- El crecimiento óptimo se encuentra en el rango de temperatura de 25-37°C. Crece en agar nutritivo con 7,5% de ClNa. No reduce los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es 66-72 (Kocur *et al.*,1971).

M. nishinomiyaensis.- Crece bien entre 25-37°C. No crece en agar nutritivo con 7,5% de ClNa. Algunas cepas reducen los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es 66,4-71,1 (Kocur *et al.*,1975).

M. roseus.- La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25-35°C. Crece en agar nutritivo con 7,5% de ClNa. Reduce los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es 66-75 (Bohàcek *et al.*,1969).

M. luteus.- La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25-37°C. Crece en agar nutritivo con 7,5% de ClNa. No reducen los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es 70-75,5 (Kocur *et al.*,1971).

M. varians.- La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25-37°C. Crece en agar nutritivo con 7,5% de ClNa. Reduce los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es 66-72 (Kocur *et al.*,1971).

M. kristinae.- Presenta un crecimiento óptimo en el rango de temperaturas entre 25 y 37°C. Crece en agar nutritivo con 7,5% de ClNa. No reduce los nitratos. El % de G+C del DNA es 66,8±0,2 (Kloos *et al.*, 1974).

I.2.1.2. Género *Staphylococcus*.

Los organismos que pertenecen a este género se caracterizan por dividirse en más de un plano, formando racimos o paquetes irregulares. No son móviles.

Su pared celular presenta dos componentes fundamentales: un peptidoglicano y ácidos teicoicos asociados y proteínas. Las subunidades peptídicas del peptidoglicano, están unidas por enlaces N-acetil-muramil-L-alanina; las cadenas peptídicas están unidas a su vez por puentes constituídos por una segunda cadena en cuya composición se encuentra la glicina; estos puentes se extienden desde la L-lisina hasta la D-alanina terminal de la otra subunidad peptídica. Estos puentes de glicina son muy sensibles a la acción de la lisostafina.

Las proteínas juegan un papel importante como antígenos de la pared celular ya que actúan como receptores para la adhesión de proteínas de eucariotas como son: fibrinógeno, fibronectina, laminina y colágeno (Wadström y Rozgonyi, 1986).

Su metabolismo es oxidativo y fermentativo. Pueden utilizar gran número de carbohidratos, particularmente en aerobiosis con producción de ácido, aunque en condiciones normales no se ha detectado la producción de gas. En anaerobiosis producen principalmente ácido láctico a partir de la glucosa y en aerobiosis, ácido acético y pequeñas cantidades de CO₂. Son aerobios facultativos, pero crecen mucho mejor en condiciones de aerobiosis. La mayoría de las especies crecen en presencia del 15% de ClNa y 40% de bilis. Son resistentes a la lisozima (100 µg/ml) y productores de catalasa. Son productoras de toxinas y enzimas extracelulares, hidrolizando gran variedad de proteínas y lípidos.

Se presentan asociados a la piel, glándulas epidérmicas y membranas mucosas de animales de sangre caliente y muchas de ellas son potencialmente patógenas. La especie tipo es *Staphylococcus aureus*.

En el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) aparecen 19 especies del género *Staphylococcus* y en la actualidad comprende 27 especies: *S. lentus* y *S. chromogenes*, han sido elevadas a la categoría de especies desde el rango de subespecies (Schleifer *et al.*, 1983; Hájek *et al.*, 1986) y se han descrito 6 nuevas especies: *S. arlettae*, *S. equorum*, *S. kloosii* (Schleifer *et al.*, 1984), *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* (Freny *et al.*, 1988) y *S. delphini* (Varaldo *et al.*, 1988).

A continuación describiremos las características de las especies que más frecuentemente han sido aisladas de los productos cárnicos curados.

S. xylosus.- Crece bien en concentraciones de ClNa por encima del 10%. Todas las cepas crecen entre 10-40°C (óptimo 25-35°C). Alrededor del 80% de las cepas reducen los nitratos. El % de G+C del DNA es del 30-36.

S. equorum.- Todas las cepas crecen óptimamente a 30°C y más lentamente a 37°C. Reducen los nitratos. El % de G+C del DNA es 33-34.

S. saprophyticus.- Crece bien en concentraciones de ClNa por encima del 10% y moderadamente al 15%. Algunas cepas crecen entre 10-40°C (óptimo 28-35°C). Está estrechamente relacionado por el DNA con *S. cohnii* y *S. xylosus* y otras subespecies de *S. saprophyticus* (Schleifer *et al.*,1979; Kloos y Wollshohl, 1982). Muchas especies reducen los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es del 31-36.

S. intermedius.- Crece bien en concentraciones de ClNa por encima del 12,5% y pobremente al 15%. Todas las cepas crecen entre 15-45°C (óptimo 30-40°C). Reducen los nitratos a nitritos. No están relacionados por el DNA con otras especies. El % de G+C del DNA es 31-36.

S. sciuri.- Crece bien en concentraciones de ClNa por encima del 10% y pobremente al 15%. Crecen entre 15-40°C (óptimo 25-35°C). Reducen los nitratos a nitritos. La relación del DNA de *S. sciuri* y *S. lentus* es muy estrecha, sin embargo, no están relacionados con otras especies de *Staphylococcus*.

S. simulans.- Crece bien a concentraciones de ClNa por encima del 10% y tiene un crecimiento menor al 15%. La temperatura de crecimiento se encuentra entre 15-45°C (óptimo 25-40°C). Muchas cepas reducen los nitratos. Está estrechamente relacionado por el DNA con *S. carnosus*. El % de G+C del DNA es 34-38.

S. carnosus .- Crece bien en concentraciones de ClNa por encima del 15%. La temperatura de crecimiento se encuentra entre 15-45°C (óptimo 30-40°C). Reduce los nitratos a nitritos. El % de G+C del DNA es 35-36.

S. capitis.- Crece en concentraciones de ClNa por encima del 10%. La mayoría de las cepas crecen entre 18-45°C (óptimo 30-40°C) y reducen los nitratos. El % de G-C del DNA es del 31-36.

S. hominis.- Crece bien en concentraciones de ClNa por encima del 7,5% y débilmente al 10%. La mayoría de las cepas crecen entre 20 y 45°C (óptimo 30-40°C) y reducen los nitratos. El % de G+C del DNA es del 30-36.

I.2.1.3. Otros géneros

Dentro de la familia Micrococcaceae se encuentran incluidos otros dos géneros: *Stomatococcus* y *Planococcus*. Las especies de *Stomatococcus* presentan cápsula. No son móviles, no forman esporas. Son anaerobias facultativas. Producen ácido, pero no gas a partir de la glucosa y de otros azúcares. La especie tipo es *Stomatococcus mucilaginosus*. Fue descrito como nuevo género por Bergan y Kocur en 1982.

Las especies de *Planococcus* pueden presentarse solas, en pares y ocasionalmente en tetradas. No forman esporas. Son móviles pudiendo presentar uno o dos flagelos. Son aerobias. Catalasa positivas. Crecen bien en agar nutritivo al que se añade 1-12% de ClNa. Algunas cepas hidrolizan la gelatina, no actúan sobre los carbohidratos en medios normales y no reducen los nitratos a nitritos. La especie tipo es *Planococcus citreus*.

I.2.2. Problemática de la identificación de las Micrococáceas

La identificación de las Micrococáceas constituye una problemática actual de la Microbiología sobre todo en relación con la adscripción a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. A continuación se hace un breve resumen de este aspecto, interesante para nosotros porque constituye uno de nuestros objetivos.

La separación de micrococos y estafilococos ha sido, durante mucho tiempo, un tema polémico. A finales del siglo XIX, todos los cocos se incluyeron en la Familia Cocaceae, la cual fue subdividida por Flüge en 1890 (Kloos, 1980) desde el punto de vista médico en dos grupos; en el primero se incluyeron los estafilococos, estreptococos y gonococos y en el otro los micrococos saprofiticos. En 1906, Winslow y Rogers (Kloos, 1980) dividieron la familia Cocáceas en 2 subfamilias: Paracoccaceae y Metacoccaceae; perteneciendo los estafilococos a la primera y los micrococos y las sarcinas a la segunda. Esta división igual que la anterior,

separa estos microorganismos desde el punto de vista de su patogenicidad. Hasta la década de los 50 los taxónomos no aportaron ninguna novedad digna de destacar.

Evans *et al.* (1955), propusieron una clasificación atendiendo a sus relaciones con el oxígeno; las especies anaerobias facultativas fueron incluidas en el género *Staphylococcus* y las aerobias obligadas en el *Micrococcus*. Esta clasificación ha influido poderosamente en la sistemática desarrollada en años posteriores. En 1965 el Subcomité de estafilococos y micrococos de la International Association of Microbiological Societies, estableció una prueba basada en los estudios de Evans, para separar los estafilococos de los micrococos. Los estafilococos eran aquellos cocos Gram positivos, catalasa positivos, que crecen en anaerobiosis y producen ácido a partir de la glucosa en un medio de peptona-extracto de levadura; en cambio los micrococos solo crecen en aerobiosis. Esta prueba fue mejorada por Evans y Kloos (1972), sin embargo, su validez como criterio único para la separación de los dos géneros ha estado sometida a controversia por presentar, a veces, problemas de interpretación, al haberse demostrado que en condiciones de anaerobiosis algunos microorganismos clasificados como *Staphylococcus* no producen ácido a partir de la glucosa (Rosypal *et al.* 1966 ; Mortensen y Kocur 1967) y por otra parte algunos microorganismos del género *Micrococcus* producen ácido, aunque en pequeñas cantidades, a partir de la glucosa (Schleifer y Kloos 1976; Fischer y Schleifer 1980).

Para superar los problemas planteados por la prueba de la oxidación/fermentación se realizan otros métodos que pueden utilizarse en los laboratorios de control microbiológico de manera rutinaria, siendo el más difundido el de la sensibilidad a la lisostafina.

La lisostafina es una sustancia proteica extracelular producida exclusivamente por *Staphylococcus staphylolyticus*, que parece corresponderse con la especie *S. simulans* (Sloan *et al.*,1982). La lisostafina posee actividad lítica frente a los estafilococos debiéndose a la acción de una peptidasa sobre los enlaces glicil-glicina de los puentes interpeptídicos del peptidoglicano de la pared celular. La importancia de esta prueba para la diferenciación de los dos géneros se basa en que solo los estafilococos poseen puentes constituídos por glicina, aunque algunos estafilococos presentan una ligera resistencia a este enzima ya que en ellos se encuentra parcialmente sustituida la glicina por alanina o serina (Schleifer y Kandler, 1972; Schleifer y Kocur, 1973); está demostrado que esta sustitución no se presenta en las cepas coagulasa positivas y sí en las cepas coagulasa negativas. Apoyándose en este criterio, algunos autores (Kloos y Schleifer, 1975) han propuesto el grado de sensibilidad frente a la lisostafina como método útil para diferenciar ambos géneros. Se consideran como miembros

del género *Staphylococcus* todas aquellas cepas cuyo crecimiento se inhibía por la presencia de lisostafina en el medio. Siguiendo el mismo criterio, se consideran como miembros del género *Micrococcus* todas aquellas cepas que crecen en presencia de lisostafina.

Sin embargo, hay numerosos autores que han puesto de manifiesto la resistencia a la lisostafina de diversos estafilococos (de la Rosa *et al.*, 1990; Comi *et al.*, 1992; Venugopal *et al.*, 1994).

Según la opinión de Baird-Parker (1974), la prueba de la oxidación/fermentación de la glucosa junto con la sensibilidad a la lisostafina es el método rutinario más adecuado para la separación de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

Otro de los métodos de separación de los dos géneros se basa en la capacidad de producción de ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina, que solamente poseen los estafilococos. La eritromicina es un macrólido que actúa bloqueando la translocación de los aminoácidos desde el lugar aceptor al locus donante, con lo que se inmoviliza el aminoacil-t-RNA (Fey, 1978). De la Rosa *et al.* (1990) observan, sin embargo, la producción de ácido a partir del glicerol en numerosos micrococos y la ausencia en su formación en diversas cepas de estafilococos. Venugopal *et al.* (1994) no encuentran útil este test cuando la concentración de eritromicina es de 5 µg/100 ml, aunque un aumento en los niveles de este antibiótico hasta los 10 µg/100 ml resulta válido en la diferenciación de estos dos géneros.

Uno de los métodos de separación de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* consiste en la determinación del porcentaje de G+C del DNA que ha sido objeto de estudio por parte de numerosos investigadores (Silvestri *et al.*, 1965; Bohacek *et al.*, 1965; Rosypal *et al.*, 1966), quienes indicaron que los estafilococos presentaban un contenido de G+C del 30-39% y los micrococos del 63-73%. Sin embargo, se han encontrado algunas excepciones que han sido descritas por (Schleifer y Kocur, 1973; Kloos *et al.*, 1974; Kloos y Schleifer 1975 a y b; Schleifer y Kloos, 1975 a y b).

También pueden ayudar a separar los dos géneros, algunas características químicas y bioquímicas, como la presencia de ácidos teicoicos en la pared celular y los ácidos grasos de cadena larga en los estafilococos, mientras que los micrococos carecen de ambos. Otra diferencia se encuentra en la presencia de citocromos c y d en los micrococos y su ausencia en los estafilococos (Schleifer y Kroppenstedt, 1990).

Curry y Borovian (1976) y von Rheinbaben y Hadlok (1981) describieron un método selectivo para el aislamiento de micrococos en presencia de poblaciones de estafilococos, este medio tiene como componente el nitrofurano y es conocido como agar FTO, permite el crecimiento de los micrococos e impide el de los estafilococos.

Seidl y Schleifer (1978), describieron un método de separación serológica entre los dos géneros basado en los diferentes tipos de peptidoglicanos. Para ello prepararon el antisuero frente a antígenos sintéticos, que consistían en residuos de pentaglicano unidos por enlace covalente con el carboxilo terminal de la albúmina sérica humana. Este antisuero aglutina fuertemente todos los peptidoglicanos de los estafilococos, ya que todos presentan puentes interpeptídicos de oligoglicina con residuos de glicina N-terminal. Las preparaciones de peptidoglicano de micrococos no reaccionan con este antisuero.

Schumacher-Perdreau *et al.* (1978), utilizaron fagos polivalentes aislados de estafilococos coagulasa negativos, que son adsorbidos cuantitativamente por todos los estafilococos pero no por los micrococos.

Schleifer y Krämer (1980), emplearon un medio selectivo para el aislamiento de *Staphylococcus* basándose en la utilización de la furoxina y furazolidona, en él crecen bien todos los estafilococos excepto, *S. intermedius*, en cambio los micrococos son inhibidos.

Falk y Guering (1983), utilizaron discos de bacitracina para diferenciar los dos géneros ya que los estafilococos son resistentes a su acción.

Para identificar las especies pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* se han utilizado una serie de pruebas bioquímicas que se citan a continuación.

Para la caracterización de las especies del género *Micrococcus*, se llevan a cabo una serie de pruebas bioquímicas entre las que se encuentran; reducción del nitrato (Cowan, 1974 y Harrigan y McCance, 1976); hidrólisis de la gelatina, utilización del citrato (Kloos *et al.*, 1974), producción de acetoína (Buttiaux *et al.*, 1974).

En el caso del género *Staphylococcus* se realizan las siguientes determinaciones: actividad oxidasa (Faller y Schleifer, 1981); beta-galactosidasa (ICMSF, 1978); producción de acetoína (Harrigan y McCance, 1976); DNasa (Lachica *et al.*, 1971a y b); producción de

nitrate (Cowan, 1974); production of acid from mannitol, glucose, fructose, maltose, xylitol, xylose and sucrose (APHA 1976).

Other methods used in identification are based on a biochemical study performed using classic miniaturized techniques, among them are: API STAPH, API STAPH-IDENT System and the ATB 32 STAPH System.

The data base of the identification system of ATB 32 STAPH that has been used for the realization of this work, is constituted by a set of taxonomic - bacterial groups that the galleries distinguish one from another - and by the percentages of positive reactions of each one of the taxonomic groups with each test. A taxonomic group can be: a bacterial species, a biotype -subset of bacteria that can have the same biochemical behavior on the gallery- and a regrouping of species or mixed taxonomic group.

The numerical identification of the observed profile, is based on: 1/ The calculation of its relative proximity to the different taxonomic groups of the data base (% id.) and to the most typical profile in each taxonomic group (index T). 2/ Classification of the taxonomic groups. 3/ Proposal of a result.

In the quality of identification we take into account its percentage and the index T; according to this, we consider: Excellent identification when $\% id \geq 99,9$ and $T \geq 0,75$; Very good identification $\% id \geq 99,0$ and $T \geq 0,5$; Good identification $\% id \geq 90,0$ and $T \geq 0,25$; Acceptable identification $\% id \geq 80,0$ and $T \geq 0$; Suspicious profile when among the proposed profiles there is a taxonomic group with at least one test in contrast, with a frequency of 0 or 100 %.

This system gives a better identification of *Staphylococcus* isolates from food, as has been demonstrated by Delarras (1991) when comparing it with the other 2 identification systems API STAPH and API STAPH-IDENT.

The API STAPH gallery has 20 biochemical characters for the differentiation of staphylococci and micrococci. Numerous investigators have made manifest their reproducibility and reliability (Deveaux, 1977; Brun *et al.*, 1978; Delarras, 1981; Gemmel and Dawson, 1982; Baldellon and Magraud, 1985; Molina *et al.*, 1989; Papa and Grazia, 1991). This gallery allows identifying 17 species and biotypes.

El sistema API-STAPH-IDENT presenta 10 test bioquímicos en microcúpulas, asegura después de 5 horas de incubación a 35-37°C la identificación de 13 especies de estafilococos de origen humano y animal. Este sistema de identificación ha sido empleado por numerosos autores (Giger *et al.*, 1984; Hussain *et al.*, 1986; Rather *et al.*, 1986; Watts y Nickerson, 1986).

El sistema ATB 32 STAPH comprende 32 cúpulas de las cuales 26 son tests. Después de 24 horas a 37°C la lectura permite la identificación de las 24 especies de estafilococos actualmente conocidas, así como las de micrococos y otros dos géneros más (*Stomatococcus* y *Aerococcus*).

I.2.3. Microbiología de la sal

La sal utilizada en el salazonado-curado de los distintos productos cárnicos presenta un determinado grado de contaminación microbiana que es función entre otros factores del proceso tecnológico seguido en su obtención.

La microflora de la sal no refinada según ha puesto de manifiesto Dempster (1973), consiste principalmente en bacilos aerobios esporulados y no, micrococos y hongos. El tipo de sal determina las proporciones de cada grupo microbiano, así el 85% de los gérmenes aislados de la sal marina pertenecen a *Bacillus* spp. y el 15% restante a *Micrococcus* y *Sarcina* spp. Los recuentos de los aislamientos de sal gema, representan alrededor del 70% de *Micrococcus* spp, siendo *Corynebacterium* spp. los siguientes más abundantes.

Carrascosa *et al.* (1988) estudiaron la microbiología de una muestra de sal utilizada en la salazón de jamón de cerdo blanco, obteniendo los siguientes resultados: Aerobios mesófilos 4,60 log ufc/g; Micrococáceas 3,9 log ufc/g; Levaduras 2,70 log ufc/g y Bacterias ácido-lácticas, Enterobacterias, Estreptococos fecales y Clostridios sulfito-reductores en cantidades inferiores a 2 log ufc/g.

En una muestra de sal marina, utilizada también para el salazonado de jamón, Cornejo *et al.* (1992), observaron tasas ligeramente superiores a 10^5 ufc/g de aerobios mesófilos y Micrococcaceae; mientras que los niveles de levaduras fueron inferiores a 10^4 ufc/g.

Marín *et al.* (1993) han determinado el número de microorganismos en dos muestras de sal nueva y dos de "sal de curado", desconocemos en este último caso si se trata de sal

preparada para su utilización y en la que deben estar presentes todos los ingredientes de la mezcla de curado o de la sal que ya ha estado en contacto con los jamones, aunque probablemente se trate de este último tipo. En el caso de la sal nueva los recuentos de bacterias aerobias mesófilas fueron de $4 \cdot 10^3$ ufc/g y los de enterobacterias y estreptococos fecales inferiores a 10 ufc/g. En la sal de curado el número de bacterias aerobias mesófilas fue de $7,1 \cdot 10^5$ ufc/g, el de estreptococos fecales de $1,1 \cdot 10^3$ ufc/g y el de enterobacterias y clostridios sulfito-reductores inferior a 10 ufc/g.

Según Dellaglio (1984) y Marín *et al.* (1993) la sal nueva de curado empleada presenta una calidad microbiológica aceptable, por lo que la contaminación posterior se debe al contacto de la sal con la superficie de las piezas cárnicas, los manipuladores y el ambiente de la fábrica, así como a su reutilización.

I.2.4. Microbiología de las salmueras

La microbiología de las salmueras que se preparan específicamente para el salazonado de diversos productos cárnicos -jamones crudo-curados, bacon, jamón cocido etc.-, mediante inmersión o inyección de las mismas ha sido estudiada por diversos autores. Cantoni (1964), estudió la microbiología de la salmuera formada en la elaboración de la bresaola y observó la presencia de diversas especies pertenecientes a distintas familias: Micrococcaceae, Lactobacillaceae, Enterobacteriaceae y Bacillaceae. Identificó diversas especies pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*: *M. roseus*, *M. caseolyticus*, *M. flavus*, *M. conglomeratus* y *S. epidermidis*.

La flora microbiana de la salmuera del bacon Wiltshire ha sido estudiada por numerosos autores. Los recuentos bacterianos efectuados por Ingram (1958), alcanzan niveles de 10^7 - 10^8 ufc/ml siendo esta flora muy heterogénea. Ingram (1962) observó que el género predominante era *Achromobacter* spp, aunque también estaban presentes otros gérmenes halófilos de difícil aislamiento.

Varnam y Grainger (1973), indicaron que los dos grupos de bacterias numéricamente más importantes en las salmueras del bacon son las Gram negativas, oxidasa positivas con forma de bastón y *Staphylococcus* -*Micrococcus*. Aislándose del orden de 10^8 - 10^9 colonias/ml, de los que un 10-20% pertenecen al segundo grupo.

Los análisis efectuados por Gardner y Patton (1978), indican que la flora bacteriana de las salmueras líquidas utilizadas en el proceso de elaboración del bacon, presentan un predominio de los géneros: *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, además de bacterias corineformes que son los contaminantes comunes de las canales de los cerdos.

La microbiología de las salmueras utilizada en el salazonado de la "coppa" italiana fue estudiada por Cantoni *et al.* (1967). Los microorganismos aislados pertenecían a las siguientes familias: Pseudomonaceae, Spirillaceae, Achromobacteriaceae, Micrococcaceae, Brevibacteriaceae, Corinebacteriaceae, Lactobacillaceae y Bacillaceae. Las micrococáceas representaron el grupo más relevante, alcanzando una tasa del orden de 10^7 en la segunda mitad del período de salazón. De las 345 micrococáceas aisladas, 117 se adscribieron al grupo M₅-M₆, 69 al grupo M₂, 30 al grupo M₃, 65 al grupo M₄, 35 al grupo M₇, 13 al grupo *Staphylococcus* II y 20 a *Staphylococcus* V, según el esquema de Baird-Parker.

La flora microbiana presente en la salmuera utilizada en la elaboración de jamón cocido fue estudiada por Cantoni *et al.* (1968), quienes observaron la presencia de gérmenes halotolerantes y halófilos. Entre los halotolerantes destaca la abundancia del grupo *Achromobacter-Alcaligenes* y entre los halófilos la de numerosos géneros.

Al estudiar la salmuera del jamón cocido italiano, Papa y Grazia (1991) encontraron un predominio del género *Staphylococcus* (104 cepas), frente a 16 cepas de *Micrococcus*, siendo la especie más representativa *S. xylosus*, seguido de *S. carnosus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*.

Leistner (1958) puso de manifiesto en la salmuera utilizada en el salazonado del jamón crudo-curado alemán el predominio de las micrococáceas, aunque también estaban presentes bacterias Gram negativas halotolerantes y psicrófilas. Generalmente pertenecen al género *Vibrio*.

Leistner (1959) comprobó en la salmuera de jamón alemán, la existencia de al menos 23 géneros diferentes, siendo los más numerosos: *Micrococcus*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Streptococcus* y *Alcaligenes*.

Schillinger y Lücke (1989) estudiaron la microbiología de 47 muestras de este tipo de salmuera. Observaron la presencia de lactobacilos en 37 de ellas, siendo *L. sake* el más abundante. Las micrococáceas también estaban presentes en 37 muestras, generalmente en

recuentos inferiores a 10^6 ufc/g. Así mismo, encontraron la existencia de bacterias Gram negativas (*Vibrio*, *Bacillus*) y levaduras.

I.2.5. Microbiología de los jamones crudo-curados y otros productos cárnicos elaborados a partir de piezas enteras

La presencia de microorganismos en los distintos tipos de jamones crudo-curados que se elaboran en el mundo ha sido estudiada por diversos autores con el fin de establecer su evolución a lo largo del período madurativo, así como la tasa final de diversos grupos microbianos, tanto en la profundidad de la masa muscular como en la superficie del producto.

La microbiología de los jamones "country style" elaborados en Norteamérica ha sido establecida entre otros por Graham y Blumer (1971); Langlois y Kemp (1974) y Kemp *et al.* (1978, 1982). Durante el período madurativo se ha observado la presencia de micrococáceas, el crecimiento superficial de hongos y levaduras y una amplia variabilidad en la tasa de lactobacilos.

Giolitti *et al.* (1971 a y b), Baldini *et al.* (1977), Baldini y Raczynski (1979), Raczynski *et al.* (1978) y Chizzolini *et al.* (1993) han observado, en términos generales, un aumento de los distintos tipos de microorganismos en las primeras fases de elaboración del jamón de Parma que descienden en las etapas finales. Los micrococos y la flora halófila y halotolerante son los microorganismos más abundantes; por el contrario, los lactobacilos y las levaduras son muy escasos en este producto cárnico.

En los jamones elaborados en España, el primer trabajo llevado a cabo para conocer su microbiología fue desarrollado por Francisco *et al.* (1981) en jamón de cerdo ibérico procedente de Jabugo. Los citados autores observaron un escaso número de gérmenes halotolerantes y de estafilococos a lo largo de la maduración en los tejidos profundos, así como un incremento a partir del segundo y séptimo mes. Los recuentos efectuados en superficie de todos los grupos de bacterias mencionados, fueron altos, aunque el número de bacterias ácido-lácticas fue poco elevado (10^3 - 10^4 ufc/g). Hugas y Monfort (1986) estudiaron también en jamones ibéricos la evolución de diversos grupos microbianos en superficie y en profundidad. Estos autores observaron recuentos más elevados de todos los grupos microbianos que los citados por Francisco *et al.* (1981). Los microorganismos predominantes eran los micrococos y los estafilococos coagulasa negativos.

Silla *et al.* (1985) en jamones de cerdo blanco observaron que los recuentos más altos en tejidos profundos eran los de los halotolerantes (10^3 - 10^6 ufc/g), seguidos de los micrococos y estafilococos (10^3 - 10^5 ufc/g), levaduras (10^4 ufc/g) y bacterias ácido-lácticas (10^2 ufc/g). También en jamones de cerdo blanco, elaborados por procesos de maduración lento y rápido, Silla *et al.* 1989 cuantificaron los grupos microbianos de interés. Encontraron que la flora predominante, tanto en superficie como en profundidad, durante el proceso madurativo, pertenecía a la familia Micrococcaceae; las levaduras y las bacterias ácido-lácticas también estaban presentes aunque los recuentos eran mucho más bajos.

La evolución de la flora microbiana y los factores físico-químicos que afectan a su desarrollo durante un proceso de curado rápido de jamones de cerdo blanco fue estudiada por Carrascosa *et al.* (1988). Las micrococáceas, constituyen la flora predominante, los lactobacilos no fueron detectados y las levaduras permanecieron constantes durante todo el proceso aunque los recuentos fueron bajos.

Hernández y Huerta (1993) observaron la evolución de los diversos grupos microbianos -aerobios totales, halotolerantes, ácido-lácticas y levaduras- en 26 jamones de cerdo blanco. Todos los grupos aumentaron en número en la segunda y tercera etapas, alcanzando un máximo al inicio del curado, reduciendo su número hasta el final del proceso.

Las micrococáceas predominan tanto en la superficie como en profundidad en distintos tipos de jamones como: jamón de Parma (Giolitti *et al.*, 1971a; Baldini *et al.*, 1977; Baldini y Raczynski, 1978; Raczynski *et al.*, 1979), jamón americano "country style" (Kemp *et al.*, 1978, 1982) y jamón español (Francisco *et al.*, 1981; Silla *et al.*, 1985; Huerta *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 1994).

Son relativamente abundantes los estudios en los que se ha caracterizado las micrococáceas aisladas de los jamones crudo-curados, observándose un predominio de los estafilococos sobre los micrococos (Fischer y Scheleifer, 1980; Francisco *et al.*, 1981; Rheimbaben y Seipp, 1986; Molina *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1994).

En relación con las especies de *Staphylococcus*, Molina *et al.* (1989) observaron en jamón serrano crudo-curado, que las dos únicas especies presentes fueron *S. xylosus* (56%) y *S. sciuri* (44%). Rodríguez *et al.* (1994) en jamones ibéricos pusieron de manifiesto también la abundancia de *S. xylosus* (69%) seguido de *S. equorum* (7%) y *S. saprophyticus* (7%). Cornejo y Carrascosa (1991) y Carrascosa y Cornejo (1991) identificaron las especies

presentes en jamones curados por un proceso lento y rápido respectivamente llegando también a la conclusión que *S. xylosus* era la especie más abundante representando en ambos tipos de productos tasas del orden del 85% de los estafilococos encontrados.

La identificación de las especies de *Micrococcus* presentes en los jamones crudo-curados ha sido muy pocas veces llevada a cabo, probablemente debido a la menor presencia de especies de este género en comparación con la de *Staphylococcus*. Solamente Rodríguez *et al.* (1994), han puesto de manifiesto la presencia de *M. kristinae* en recuentos que representan el 87,5% de las 24 cepas de *Micrococcus* identificados.

Además de en los jamones crudo-curados se utiliza el sistema de salazonado en seco en el curado de otros productos cárnicos crudos como son la cecina de vacuno, el bündnerfleisch, la bresaola, etc. En algunos de estos productos se ha estudiado la evolución de diversos grupos microbianos a lo largo de la maduración y se han identificado las especies de algunos grupos microbianos presentes.

El **bündnerfleisch** alemán presenta una flora microbiana constituida mayoritariamente por lactobacilos y micrococos (Souci *et al.*, 1974; Hess *et al.*, 1976; Mercier *et al.*, 1989). Estos últimos llegan a alcanzar cifras de 10^9 ufc/g en la superficie del producto al final de la desecación (Mercier *et al.*, 1989).

En la **bresaola** italiana los recuentos de la flora varían a lo largo de la maduración, alcanzándose un aumento del número de bacterias totales y de las de la familia Micrococcaceae, que presenta recuentos del orden de $6 \cdot 10^4$ ufc/g el primer día de la maduración hasta llegar a valores de $3 \cdot 10^6$ ufc/g al final de la misma. La presencia de lactobacilos solo se detecta al final del proceso madurativo (Cantoni y Calcinardi, 1967). Bersani *et al.* (1991) han observado la presencia en este producto italiano de un 63% de estafilococos y un 37% de micrococos.

En el caso de la **pastirma**, la flora microbiana presente está constituida por bacterias ácido-lácticas (niveles superiores a 10^7 ufc/g), enterococos y estafilococos (El Khateib *et al.*, 1987; Kotzekidou, 1992). Las cepas aisladas como cocos Gram positivos, catalasa positivos pertenecen en un 92,5% al género *Staphylococcus* y en un 7,5% al género *Micrococcus*, predominando *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* entre los estafilococos y *M. varians* entre los micrococos (Kotzekidou, 1992).

En la **cecina** de vacuno elaborada en la provincia de León, se ha observado tanto en muestras de superficie como de profundidad un aumento de todos los grupos -bacterias halotolerantes, micrococáceas, bacterias ácido-lácticas y levaduras- durante las primeras etapas hasta la fase de ahumado, a partir de la cual descienden ligeramente (García, 1994). En este producto cárnico, se ha encontrado un 81,13% de cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, predominando: *S. equorum* (42,63%), *S. xylosus* (29,45%) y *S. saprophyticus* (10,85%) y el 11,32% de cepas adscritas a *Micrococcus*, perteneciendo a las especies: *M. roseus* (66,66%), *M. nishinomiyaensis* (27,77%) y *M. varians* (5,55%).

I.2.6. Microbiología de los embutidos fermentados

La microbiología de diversos tipos de embutidos fermentados elaborados en el mundo ha sido ampliamente estudiada. Se conoce la evolución de diversos grupos microbianos a lo largo de la maduración, se han identificado las especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y levaduras y se han establecido las características tecnológicas de diversas cepas para su posible utilización como starters.

Dentro del amplio mundo de la Microbiología de los embutidos fermentados, nos referiremos concretamente a los estudios llevados a cabo para la identificación de las Micrococáceas presentes. Hasta finales de los años 70, prevalecía la idea de que en este tipo de productos cárnicos existía un predominio de Micrococci (Sesma y Rodríguez Burgos 1976; Somavilla *et al.*, 1973). A partir de los años 80 y con el desarrollo de las técnicas que permiten diferenciar más correctamente los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*, se ha llegado a la conclusión de una mayor abundancia de las especies de este último género (Fischer y Schleifer, 1980; Rheinbaben y Hadlok, 1979; Comi *et al.*, 1986, 1992; Simonetti y Cantoni, 1983; Seager *et al.*, 1986; Buzzini *et al.*, 1994; Torriani *et al.*, 1994).

Sin embargo, Vignolo *et al.* (1988) en un estudio realizado en embutidos fermentados han encontrado que el género *Micrococcus* es más abundante que *Staphylococcus*, estando el primero en una proporción del 86% y el segundo en un 14%. También Simonetti *et al.* (1983), en un estudio realizado con 12 muestras de embutidos recién fabricados y 12 de embutidos ya madurados, observaron en el primer tipo un predominio del género *Micrococcus* (77,27%) frente a un 22,73% de *Staphylococcus*, mientras que en los embutidos madurados el predominante era el género *Staphylococcus* (57,45%) frente a un 42,25% de *Micrococcus*.

Las especies de *Staphylococcus* más abundantes en los embutidos fermentados son *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* y *S. intermedius* (Schleifer, 1980; Simonetti y Cantoni, 1983; Comi *et al.*, 1986,1992; Seager *et al.*, 1986; Fischer y Schleifer, 1980; Montel *et al.*, 1992; Encinas, 1993). En el caso de *Micrococcus*, las especies *M. kristinae* y *M. varians* son las predominantes (Fischer y Schleifer, 1980; Comi *et al.*, 1992; Torriani *et al.*, 1994).

I.3. PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO DE LAS MICROCOCÁCEAS

I.3.1. Efecto de la temperatura

Probablemente la temperatura es el factor ambiental más importante que afecta a la viabilidad y desarrollo microbianos. El crecimiento microbiano es posible desde alrededor de -18°C y hasta 90°C; a estos valores extremos el crecimiento está muy limitado pero la actividad metabólica puede ser significativa (Mescle y Zucca, 1994).

En cualquier sistema biológico, el crecimiento se puede definir como el aumento ordenado de todos sus componentes químicos.

En el crecimiento de los microorganismos se pueden distinguir 3 etapas fundamentales; fase de latencia, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria. Algunas veces, se observa una fase de declive o muerte debida al agotamiento de los nutrientes, a la acumulación de productos tóxicos o a otros efectos, como la generación de calor y cambios del potencial redox.

En la fase de latencia, aunque realmente no hay división celular, existe una considerable actividad metabólica. Esta fase es una etapa de adaptación de los microorganismos al nuevo cultivo ya que las células no tienen niveles adecuados de los enzimas necesarios para la utilización de los nutrientes nuevos. La duración de esta fase, depende del período de crecimiento en que se encuentran los microorganismos que se utilizan como inóculo; si proceden de la fase estacionaria, las células tienen un menor tamaño que las que están en fase exponencial, debido a esta circunstancia, para iniciar la división celular deben aumentar su tamaño hasta alcanzar el que tendrían en la fase exponencial.

La fase exponencial, o fase de crecimiento logarítmico comienza cuando la velocidad de crecimiento es máxima y presenta un valor constante. Durante esta fase, las células son

viables y del mismo tamaño, por lo que la masa celular y el número de células aumentan paralelamente. Pero la velocidad de crecimiento puede verse modificada por la naturaleza y concentración de los nutrientes, la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio.

La fase estacionaria se caracteriza por un descenso progresivo de la velocidad de crecimiento, hasta el punto de no observarse aumentos en la tasa de las bacterias. Entre la fase exponencial y la estacionaria existe un período de crecimiento desequilibrado en el que los diversos componentes celulares se sintetizan a velocidades diferentes. Esta fase estacionaria no es un período metabólico estático ya que muchas actividades enzimáticas continúan.

Son muy escasos los estudios realizados sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de las micrococáceas aisladas de salmuera o productos cárnicos curados. Solamente Selgas *et al.* (1988) y Comi *et al.* (1992) han estudiado este aspecto en Micrococáceas aisladas de embutidos. Selgas *et al.* (1988) determinaron diversos parámetros relacionados con el efecto de la temperatura- constante de la velocidad de crecimiento (μ), tiempo de generación (g), duración de la fase de latencia y número de células alcanzado en la fase estacionaria- en 42 cepas de *Micrococcus* a 11°C, 19°C, 25°C y 32°C. Todas las cepas mostraron los valores más bajos de g a 32°C excepto la cepa *Micrococcus*-3 que lo tuvo a 25°C. Todas las cepas mostraron valores superiores a las 20-30 horas a 11°C.

Comi *et al.* (1992) determinaron el tiempo de generación de algunas cepas seleccionadas de micrococos y estafilococos a 4°C, 11°C, 15°C, 25°C y 37°C. Todas las cepas mostraron el tiempo de generación más bajo a 37°C. Sin embargo, algunos mostraron valores similares tanto a 37°C como a 25°C. A 37°C los valores g son iguales o inferiores a una hora, a 25°C inferiores o iguales a 2 horas; a 15°C inferiores o iguales a 4 horas; a 11°C entre 5 y 7 horas y a 4°C entre 7 y 13 horas.

Cada microorganismo tiene unas temperaturas "cardinales" de crecimiento: mínima, óptima y máxima (Ingraham, 1962). El comportamiento de los microorganismos a diferentes temperaturas permite clasificarlos en 3 grandes grupos (Mescle y Zucca, 1994): **1/ Psicrófilos y Psicrótrofos.** Los psicrófilos son gérmenes adaptados al frío. Se desarrollan a 0°C con un óptimo de crecimiento comprendido entre 15°C y 20°C. Los psicrótrofos son capaces de adaptarse y desarrollarse a temperaturas próximas a 0°C, pero tienen un óptimo de crecimiento entre 25 y 35°C, lo que les aproxima a los mesófilos. **2/ Mesófilos,** estos gérmenes se multiplican a temperaturas entre 20 y 45°C con un crecimiento óptimo a 37°C. **3/ Termófilos** son microorganismos capaces de desarrollarse a temperaturas elevadas, entre 45 y

65°C con un óptimo de 55°C. Dentro de los termófilos se encuentran los gérmenes denominados termótrofos que no son más que mesófilos capaces de desarrollarse a temperaturas elevadas.

I.3.2. Actividad de agua

Los microorganismos necesitan agua en forma disponible para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. Dentro de la Microbiología de los Alimentos, la actividad de agua (a_w) indica la cantidad que en un alimento está a disposición de los microorganismos.

La actividad de agua de un alimento en solución se define como, la relación entre la presión de vapor del agua del alimento (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura.

Se acepta generalmente que los valores de a_w se correlacionan bien con el potencial para el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos (Gould, 1985, 1988 y Gould y Christian, 1988). Su medida ha sido útil para predecir la estabilidad y seguridad de los alimentos (Leistner y Rodel, 1975; Troller y Christian, 1978; Leistner *et al.*, 1981; Silverman *et al.*, 1983; Dodds, 1989; Glass y Doyle, 1991).

Muchos investigadores han concluido que la a_w es un determinante principal del crecimiento porque condiciona el estrés "osmótico" y la capacidad para el crecimiento está directamente relacionada por el grado de "stress" y la capacidad osmorreguladora de una célula microbiana particular. Un requisito fundamental para el crecimiento de los microorganismos en sustratos de alta osmolalidad es la acumulación intracelular de solutos, bien por síntesis o transporte hasta concentraciones que se equiparan a la osmolalidad del medio externo (Prior *et al.*, 1987; Hocking, 1988; Chirife *et al.*, 1981); este proceso se conoce con el nombre de osmorregulación.

Mossel (1971) observó que a valores elevados de a_w , del orden de 0,98-1, todos los microorganismos se desarrollan bien, siendo las bacterias las que más rápidamente predominan, ya que generalmente crecen con mayor rapidez que los mohos y algo más rápido que las levaduras en las mismas condiciones.

Generalmente, las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas a la inactivación por baja a_w (Leistner *et al.*, 1981).

A valores de a_w por debajo de 0,95, los bacilos Gram negativos, ceden su predominancia, siendo los cocos y los lactobacilos más osmotolerantes los que pasan a ocupar el papel más importante. Por debajo de 0,87 de a_w , se inhibe el desarrollo de las bacterias y el de la mayoría de las levaduras y son los mohos y algunas levaduras osmófilas, los microorganismos que pueden proliferar. Por debajo de 0,6, no crecen microorganismos si no se rehidratan los alimentos.

Mossel (1983) indicó que la influencia inhibidora de la a_w depende en gran medida de otros parámetros o factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en los alimentos.

Numerosos autores (Banwart, 1981; Sperber, 1983; Beuchat, 1983, etc.), han determinado la a_w mínima para el crecimiento de algunos microorganismos como los que a continuación se relacionan: *S. aureus* 0,86; *Staphylococcus* spp en anaerobiosis 0,91; *Staphylococcus* spp. en aerobiosis 0,86; *Micrococcus* spp. 0,90; *Micrococcus luteus* 0,93; Bacterias halófilas 0,75; *B. subtilis* 0,90; *Acinetobacter* 0,99.

Los valores de a_w relativamente elevados inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas: en el caso de *Salmonella* 0,95, *Clostridium perfringens* 0,97, *Clostridium botulinum* tipo A, 0,94 y *Clostridium botulinum* tipo B 0,94. La bacteria más halotolerante es *S. aureus* que se desarrolla en aerobiosis con una a_w superior a 0,86 (Sperber, 1983).

La naturaleza de los solutos que conforman la a_w influye sobre los valores mínimos que requieren las bacterias; por ejemplo *Cl. perfringens* soporta mejor el glicerol que la glucosa o el ClNa a iguales a_w (Strong, 1970). Troller (1987) comprobó que no se puede establecer una simple relación de la a_w frente a crecimiento microbiano sino que depende del soluto utilizado para reducir la a_w . Así, la a_w mínima que permite el crecimiento de *S. aureus* es de 0,86 cuando se utilizan como solutos ClNa y sacarosa, pero es mucho más alta cuando los solutos son alcoholes, dioles o glicoles polietilénicos (Shapero *et al.*, 1978; Vaamonde *et al.*, 1982). Por lo tanto se puede afirmar que tanto el crecimiento como la destrucción de los microorganismos a una a_w particular están determinados por el soluto y de ahí el denominado "efecto específico del soluto" señalado por Christian en 1981.

Sin embargo, en el caso de la cepa CM21/3 de *S. xylosus*, Chandler *et al.* (1989), han observado que los cambios en la a_w cuando el soluto era glicerol, eran similares a los obtenidos cuando la actividad de agua se ajustaba con ClNa.

Son diversos los autores que han estudiado el crecimiento de las micrococáceas a distintas actividades de agua utilizando diversas concentraciones de cloruro sódico.

Venugopal *et al.* (1994) estudiaron la acción del cloruro sódico a concentraciones entre 2,5 y 15% sobre *S. gallinarum*, *S. saprophyticus* y *M. varians* aisladas de carne fresca de bóvido envasada en CO₂ y al vacío. Todas las cepas fueron capaces de crecer a concentraciones entre el 7,5 y el 15%.

Kotzekidou (1992) puso de manifiesto que la amplia mayoría de los estafilococos presentes en la basturma crecen en presencia de un 15% de ClNa, mientras que las cepas de *M. varians* tenían un comportamiento variable. Seager *et al.* (1986) pusieron en evidencia que los estafilococos aislados de embutidos fermentados crecían a concentraciones salinas del 15%; algo similar observaron Vignolo *et al.* (1988) en las micrococáceas de embutidos fermentados (crecen estafilococos y micrococos al 15% de sal).

Selgas (1988) estudió el efecto del cloruro sódico a diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 4,5M que proporcionan a_w de 0,999 a 0,776, sobre 42 cepas de micrococáceas aisladas de chorizo, observando un comportamiento variable. La mayoría de cepas cesó su crecimiento a concentraciones de ClNa 1,5M, aunque 8 cepas no vieron inhibido su crecimiento hasta una concentración 3 M o algo superior.

Molina *et al.* (1989) observaron que todas las cepas de estafilococos (*S. xylosum* y *S. sciuri*) aisladas de jamón español crecían a concentraciones salinas del 15%, mientras que las cepas de micrococos dejaban de crecer a dicha concentración.

1.3.3. Actividad lipolítica

Son numerosos los estudios en los que se ha determinado la actividad lipolítica de micrococáceas aisladas de salmueras y diversos productos cárnicos como embutidos y jamón crudo-curado.

Hinrichsen *et al.* (1994) estudiaron la actividad lipolítica de *M. roseus* (65), aislada de una salmuera de curado de bacon danés. En este trabajo utilizaron como sustratos: tributirina, trioleína y grasa de cerdo, a las siguientes temperaturas: 4°C, 10°C y 20°C; observando que a 4°C no hubo crecimiento en ningún sustrato, a 10°C y 20°C solamente creció en tributirina mostrando una actividad lipolítica débil.

Al estudiar la actividad lipolítica de 21 cepas aisladas de jamón español, Carrascosa y Cornejo (1991) observaron que todas fueron activas frente a la tributirina, aunque solamente 10 fueron moderadamente activas.

Cornejo y Carrascosa (1991) comprobaron también en jamón español curado por un proceso rápido que las 35 cepas de micrococos aisladas eran activas frente a la tributirina, aunque no frente al tween 40 y 80.

La actividad lipolítica de la especie *S. xylosus* aislada de jamón español sobre un sustrato modelo que contenía grasa subcutánea de jamón ha sido determinada por Molina *et al.* (1991), observando un considerable aumento de los ácidos volátiles (3,3 veces), mientras que los ácidos grasos no volátiles se incrementaron solo un 11%.

En un aislamiento de 52 cepas de micrococos de embutidos crudo-curados, Soncini *et al.* (1982) observaron en un medio de cultivo con sustrato de tocino de cerdo, incubando a 35°C durante 3 días, que todas las cepas eran lipolíticas; sin embargo, consideraron como más lipolíticas las que precisaron más de 5,5 ml de NaOH 0,1 N para titular los ácidos grasos liberados.

La actividad lipolítica de 6 cepas de estafilococos y 2 de micrococos, aisladas de embutidos crudo-curados fue investigada por Simonetti y Cantoni (1983), bajo diferentes condiciones relacionadas con la duración de la incubación, la presencia o ausencia de NO_3K en el medio utilizado y en aerobiosis o anaerobiosis. Estos autores observaron que los estafilococos presentaban actividad lipolítica solamente cuando el medio de cultivo carecía de NO_3K . Los micrococos solamente eran lipolíticos en aerobiosis siendo su comportamiento variable respecto a las otras condiciones.

La capacidad lipolítica de 15 cepas de Micrococáceas, pertenecientes a las especies: *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus carnosus*, aisladas de embutidos crudo-curados, fue determinada por Vignolo *et al.* (1988), observando que todas las cepas mostraban una débil capacidad lipolítica.

Carrasco *et al.* (1991) observaron que solamente el 12,20% de 40 cepas de *Micrococcus* spp. aisladas de embutidos crudo-curados, se pueden considerar como altamente lipolíticas.

Comi et al. 1992 estudiaron la actividad lipolítica de 16 cepas de Micrococáceas aisladas de embutidos fermentados. El porcentaje de ácidos grasos liberados expresado como % de ácido oleico, varió entre 0 y 2,87% en presencia de NO_3K y entre 0 y 3,6% en ausencia de esta sal. La actividad lipolítica varió de cepa a cepa y en presencia o ausencia de nitrato.

La capacidad lipolítica de 5 cepas de Micrococáceas aisladas de starters de embutidos alemanes, de ellas 3 pertenecientes a *S. xylosus* y las otras a *M. varians* y *M. kristinae*, utilizando como sustrato tocino de cerdo y estableciendo la formación de mono y diglicéridos y ácidos grasos libres, fue llevada a cabo por Comi *et al.* (1995). Todas fueron lipolíticas aunque la intensidad de la acción varió con cada cepa.

Venugopal *et al.* (1994) estudiaron la actividad lipolítica de cepas de Micrococáceas (29 *S. saprophyticus*, 24 *S. gallinarum* y 21 *M. varians*), aisladas de carne fresca de buey, almacenada a vacío o en atmósfera de CO_2 , utilizando para ello: agar Tween 80, agar tributirina, agar con azul alcohólico y grasa de vaca. Observaron que todos los estafilococos presentaron una actividad lipolítica variable; mientras algunas cepas de *S. saprophyticus* fueron fuertemente lipolíticas, las de *S. gallinarum*, lo fueron débilmente y las de *M. varians* no produjeron lipólisis.

1.3.4. Actividad proteolítica

La hidrólisis de las proteínas constituye una de las transformaciones más estudiadas durante la maduración de los productos cárnicos crudo-curados y cocidos. De la misma se ha responsabilizado a diversos grupos microbianos y también a los propios enzimas tisulares, fundamentalmente a las catepsinas.

Para que un determinado tipo de microorganismo pueda llevar a cabo su actividad proteolítica, al igual que ocurre con otras actividades metabólicas, es necesario que el mismo se encuentre en posesión de la dotación enzimática necesaria y esté en número suficiente para hidrolizar las proteínas (Bacus, 1986).

La actividad proteolítica de diversas especies de Micrococáceas aisladas de salmueras y diversos productos cárnicos ha sido estudiada por diversos autores empleando varios sustratos, entre los que la gelatina ha sido uno de los más frecuentemente utilizados.

Papa y Grazia (1991) han observado en cepas procedentes de salmuera de jamón cocido que solamente 2 cepas de *S. saprophyticus* poseen actividad frente a la gelatina, mientras que *S. xylosum*, *S. carnosus*, *S. epidermidis* y los "microcochi" carecen de ella.

En el caso de las cepas procedentes de jamón español Molina y Toldrá (1992) no observaron actividad en *S. xylosum*; Cornejo y Carrascosa (1991), solamente observaron como positivas 3 de las 35 cepas estudiadas, de las que corresponden el 88% a *S. xylosum* y Carrascosa y Cornejo (1991) pusieron de manifiesto que 5 de las 21 cepas estudiadas fueron activas frente a la caseína y 3 frente a la gelatina.

Rodríguez *et al.* (1995) estudiaron la actividad proteolítica de 48 cepas para conocer la posible contribución de las Micrococáceas a lo largo de la maduración del jamón de cerdo ibérico frente a la caseína, gelatina y miosina; ninguna cepa fue activa frente a la gelatina. Los aislamientos con mayor actividad proteolítica frente a los otros sustratos correspondieron a *S. xylosum*.

En los embutidos fermentados Comi *et al.* (1992) pusieron de manifiesto que todas las cepas de *S. xylosum* fueron proteolíticas, mientras que *S. sciuri* carece de dicha actividad. Torriani *et al.* (1994) han observado una escasa actividad en diversas cepas de micrococáceas aisladas de embutidos del Abruzzo.

Venugopal *et al.* (1994) indicaron que todas las cepas de *S. gallinarum*, *S. saprophyticus* y *M. varians* aisladas de carne de buey envasada a vacío o en CO₂ licuaban la gelatina.

De la Rosa *et al.* (1990) estudiaron la actividad proteolítica de diversas cepas de *Micrococcus* aisladas de productos cárnicos cocidos españoles, observando un distinto comportamiento, incluso dentro de la misma especie. El mayor número de cepas positivas correspondía a *M. lylae* (90%) y el menor a *M. nishinomiyaensis* (6%).

I.3.5. Reducción de nitratos a nitritos

La reducción de nitratos a nitritos constituye una de las propiedades microbianas más importantes desde el punto de vista de la Tecnología de las carne. La determinación de esta propiedad en las Micrococáceas ha sido frecuentemente llevada a cabo tanto cualitativa como cuantitativamente.

Papa y Grazia (1991) observaron de manera cualitativa que las 120 cepas de micrococáceas aisladas de la salmuera utilizada para la elaboración de jamón cocido reducían los nitratos a nitritos.

Carrascosa y Cornejo (1991) y Cornejo y Carrascosa (1991) pusieron de manifiesto cualitativamente la reducción de nitratos a nitritos en cepas de Micrococáceas aisladas de jamón curado por un proceso lento y rápido, respectivamente, observando que entre el 65 y 75% los reducían. También en jamón español Molina *et al.* (1989) pusieron de manifiesto, que 90 cepas de Micrococáceas reducían los nitratos a nitritos.

Vignolo *et al.* (1988) estudiaron cualitativamente la reducción de nitratos en 50 micrococáceas aisladas de embutidos, observando que todas las cepas de *M. varians* y *S. carnosus* eran positivas, mientras que *M. luteus* no. Además pusieron de manifiesto que 23 cepas de *M. varians* liberaban entre el 1 y 2% de nitritos con una concentración de 1000 ppm de nitrato en el medio.

Cantoni (1964) puso de manifiesto cuantitativamente la capacidad reductora de cinco cepas de micrococáceas, procedentes de la salmuera de la bresaola.

La capacidad de reducción de nitratos de 42 cepas de micrococos a 32°C y pH 7 fue determinada por Selgas *et al.* (1988). De acuerdo con sus resultados establecieron cuatro grupos, perteneciendo al primero -12 cepas- aquellas que a medida que la concentración de nitratos en el medio era más alta mayor era la capacidad de reducción. El resto de los grupos mostraron un diferente comportamiento, aunque con una capacidad inferior a la del primer grupo.

Comi *et al.* (1992) observaron que la práctica totalidad de los estafilococos aislados de embutidos fermentados poseían la capacidad de reducir los nitratos a nitritos. En el caso de los micrococos, todas las cepas de *M. varians* los reducían, así como el 50% de *M. kristinae*; por el contrario *M. agilis* no reducía estas sales.

I.4. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El presente trabajo, que forma parte de una línea de investigación que se viene desarrollando desde hace años en el área de Tecnología de los Alimentos (Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León) sobre el estudio de diversos

productos cárnicos crudo-curados (chorizo, jamón crudo-curado, cecina, etc.), ha sido planteado con la finalidad de contribuir al conocimiento del proceso tecnológico de elaboración de los dos tipos de jamón crudo-curado existentes en España (jamón de cerdo ibérico y de cerdo blanco).

En estos productos se conocen bastante bien los cambios bioquímicos y microbiológicos que tienen lugar durante el período madurativo; sin embargo, se carece prácticamente de datos sobre diversos aspectos del desarrollo de la fase de salazonado. Esta etapa tiene como finalidad principal conseguir la penetración de la sal hacia el interior del jamón para contribuir en unión de la deshidratación posterior a su estabilidad. Pero además, es probable que en la sal durante el período de su utilización se constituya un “reservorio” microbiano a partir de los microorganismos procedentes de la propia sal marina, la superficie de los pernils y el medio ambiente, microorganismos que pueden penetrar hacia el interior del producto y desarrollar diversas acciones fundamentales para la calidad del jamón - reducción de nitratos a nitritos, actividad proteolítica y lipolítica, etc.-. Pero estas acciones de tipo microbiano podrían también llevarse a cabo en la propia sal y dar origen a diversos compuestos que llegaran al interior del jamón.

El objetivo general de este trabajo es aportar datos para el conocimiento de la microbiología de la sal de curado de los jamones de cerdo ibérico y de cerdo blanco y de las acciones de tipo tecnológico que pueden desarrollar los microorganismos presentes en la misma.

Como objetivos más concretos pretendemos:

1º- Establecer los recuentos de los grupos microbianos presentes en la sal de curado de jamones en una etapa intermedia del período de su utilización (4-6 meses).

2º- Estudiar la evolución de los distintos grupos microbianos durante el tiempo de vida útil de la sal.

3º- Identificar a nivel de género y especie un amplio número de cepas aisladas de la sal pertenecientes a la familia Micrococcaceae.

4º- Establecer diversas propiedades “tecnológicas” -efecto de la t° , actividad de agua y nitritos en el crecimiento microbiano, reducción de nitratos a nitritos y actividad proteolítica y

lipolítica- en 24 cepas representativas de las especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus* presentes.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. MATERIAL DE LABORATORIO

Las pesadas ordinarias se realizaron en una balanza *Mettler PJ 3000* y las de precisión en una balanza analítica *Mettler AE 100*.

La homogeneización de las muestras se llevó a cabo en un *Stomacher Lab-Blender 400*.

Para las mediciones del pH se utilizó un pH-metro *Crison Digilab 517*.

La agitación de tubos se realizó en agitadores magnéticos *Janke and Kunkel y Thermolyne*.

Las estufas de cultivo usadas fueron *Heraeus*; modelos: B5060E, BK5060E e I42.

Para la esterilización de material y medios de cultivo se utilizaron autoclaves *Selecta* modelos: Autester G y 437-G, equipo de filtración *Millipore* y una estufa de esterilización *Heraeus T6420*. Para las siembras se utilizó una cabina de flujo laminar vertical *Kowell*.

Para la visualización de la flora microbiana se utilizó un microscopio *Nikon Phase Contrast 1,25 (57719)*.

El conteo de colonias se llevó a cabo en un *Colony counter, 608701*.

Para la centrifugación de los cultivos microbianos se utilizó una centrífuga *Kokusan* modelo H-103N.

En la determinación de cenizas se usó un baño de arena *Selecta* y un horno mufla, *Heron* modelo 12-PR/300.

Las desecaciones se llevaron a cabo en estufa de desecación *Selecta* modelo 140B.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro *Perkin Elmer* modelo Lambda 3.

Para medir la densidad óptica de las diluciones se utilizó un densitómetro *ATB* 1550.

El lector de galerías API fué de la marca *ATB* 1525 acoplado a un ordenador *Nixdorf* 8810M45.

La determinación de la a_w de los medios de cultivo y de las muestras de sal se llevó a cabo mediante un higrómetro de punto de rocío, *Aqualab* mod. CX2 (*Decagon Devices*, USA).

Así mismo, se utilizó material de plástico y de vidrio de diversos tipos y procedencias.

II.2. REACTIVOS QUÍMICOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Todos los productos químicos utilizados en las diversas determinaciones que se citan en el desarrollo de este trabajo fueron de calidad reactivo, perteneciendo a las firmas comerciales, *Panreac*, *Merck*, *Scharlau*.

Los medio de cultivo utilizados para los recuentos de los diferentes grupos microbianos y otras determinaciones analíticas fueron de las siguientes firmas: *Oxoid*, *Difco* y *Merck*.

Las galerías de identificación *ATB* 32 *STAPH* fueron adquiridas a *Bio Mérieux*.

II.3. PLAN EXPERIMENTAL (Toma de muestras)

Para la determinación de los distintos parámetros físico-químicos y los diversos análisis microbiológicos se utilizaron un total de 41 muestras de sal (Figura II.1). De las cuales cinco pertenecían a sal nueva, 14 a sal utilizada en el salazonado (sal de curado) de jamones de cerdo ibérico y 22 a sal empleada en el salazonado de jamones de cerdo blanco.

Ocho muestras de sal de curado de cerdo ibérico y 16 de cerdo blanco se tomaron en tiempos intermedios del período de utilización de la sal (4-6 meses).

Para el estudio de la evolución de los distintos grupos microbianos durante la fase de salazón se utilizaron 12 muestras de sal, siguiendo la evolución en 4 empresas distintas (2 de cerdo ibérico y 2 de cerdo blanco) y tomando 3 alícuotas en cada una de ellas a los 2, 4 y 7 meses, respectivamente.

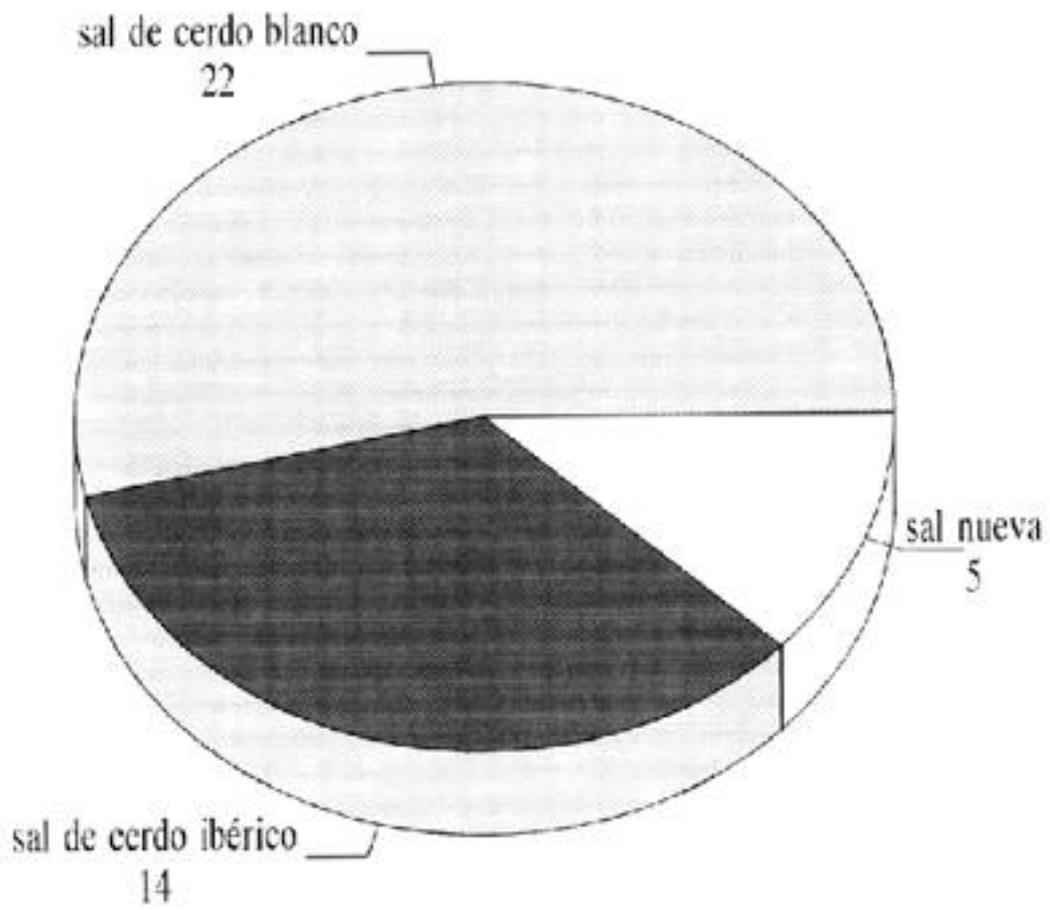


Figura II.1. Muestras de sal analizadas

Las muestras de sal de curado de jamones ibéricos procedían de la zona de Guijuelo y fueron suministradas por las siguientes empresas: Cardisan, Sánchez Nieto, Delagón, Julián Martín y Pedro Nieto.

Las muestras de sal nueva y de sal de curado de jamones de cerdo blanco procedían de distintas zonas de la provincia de León y fueron proporcionadas por las siguientes industrias: Caridad González (Cimanes del Tejar), Entrepeñas (Geras de Gordón), Araú (San Miguel del Camino), Canseco (Vegacervera), Jamones León (León), Palomo (Carrizo de la Ribera) y Garrote (Astorga).

De cada una de las 12 industrias suministradoras de sal se tomaron entre 2 y 4 muestras durante los años, 1992, 1993 y 1994.

La toma de muestras en el saladero se llevó a cabo en cinco zonas distintas hasta conseguir aproximadamente 1 Kg de muestra, que fue introducida en recipientes de plástico estériles. Su transporte hasta el laboratorio se realizó en contenedores isotérmicos en el período de tiempo más corto posible (2-10 horas). El análisis microbiológico se realizó en las 24 horas siguientes a la llegada al laboratorio.

En las 24 muestras de sal tomadas en el período intermedio de salazón y en las cinco de sal nueva se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos: humedad, cenizas, nitratos, nitritos y pH.

En la totalidad de las muestras (41) se realizó la determinación de los siguientes grupos microbianos: Aerobios mesófilos, Micrococáceas, Flora ácido láctica, Levaduras y Hongos.

De los distintos grupos microbianos presentes solo fueron objeto de estudio posterior los aislados a partir de MSA (presuntas Micrococáceas). Realizándose sucesivamente las pruebas de adscripción a familia, género y especie de 391 cepas.

Sobre 24 cepas identificadas, 12 pertenecientes al género *Micrococcus* (*M. nishinomiyaensis* -4 cepas-, *M. lylae* -2-, *M. varians* -3- y *M. roseus* -3-) y 12 pertenecientes al género *Staphylococcus* (*S. xylosus* -2 cepas-, *S. equorum* -4-, *S. saprophyticus* -4 cepas-, *S. sciuri* -1- y *S. lentus* -1-), se estudiaron diversas propiedades de interés tecnológico (efecto de la temperatura sobre el crecimiento, reducción de nitratos a nitritos, actividad proteolítica,

actividad lipolítica, efecto de la actividad de agua e inhibición del crecimiento por los nitritos).

II.4. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

II.4.1. Determinación de humedad

Se determinó según la técnica oficial UNE 34-203-81 para el análisis de la sal vigente en España (Real Decreto 1424/1983, B.O.E. 1-6-83), que concuerda con la norma ISO 2483. El fundamento del método consiste en la desecación en estufa hasta peso constante. La toma de muestras se realizó de manera que fuera lo más homogénea posible. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

II.4.2. Determinación de cenizas

Se realizó según la Norma Internacional ISO R-936. La muestra de sal se trituroó en un mortero de acuerdo con lo recomendado en el “Official Methods of Analysis” of the Association of Official Analytical Chemists (1980).

Se pesaron 3 g de sal triturada, con precisión de 0,1 mg, en una cápsula de porcelana a la que se añadió 1 ml de una disolución de acetato magnésico (150 g/l). Se colocó la cápsula en un baño de arena, hasta conseguir la carbonización de la muestra, introduciéndola a continuación en el horno de mufla a 200°C durante 1 hora, elevando seguidamente la temperatura hasta 550°C, por espacio de 2 horas como mínimo, hasta conseguir unas cenizas ligeramente grises. A continuación se sacó del horno y se introdujo en un desecador durante 30 min, pesando nuevamente con precisión de 0,1 mg.

El contenido en cenizas viene dado por la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje cenizas} = (M_2 - M_0 - M_1) \frac{100}{M_1 - M_0}$$

Siendo:

M_0 = masa, en gramos, de la cápsula.

M_1 = masa, en gramos, de la cápsula conteniendo la muestra.

M_2 = masa, en gramos, de la cápsula y el residuo después de incineración.

M_3 = masa en gramos del óxido magnésico proveniente de la disolución de acetato magnésico añadido.

II.4.3. Determinación de nitritos

Esta determinación se realizó según la norma UNE 34-206-81.

Se mezclaron 50 g de sal con 500 ml de agua destilada. Se filtró con papel de filtro y se introdujeron 100 ml del filtrado en un erlenmeyer de 500 ml, añadiendo a continuación 25 ml de una solución de permanganato potásico 0,1 M y 5 ml de una disolución de ácido sulfúrico al 13,6% . Se dejó reposar durante tres minutos, y se añadieron 20 ml de una solución de yoduro potásico al 25%. Se valoró con una disolución de tiosulfato sódico 0,1 M.

El contenido en nitritos, expresado en nitrito sódico, viene dado en porcentaje en peso, por la fórmula siguiente:

$$(V'-V) \cdot 0,00345 \cdot f \cdot \frac{500}{100} \cdot \frac{100}{m} = 1,725 \cdot \frac{(V'-V) \cdot f}{m}$$

siendo:

V = volumen, en ml, de la disolución valorada de tiosulfato sódico utilizado para la valoración.

V' = volumen, en ml, de la disolución valorada de tiosulfato sódico, utilizado para el ensayo en blanco.

m = masa, en gramos, de la muestra de ensayo.

f = factor de la solución de tiosulfato sódico.

0,00345 es la masa, en gramos, de nitrito sódico correspondiente a 1ml de la disolución de tiosulfato sódico.

II.4.4. Determinación de nitratos

El método utilizado es el recomendado por la APHA-AWWA-WPCF en el "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 14a. Ed., 1975, 427.

Se mezclaron 5 g de sal con 50 ml de agua destilada, se adicionaron 10 ml en matraces aforados de 50 ml, se añadió 1 ml de la solución brucina-ácido sulfanílico y 10 ml de la solución de ácido sulfúrico al 96% y se dejó en reposo durante 10 minutos al abrigo de la luz. Pasado este tiempo, se añadió agua destilada hasta completar unos 40 ml y se dejó reposar durante 10 minutos al abrigo de la luz. Transcurridos 15 minutos se enfrió el matraz en un baño con hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se enrasó a 50 ml con agua destilada y se leyó la absorbancia a 410 nm.

Se realizó una curva patrón con nitrato potásico anhidro que se representa en la figura II.2.

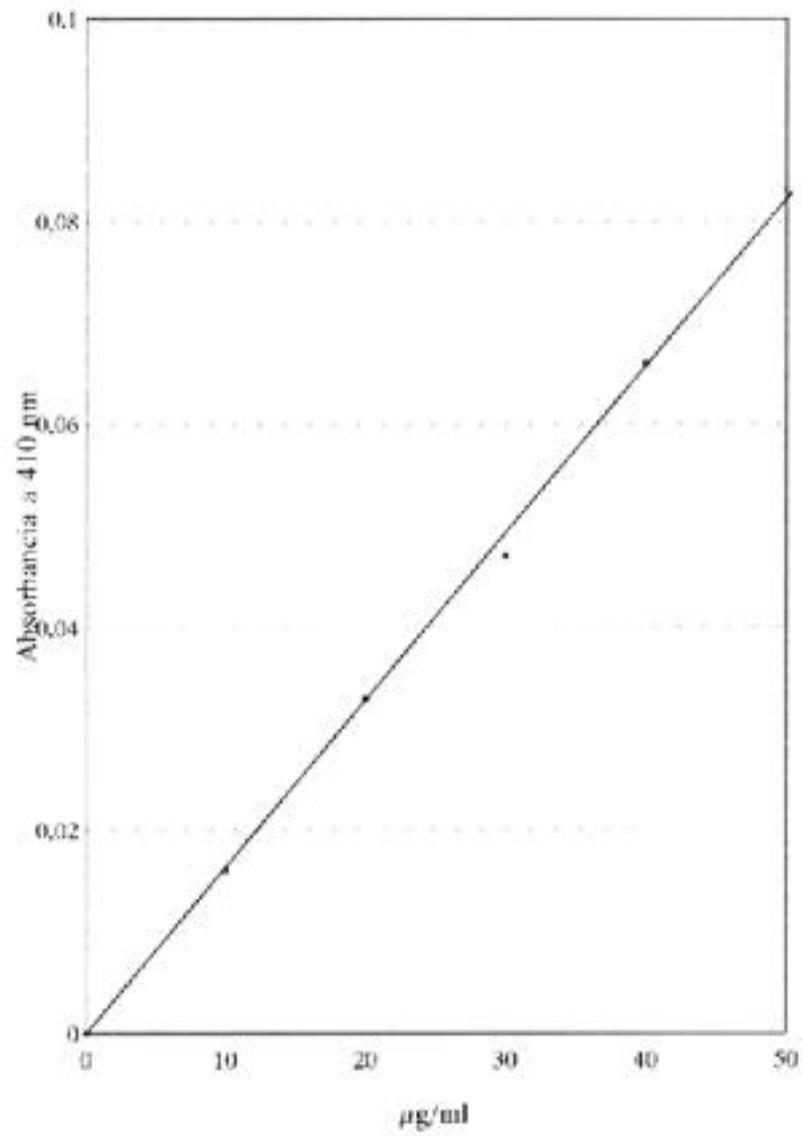


Figura II.2. Gráfica patrón para la determinación de nitratos

II.4.5. Determinación de pH

El pH se determinó según el método descrito en el Documento CEES/nº14 (Comité Européen du sel).

Para ello se tomaron 25 g de muestra y se añadieron 250 ml de agua destilada. La mezcla se homogeneizó hasta la disolución completa y en la misma se determinó el pH.

II.4.6. Determinación de la actividad de agua

La determinación de la actividad de agua se llevó a cabo mediante un higrómetro de punto de rocío Aqualab mod. CX2 (Decagon Devries, USA)

II.5. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

II.5.1. Homogeneización y diluciones

De cada muestra se tomaron 15 gramos que se homogeneizaron en un Stomacher Lab-Blender 400, durante 3 minutos, en 135 ml de Tryptone Water (Oxoid). Este homogeneizado fue considerado como la primera dilución (dilución 1/10) y a partir de ella se realizaron las siguientes diluciones con Tryptone Water.

Para el recuento de la flora ácido láctica se pesaron 15 g de la sal y se utilizó como diluyente para la obtención de la solución madre, solución Ringer al 1/4 (Oxoid), para las siguientes diluciones se utilizó Man-Rogosa-Sharpe Broth (Oxoid).

II.5.2. Siembra y recuento de colonias en placa

Los recuentos de Aerobios Mesófilos se llevaron a cabo en placas de Plate Count Agar (PCA) (Oxoid) pH7±0,2. Las placas se sembraron por duplicado, poniendo alícuotas de 1 ml, de las diferentes diluciones, vertiendo a continuación 15 ml del medio de cultivo previamente enfriado a 47°C y mezclándolo suavemente. Después de solidificados se incubaron a 30°C durante 72 horas.

Los recuentos de Micrococáceas se efectuaron en Agar Mannitol Sal (MSA) (Oxoid) pH $7,5\pm 0,2$, sembrando en superficie alícuotas de 0,1 ml de cada dilución. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas.

Los recuentos de levaduras y mohos se determinaron en Agar Extracto de Malta (Oxoid) pH $5,4\pm 0,2$, sembrando en superficie alícuotas de 0,1 ml de cada dilución. La incubación se efectuó a 25°C durante 96 horas. Las primeras colonias que se desarrollan en el medio son las de levaduras, diferenciándose de las colonias de hongos por el aspecto característico de estas últimas.

Los recuentos de la flora ácido-láctica se llevaron a cabo en agar Man-Rogosa-Sharpe (agar MRS) (Oxoid) pH $6,2\pm 0,2$. De cada dilución se depositó 1 ml en una placa de Petri estéril y a continuación se vertieron 15 ml de agar MRS a 45°C - 47°C y una vez solidificado se cubrió con una capa de agar estéril. La incubación se realizó en estufa durante 3 días a 37°C .

II.5.3. Selección de colonias y purificación

El aislamiento de las colonias se llevó a cabo a partir de las placas de agar manitol sal. De cada placa se seleccionó un determinado número de colonias por un método totalmente al azar, basado en la teoría de los números estrictamente aleatorios; para ello se enumeraron las colonias y se eligieron aquellas cuyos números correspondían a los que indicaba la tabla de los números aleatorios (I.C.M.S.F.,1981). El número total de colonias aisladas fue de 391. Estas colonias se tomaron con un asa de platino y se purificaron posteriormente mediante pases alternativos (tres) en caldo BHI y agar nutritivo. Las cepas se conservaron en frascos Mac Cartney, conteniendo agar nutritivo inclinado a temperatura de refrigeración (2 - 5°C).

II.5.4. Identificación de las colonias aisladas en agar MSA

II.5.4.1. Pruebas de adscripción a Familia

Tinción de Gram

Se realizó por el método de Jensen (Cruickshank,1965) para poder apreciar su morfología y agrupación, así como la reacción Gram (positiva o negativa).

Prueba de la catalasa

Se mezcló una gota de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes con una gota de cultivo en BHI de las cepas previamente seleccionadas. El burbujeo originado por la liberación de O₂ libre indica la presencia de catalasa y por lo tanto, resultado positivo.

II.5.4.2. Pruebas de adscripción a género

Fermentación de la glucosa

Esta prueba se basa en la capacidad que tienen los estafilococos de crecer y acidificar la glucosa en anaerobiosis, a diferencia de los micrococos que no tienen esta facultad. El medio utilizado fue el de Hugh y Leifson (1953) de MERCK preparado según las recomendaciones de la firma comercial que lo distribuye. Después de su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 min. se dejó enfriar hasta una temperatura próxima a 50°C y por cada 100 ml de medio se añadieron 10 ml de una solución acuosa al 10% de D(+)-glucosa esterilizada por filtración con un equipo Millipore. El medio se repartió en tubos a razón de 10 ml cada uno y se enfrió rápidamente para evitar en lo posible la penetración de oxígeno. Los tubos se sembraron por duplicado en picadura con un asa de platino larga y uno de los tubos de cada par se cubre con una capa de 1 cm aproximadamente de parafina estéril.

Estos tubos se incubaron a 32°C observándose los resultados a partir de las 24 horas. La producción de ácido se detecta por el cambio de color del medio que vira de verde a amarillo. Si se produce ácido en los dos tubos, el microorganismo se considera como estafilococo; si el tubo mantenido en condiciones aeróbicas presenta crecimiento con o sin producción de ácido, se considera como una cepa de micrococo.

Crecimiento en medio semisólido con tioglicolato

A este medio se le adiciona 0,3% de agar. Después de esterilizarlo, el medio se repartió a razón de 9 ml por tubo. Los tubos se sembraron con asa de platino a unos 44-45°C y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Para el crecimiento de la mayoría de las cepas es suficiente una incubación a 32°C durante toda la noche, aunque otras de crecimiento más lento necesitan 72 horas. Los tubos se leen al trasluz, anotándose la localización y la intensidad de las bandas de crecimiento. Los cultivos se clasifican como aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios obligados de acuerdo con los resultados de la prueba.

Test de la producción de acetoina.- Para el que se utilizaron los siguientes reactivos:

VP A: KOH 20 g

Agua 100 ml

VP B: Alfa naftol 12 g

Solvente orgánico 100 ml

Test de la beta-galactosidasa, arginina arilamidasa, fosfatasa alcalina y pirrolidonil arilamidasa.- Utilizando el reactivo:

FB : Fast blue BB 0,35 g

Solventes orgánicos 100 ml

La lectura de la galería se llevó a cabo transcurridos 5 minutos desde la incorporación de los reactivos anteriores. La identificación se realizó mediante lectura automática en la que los resultados son transmitidos al ordenador (APiLAB.I.D.32) e interpretados por el programa ATB Plus. El número de bacterias incluídas en la base de datos de estas galerías de identificación es de 36.

En la tabla II.1 se recogen los tests que constituyen las galerías ATB 32 STAPH y en la figura II.4 se recoge a manera de ejemplo, los resultados impresos proporcionados para dos de las cepas estudiadas (una con un alto grado de identificación y otra de perfil dudoso), por el sistema de lectura.

CUPULA	TEST	REACCION/SUBSTRATO	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
1.0	<u>URE</u>	UREasa	amarillo	naranja rojo-violeta
1.1	<u>ADH</u>	Arginina DIIHidrolasa	amarillo	naranja-rojo
1.2	<u>ODH</u>	Oxalato DeCarboxilasa		
1.3	<u>ESC</u>	ESCUlina (Hidrolisis)	incol. gris palido	maron-negro
1.4	<u>GLU</u>	GLUCosa	rojo rojo-naranja	amarillo amarillo-naranja
1.5	<u>FRU</u>	FRUCTosa		
1.6	<u>MNE</u>	MANnosA		
1.7	<u>MAL</u>	MALtosa		
1.8	<u>LAC</u>	LACTosa (Fermentaciones)		
1.9	<u>TRE</u>	TREHalosa		
1.A	<u>MAN</u>	MANitol		
1.B	<u>RAF</u>	RAFInosa		
1.C	<u>RIB</u>	RIBosa		
1.D	<u>CEL</u>	CELObiosa		
1.E 1.F		Cupulas vacias		
0.0	<u>NIT</u>	NITatos. (Reducción)	NIT1 + NIT2 (5 min < 10 min)	
			incolora	rosa-púrpura
0.1	<u>VP</u>	Producción de Acetoina	VPA + VPB (5 min < 10 min)	
			incolora	rosa-rojo
0.2	<u>β GAL</u>	β GALactosidasa	FB < 5 min < 10 min) β GAL → PyrA	
			incolora púrpura palido, naf. pal.	púrpura
			incol.naranja	naranja
			incolora púrpura palido, naranja pal.	púrpura
			incol.-naf. palido	naranja
0.3	<u>ArgA</u>	Arginina Afilamidasa		
0.4	<u>PAL</u>	Fosfatasa Alcalina		
0.5	<u>PyrA</u>	Pirrolidonil Afilamidasa		
0.6	<u>NOVO</u>	NOVObicina (Resistencia)	rojo rojo-naranja	amarillo amarillo-naranja
0.7	<u>SAC</u>	SACarosa (Fermentación)		
0.8	<u>NAG</u>	N-AcetilGlucosamina (Fermentación)		
0.9	<u>TUR</u>	TURanosa (Fermentación)		
0.A	<u>ARA</u>	ARABinosa (Fermentación)		
0.B	<u>β GUR</u>	β GlucURonidasa	incolora	amarillo
0.C 0.D 0.E 0.F		Cupulas vacias		

Tabla II.1. Tests que constituyen las galerías ATB-32 STAPH

```

Programa de identificación API
Referencia : CANSECO 3-93(12)
ID S2 STAPH V1.0
URE + ADI - ODC - ESC - GLU + FRU + HNE + MAL + LAC +
TRE + MAN + RAF - NIT ? VP + BGAL ? ArgA + PAL ? PYRA -
NOVO + SAC + NAG - TUR + ARA - BGUR - RTB - CEL -
=====
FUERA IDENTIFICACION
Staph.saprophyticus .....Xid=99.6|T=0.46
ELECCION SIGUIENTE
Staph.hominis 1 .....Xid= 0.1|T=0.00
=====
Staph.saprophyticus : Número de tests en contra= 0
-----
ELECCION SIGUIENTE:
Staph.hominis 1 : Número de tests en contra= 2
D-HAARITOL HAN 4% RESISTANT NOVDEIDICINE NOVO 5% |
-----

Programa de identificación API
Referencia : CARDISAN B
ATB S2 STAPH (V1.0) Perfil: 1 7 7 3 3 0 7 6 2
URE + ADH - ODC - ESC + GLU + FRU + HNE + MAL + LAC +
TRE + MAN + RAF - NIT + VP - BGAL + ArgA + PAL - PYRA -
NOVO + SAC + NAG + TUR - ARA + BGUR + RTB - CEL +
=====
PERFIL 00000
Staph.xylosum .....Xid=67.0|T=0.54
Staph.gallinarum .....Xid=31.5|T=0.37
ELECCION SIGUIENTE
Staph.equorum .....Xid= 1.5|T=0.29
=====
Staph.xylosum : Número de tests en contra= 3
ESCULINE (HYDROLYSE)ESC 34% PHOSPHATASE ALCALINE PAL 90%
CELLOBIOSE CEL 5%
-----
Staph.gallinarum : Número de tests en contra= 3
RAFFINOSE RAF 86% PHOSPHATASE ALCALINE PAL 100%
D-TURANOSE TUR 86%
-----
ELECCION SIGUIENTE:
Staph.equorum : Número de tests en contra= 3
B-GALACTOSIDASE BGAL 25% L-ARABINOSE ARA 13%
CELLOBIOSE CEL 0%
=====
Tests complementarios
M2.8c
Staph.gallinarum 95
Staph.xylosum 5

```

Figura II.3. Ejemplo de resultados obtenidos para dos cepas estudiadas por el sistema ATB-32 STAPH

II.6. PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO

II.6.1. Efecto de la temperatura en el crecimiento bacteriano

El cultivo bacteriano en fase exponencial se comporta como una reacción química de primer orden; es decir, el aumento de la velocidad de crecimiento de las bacterias en un tiempo dado, es proporcional al número o masa de bacterias presentes en ese tiempo.

Cualquier microorganismo crece en un intervalo de temperaturas definido y su velocidad de crecimiento en ese intervalo es un fenómeno temperatura-dependiente y como todas las reacciones químicas dependientes de la temperatura del medio de reacción obedece a la ecuación descrita por Arrhenius:

$$v = A e^{-E_a/RT}$$

donde:

v.- Es la velocidad de la reacción (velocidad de crecimiento).

E_a.- Es la energía de activación.

T.- Es la temperatura absoluta (grados Kelvin).

R.- Constante universal de los gases (8,3144 J /mol °K).

A.- Constante denominada factor de frecuencia.

La ecuación de Arrhenius permite determinar la energía de activación de la reacción, en este caso, del crecimiento microbiano.

El efecto de la temperatura de incubación en el crecimiento de las Micrococáceas se ha llevado a cabo de acuerdo con las indicaciones de Selgas *et al.* (1988). Un cultivo de 24 horas de caldo BHI se diluye con solución fisiológica estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 2 en la escala Mc. Farland, equivalente a una absorbancia de 0,2 a 600 nm de longitud de onda. A partir de este inóculo se siembran los tubos que contienen 3 ml de caldo BHI con 0,1 ml de la suspensión celular normalizada. Los tubos se incubaron a cinco temperaturas (4°C, 11°C,

20°C, 25°C y 32°C), hasta alcanzar la fase estacionaria. En todos los casos y a lo largo del tiempo de incubación se hicieron lecturas de los cultivos a 600 nm.

Con los datos obtenidos, se construyeron las curvas de crecimiento correspondientes a cada una de las cepas, a partir de las cuales se calcularon:

Constante de velocidad de crecimiento.- La ecuación general de las reacciones de primer orden con la que se mide la reacción de un producto es la siguiente:

$$N_1 = N_0 \cdot e^{\mu(t_1 - t_0)}$$

siendo:

N_1 .- Cantidad de producto formado (número de microorganismos en el tiempo t_1).

N_0 .- Cantidad de producto al inicio de la reacción o en el tiempo t_0 .

μ .- Es un índice de velocidad de crecimiento denominado constante de la velocidad de crecimiento.

Aplicando logaritmos en la fórmula anterior nos quedaría:

$$\log N_1 = \log N_0 + \mu (t_1 - t_0) \log e$$

de donde:

$$\mu = \frac{(\log N_1 - \log N_0) 2,303}{(t_1 - t_0)}$$

El valor μ es suficiente para definir la velocidad de crecimiento de un microorganismo. No obstante, se utiliza con más frecuencia otro parámetro, el tiempo de generación (g) que es el tiempo, expresado normalmente en horas, necesario para que se duplique la población.

En la ecuación anterior, $t_1 - t_0 = g$ cuando N_1 es el doble de N_0 . Por lo tanto, dicha igualdad permite conocer la relación entre μ y g ;

$$\mu = \frac{2,303 \log 2N_0/N_0}{g}$$

$$\mu = \frac{0,693}{g}$$

Estas ecuaciones solo se cumplen en la fase exponencial que es en la que se determinan los parámetros que definen el crecimiento de un determinado microorganismo.

Duración de la fase de latencia.- La duración de la fase de latencia se obtuvo gráficamente en una representación semilogarítmica trazando una recta que pasa por el punto inicial de la curva de crecimiento en el eje de ordenadas y es paralela a la rama exponencial de dicha curva. La distancia, medida paralelamente al eje de abscisas, entre estas dos líneas, corresponde al tiempo de latencia.

Tiempo de generación.- Se determinó a partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Para ello, se estableció la ecuación de regresión lineal de la porción de la curva de crecimiento correspondiente a esta fase. La pendiente de la recta corresponde a la constante de la velocidad de crecimiento (μ) y mediante la igualdad:

$$\mu = \frac{0,693}{g}$$

se calculó el tiempo de generación (g).

Energía de activación.- Este parámetro se calcula representando primero los logaritmos de μ respecto del recíproco de la temperatura absoluta, con lo que se obtiene la representación gráfica de la ecuación de Arrhenius.

A partir de las ecuaciones representadas en dichas figuras se calcularon las correspondientes energías de activación.

II.6.2. Actividad lipolítica

La actividad lipolítica de las micrococáceas se realizó utilizando dos sustratos: tocino dorsal de cerdo y tributirina. En el primer caso se empleó el medio recomendado por Vignolo *et al.* (1988), constituido por:

- Peptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Extracto de carne 5 g
- Sodio cloruro 30 g
- Agua destilada 1000 ml
- pH 7,0

Los ingredientes se mezclaron cuidadosamente dividiéndose en alícuotas de 30 ml a las que se añadieron como sustrato 30 g de tocino de cerdo fundido, a continuación se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para la preparación del inóculo se buscó una determinada concentración de microorganismos y se ajustó hasta corresponder al punto 3 de la escala Mc.Farland, utilizando para ello, solución salina al 0,85%, obteniéndose de este modo, una concentración de microorganismos inoculada de $9 \cdot 10^8$ bacterias/ml, inoculando 1 ml.

Una vez realizada la inoculación de las cepas investigadas en el medio, se incubó a 37°C durante 3 días. Los ácidos grasos liberados se extrajeron en 3 tiempos sucesivamente con 80 ml de una mezcla de éter etílico:etanol (2/1, v/v).

La cantidad total extraída se tituló con NaOH 0,1 N, usando fenoftaleína como indicador. Los resultados se expresaron en % de ácido oleico.

El otro medio empleado para determinar la actividad lipolítica de las cepas fue el agar tributirina (Oxoid), consistente en un homogeneizado estable de agar nutritivo y tributirina.

Se sembraron las placas de Petri con 1 ml de una de un cultivo reciente de BHI en el que se inoculó previamente una suspensión celular que poseía una densidad óptica de 0,2 a 600 nm, añadiendo a continuación el medio de cultivo e incubando a 35°C durante 3 días. Observando que las cepas lipolíticas, al actuar sobre la tributirina dan lugar a una hidrólisis, que se manifiesta por un halo claro que rodea a las colonias. Los radios de estos halos fueron medidos en mm desde el borde de la colonia.

II.6.3. Actividad proteolítica

La determinación de la actividad proteolítica se llevó a cabo utilizando gelatina nutritiva (Oxoid) como medio de cultivo. Este medio ha sido recomendado por Harrigan y McCance (1968), así como por la American Society for Microbiology (1981).

Se realizó la siembra en placas, inoculando 1 ml de una suspensión celular en BHI que poseía una densidad óptica de 0,2 a 600 nm y se incubó a 22°C durante 8 días, entonces se midió el radio de la zona aclarada desde el borde de la colonia, expresándolo en mm.

II.6.4. Efecto de la actividad de agua

Para estudiar el efecto de la a_w en el crecimiento de las cepas seleccionadas, se prepararon cultivos de las mismas en un medio que tenía la siguiente composición:

• Extracto de levadura	0,1 g
• Peptonal	1 g
• Dextrosa	0,2 g
• Fosfato disódico	0,25 g
• Agua destilada	100 ml.

A este medio se le añadió ClNa a diferentes concentraciones comprendidas entre 0 M, 1,5 M, 2,5 M, 3 M y 4,5 M que proporcionan a_w de 0,999, 0,950, 0,894, 0,865 y 0,776, respectivamente. En una serie de tubos de ensayo se distribuyeron 5 ml del medio de cultivo para cada concentración, sometiéndose a continuación a esterilización en autoclave; una vez enfriados a temperatura ambiente los tubos se sembraron con 0,1 ml de un cultivo de caldo BHI estandarizado a una densidad óptica de 0,2 a 600 nm. La incubación se llevó a cabo durante 24 horas en estufas de cultivo a 32°C. El crecimiento se siguió mediante turbidimetría realizando lecturas de transmitancia a 600 nm una vez transcurridas las 24 horas de incubación.

Cuando después del tiempo de incubación no se observó variación de la transmitancia, la cepa se mantuvo incubando durante 24 horas adicionales y si tampoco se observó

disminución de la transmitancia, la a_w de este cultivo se consideró como la mínima de crecimiento para la cepa estudiada.

II.6.5. Capacidad de reducir los nitratos a nitritos

En primer lugar se llevó a cabo una determinación cualitativa a través de la galería de identificación según se describe en II.5.4.3.

La capacidad de reducción de los nitratos a nitritos se estudió también cuantitativamente utilizando para ello el medio Nutrient Broth (Oxoid) al que se añadieron 200 ppm y 500 ppm de nitrato potásico. El medio se distribuyó en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave (121°C, durante 15 minutos). Una vez inoculados los tubos con 0,2 ml de un cultivo de BHI que alcanzó una densidad óptica de 2 en la escala Mc Farland, se incubaron a 32°C durante 24 horas.

Los cultivos se centrifugaron posteriormente durante 10 minutos a 4000 rpm. A partir de los sobrenadantes, se determinó la cantidad de nitritos originada, siguiendo el Método Oficial de Determinación de Nitritos en Aguas (B.O.E. 9-7-1987).

Reactivos colorimétricos:

- **Reactivo I:** Reactivo de Zambelli:

• Acido clorhídrico	260 ml
• Acido sulfánilico	5 g
• Fenol cristalizado	7,5 g
• Amonio cloruro	135 g
• Agua destilada	1000 ml

- **Reactivo II:** Amonio hidróxido al 25% .

Se tomaron alícuotas entre 0,2 y 1 ml y se completó con medio de cultivo hasta un volumen final de 5 ml. Se adicionaron 0,2 ml del reactivo Zambelli y 0,2 ml de amonio hidróxido al 25%. Se dejó en reposo durante 5 minutos y las lecturas de la absorbancia se realizaron a 425 nm. La gráfica patrón utilizada se recoge en la figura II.4, para la construcción de dicha figura se utilizó nitrito potásico.

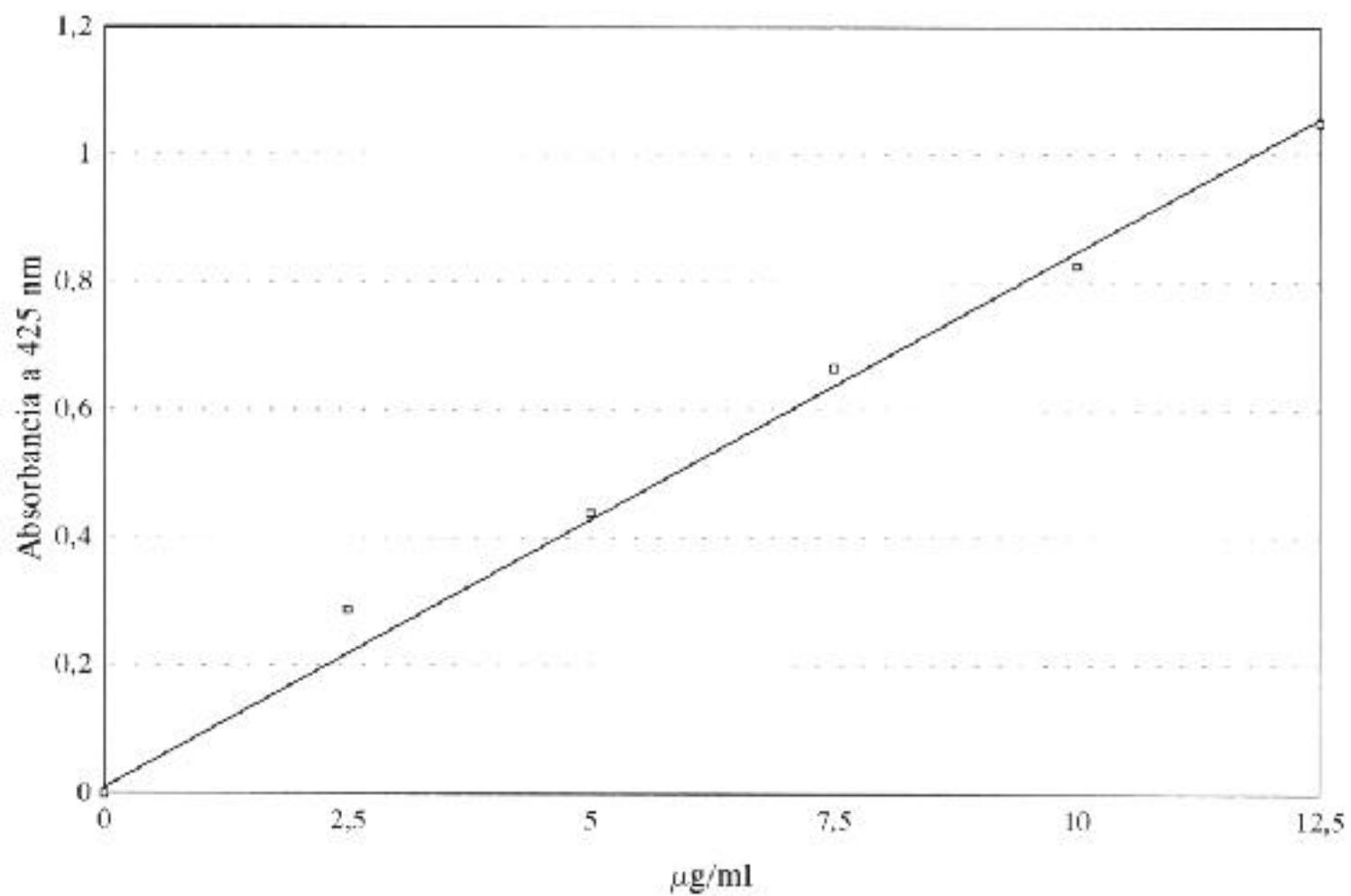


Figura II.4. Gráfica patrón para la determinación de los nitritos

II.6.5.Capacidad inhibidora del nitrito en el crecimiento bacteriano

La capacidad inhibidora de los nitritos sobre el crecimiento bacteriano se llevó a cabo empleando como medio de cultivo Nutrient Broth (Oxoid) al que se añadieron diferentes cantidades de nitrito potásico (0, 50, 100, 150 y 200 ppm). Una vez esterilizado el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos se inocularon en los tubos 0,1 ml de un cultivo de cada cepa de una densidad óptica de 0,2 a 600 nm con asa de platino y se incubaron a 32°C durante 24 horas leyendo a continuación la absorbancia a 600 nm.

III. RESULTADOS

III.1. PARÁMETROS QUÍMICOS Y VALOR DEL pH DE LA SAL UTILIZADA EN EL SALAZONADO DE JAMONES CRUDO-CURADOS

III.1.1. Sal nueva

El contenido en humedad, cenizas, nitritos y nitratos así como el valor del pH de 5 muestras de sal nueva utilizada en la elaboración de los jamones crudo-curados queda recogida en la tabla III.1.

El valor medio alcanzado para la humedad y cenizas fue de 1,31% y 97,50%, respectivamente. No se detectó la presencia de nitritos y los nitratos estaban presentes solamente en cantidades traza. El valor medio del pH fue de 6,6.

III.1.2. Sal de curado de cerdo ibérico (tiempo de salazón: 4-6 meses)

En la tabla III.2 se indica el contenido en humedad, cenizas, nitritos, nitratos y el valor del pH de 8 muestras de sal recogidas a los 4-6 meses del período de salazón de jamones de cerdo ibérico.

El contenido medio en humedad y cenizas fue de 1,84% y 95,95%, respectivamente. Solamente fue observada la presencia de nitritos (12,4 ppm) en la muestra nº5. No se detectó la existencia de nitratos en ninguna de las muestras analizadas. El pH alcanzó un valor medio de 6,64.

III.1.3. Sal de curado de cerdo blanco (tiempo de salazón: 4-6 meses)

En la tabla III.3 se recogen los niveles de humedad, cenizas, nitritos y nitratos y pH en 16 muestras de sal obtenidas a los 4-6 meses del período de salazón de jamones de cerdo blanco.

La humedad y las cenizas alcanzaron tasas medias del 2,17% y 96,42%, respectivamente. Solamente en 4 muestras se observó la presencia de nitritos en cantidades superiores a 10 ppm y en una sola de nitratos (7,3 ppm). El valor del pH observado fue de 7,13.

MUESTRA	HUMEDAD %	CENIZAS %	NITRITOS ppm	NITRATOS ppm	pH
1	1,16	97,49	---	Trazas	6,38
2	1,42	97,35	---	Trazas	7,43
3	1,39	97,63	---	Trazas	6,57
4	1,27	98,03	---	Trazas	6,26
5	1,31	97,12	---	Trazas	6,54
X	1,31	97,50	---	---	6,60
D.T.	0,092	0,304	---	---	0,415

Tabla III.1. Parámetros químicos y valor de pH de la sal nueva utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados.

MUESTRA	HUMEDAD %	CENIZAS %	NITRITOS ppm	NITRATOS ppm	pH
1	1,81	96,57	---	---	6,95
2	1,68	98,81	---	---	6,91
3	2,10	90,77	---	---	6,40
4	1,76	97,13	---	---	6,57
5	1,83	97,21	12,4	---	6,50
6	2,06	91,45	---	---	6,72
7	1,73	98,32	---	---	6,54
8	1,76	97,31	---	---	6,58
X	1,84	95,95	---	---	6,64
D.T.	0,144	2,874	---	---	0,183

Tabla III.2. Parámetros químicos y valor del pH de la sal de curado de jamones de cerdo ibérico (tiempo de salazón: 4-6 meses)

MUESTRA	HUMEDAD %	CENIZAS %	NITRITOS ppm	NITRATOS ppm	pH
1	1,62	97,43	---	---	7,16
2	3,53	96,61	---	---	7,04
3	1,04	99,25	17,30	7,30	6,59
4	2,64	97,32	12,80	---	7,36
5	1,07	98,65	---	---	6,55
6	1,87	98,35	---	---	7,25
7	1,87	98,03	---	---	7,02
8	1,64	96,32	---	---	7,37
9	2,64	94,37	10,30	---	7,21
10	2,18	97,34	---	---	7,03
11	3,25	96,45	---	---	7,12
12	2,47	91,74	---	---	7,21
13	1,75	97,38	---	---	7,41
14	2,75	96,10	---	---	7,09
15	2,33	96,58	---	---	7,24
16	2,18	90,76	13,10	---	7,36
X	2,17	96,42	3,47	---	7,13
D.T.	0,677	2,253	6,090	---	0,243

Tabla III.3. Parámetros químicos y valor del pH de la sal de curado de jamones de cerdo blanco (tiempo intermedio de salazón: 4-6 meses)

III.2. RECUENTOS DE GRUPOS MICROBIANOS EN LA SAL UTILIZADA EN LA ELABORACIÓN DE JAMONES CRUDO-CURADOS

III.2.1. Sal nueva

La tabla III.4 refleja los recuentos expresados en logaritmos de ufc/g de los grupos microbianos aislados de 5 muestras de sal nueva utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados.

El recuento medio en PCA (flora aerobia mesófila) fue de 2,45 log ufc/g. El único grupo microbiano presente en todas las muestras analizadas fue el de las micrococáceas que alcanzaron un valor medio de 1,66 log ufc/g. La presencia de levaduras y flora ácido-láctica solo se puso en evidencia en la muestra número 2, en niveles de 2,11 y 1,84 log ufc/g, respectivamente. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de hongos.

Estos resultados quedan recogidos gráficamente en la figura III.1.

III.2.2. Sal de curado de cerdo ibérico (tiempo de salazón: 4-6 meses)

Los recuentos microbiológicos expresados en logaritmos de ufc/g de aerobios mesófilos, micrococáceas, levaduras, hongos y flora láctica obtenidos en 8 muestras de sal recogidas a los 4-6 meses del período de salazón de jamones de cerdo ibérico se recogen en la tabla III.5.

La flora aerobia mesófila alcanzó niveles de 3,77 log ufc/g. Las micrococáceas, presentes en todas las muestras analizadas, alcanzaron un valor medio de 3,63 log. ufc/g. Solo se detectó la existencia de flora ácido-láctica en las muestras 4 y 5 con recuentos de 2,86 y 1,00 log ufc/g, respectivamente. Solamente en una muestra no se observó la presencia de hongos y en tres la de levaduras. Estos dos grupos microbianos están presentes en niveles medios de 1,54 y 1,72 log ufc/g respectivamente.

En la figura III.2 se representa gráficamente los recuentos microbiológicos de las muestras de sal utilizadas en la elaboración de jamones de cerdo ibérico.

III. 2.3. Sal de curado de cerdo blanco (tiempo de salazón:4-6 meses)

En la tabla III.6 se indican los recuentos microbianos (aerobios, micrococáceas, levaduras, hongos y flora láctica) de 16 muestras de sal recogidas a los 4-6 meses del período de salazón de jamones de cerdo blanco.

El valor medio de los recuentos fue el siguiente: aerobios (3,82 log ufc/g); micrococáceas (3,59 log ufc/g); levaduras (2,96 log ufc/g); hongos (1,29 log ufc/g) y flora láctica (0,68 log ufc/g).

Las levaduras estuvieron presentes en todas las muestras menos en una (nº 2); los hongos se detectaron en 8 muestras y las bacterias ácido-lácticas en 5.

La representación gráfica de estos recuentos se contempla en la figura III.3.

MUESTRA	AEROBIOS	MICROCOCACEAS	LEVADURAS	HONGO	FLORA LACTICA
1	2,25	1,86	---	---	---
2	2,91	1,30	2,11	---	1,84
3	2,23	1,93	---	---	---
4	2,17	1,54	---	---	---
5	2,68	1,69	---	---	---
X	2,45	1,66	---	---	---
D.T.	0,293	0,228	---	---	---

Tabla III.4. Recuentos microbiológicos de la sal nueva utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados, expresados en log ufc/g

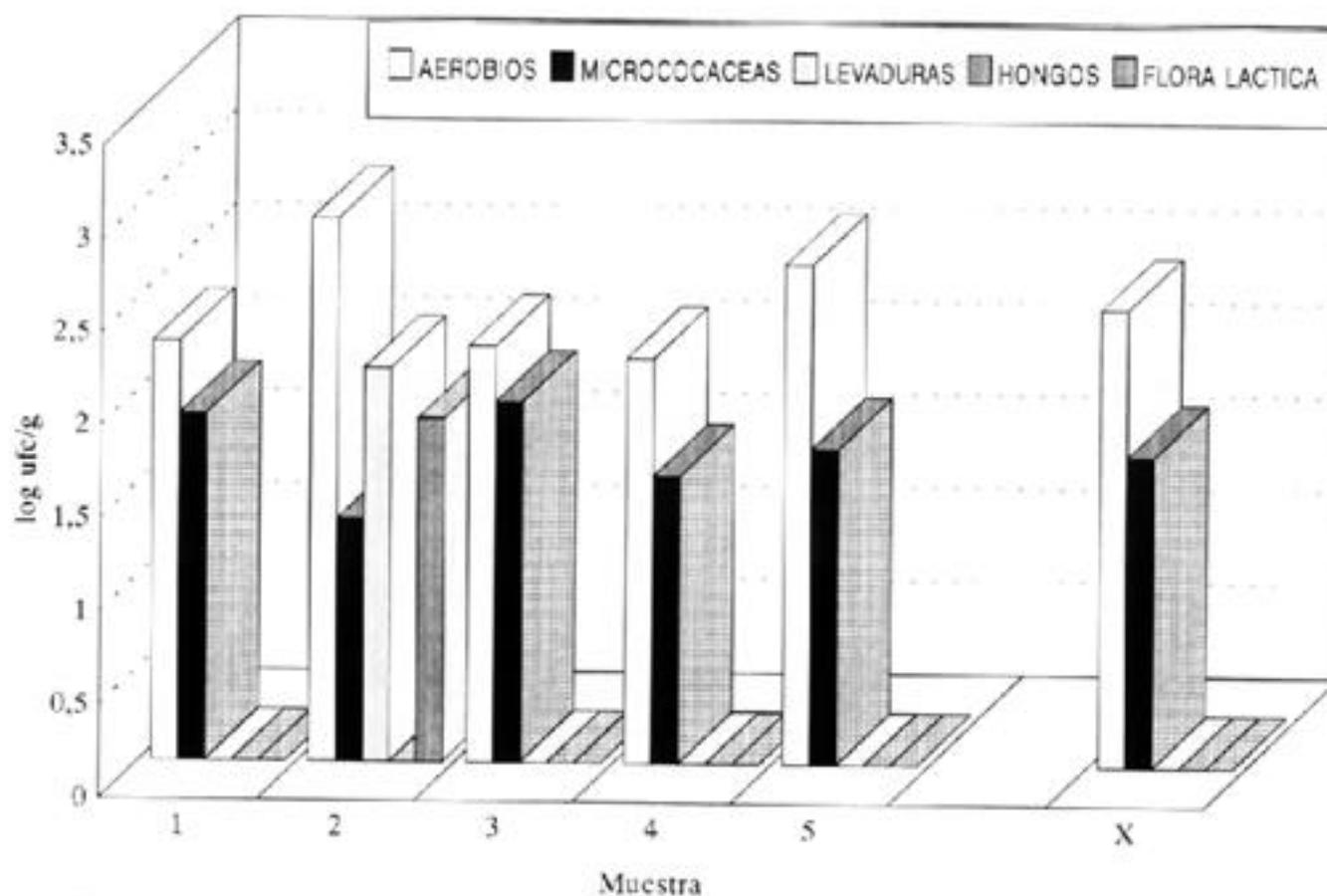


Figura III.1. Representación gráfica de los recuentos microbiológicos de la sal nueva utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados

MUESTRA	AEROBIOS	MICROCOCACEAS	LEVADURAS	HONGO	FLORA LACTICA
1	4,49	4,20	---	1,54	---
2	3,56	3,32	1,60	1,30	---
3	2,74	2,48	---	1,54	---
4	3,98	3,84	1,18	1,30	2,86
5	3,15	3,18	---	2,08	1,00
6	5,08	4,90	3,75	3,41	---
7	3,62	3,60	2,32	2,60	---
8	3,52	3,49	3,60	---	---
X	3,77	3,63	1,54	1,72	0,48
D.T.	0,694	0,673	1,456	0,944	0,956

Tabla III.5. Recuentos microbiológicos de la sal de curado de jamones de cerdo ibérico (tiempo de salazón: 4-6 meses), expresados en log ufc/g

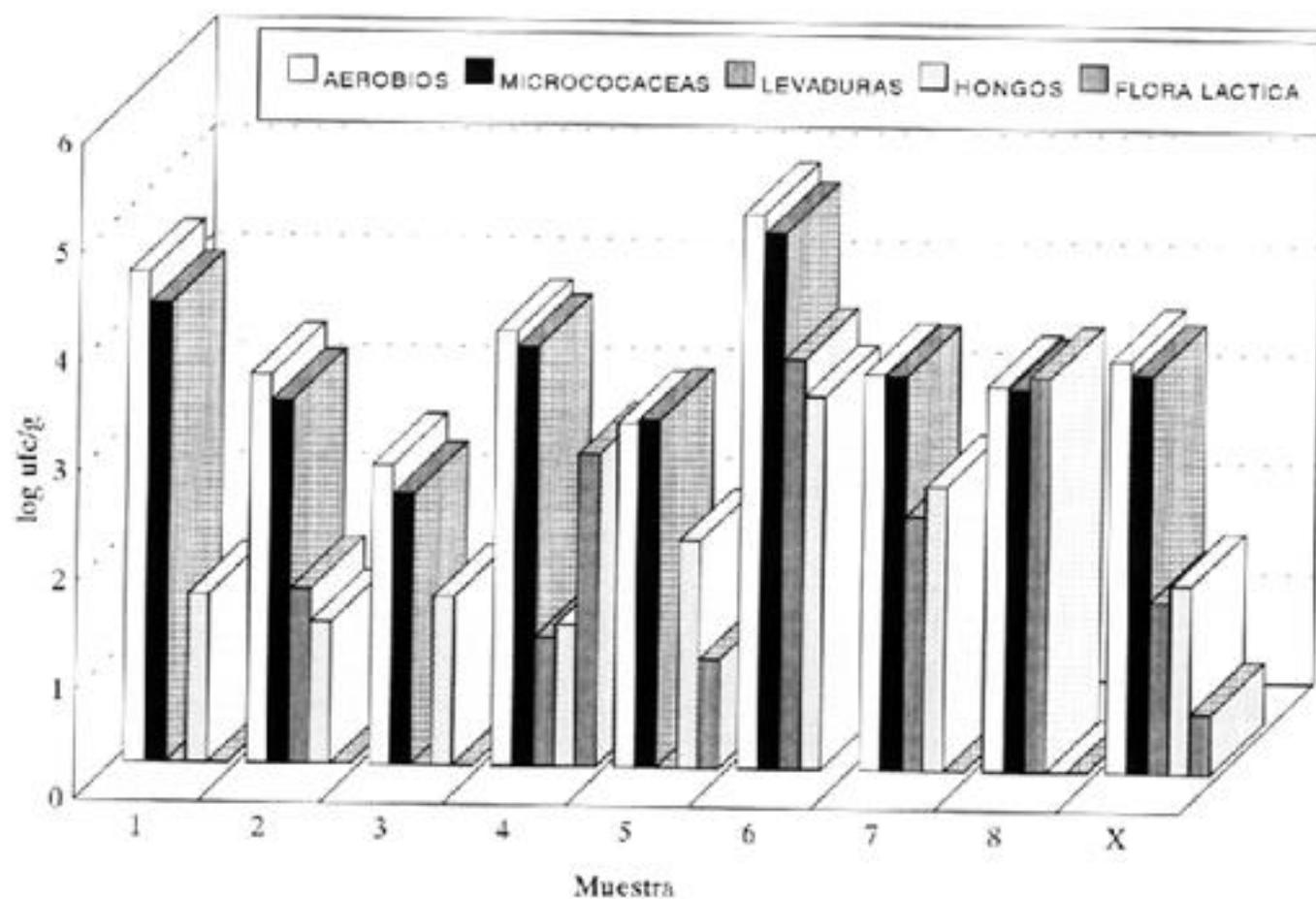


Figura III.2. Representación gráfica de los recuentos microbiológicos de la sal de curado de jamones de cerdo ibérico (tiempo intermedio de salazón: 4-6 meses)

MUESTRA	AEROBIOS	MICROCOCACEAS	LEVADURAS	HONGO	FLORA LACTICA
1	4,00	5,20	3,45	1,94	2,65
2	3,48	3,25	---	3,34	1,81
3	2,43	2,87	2,15	---	---
4	4,62	4,62	3,40	2,11	---
5	3,60	3,30	3,43	2,36	---
6	3,20	3,20	2,04	---	2,96
7	2,52	2,41	2,00	---	---
8	3,46	3,43	2,44	---	1,50
9	4,92	4,62	3,77	3,38	---
10	4,80	4,60	3,08	---	---
11	3,49	2,46	2,38	---	---
12	4,62	3,57	4,54	3,11	---
13	3,32	2,53	3,41	---	---
14	4,45	4,45	4,53	2,32	1,90
15	4,65	3,51	3,32	---	---
16	3,51	3,48	3,38	2,08	---
X	3,82	3,59	2,96	1,29	0,68
D.T.	0,763	0,836	1,078	1,349	1,049

Tabla III.6. Recuentos microbiológicos de la sal de curado de jamones de cerdo blanco (tiempo de salazón: 4-6 meses), expresados en log ufc/g

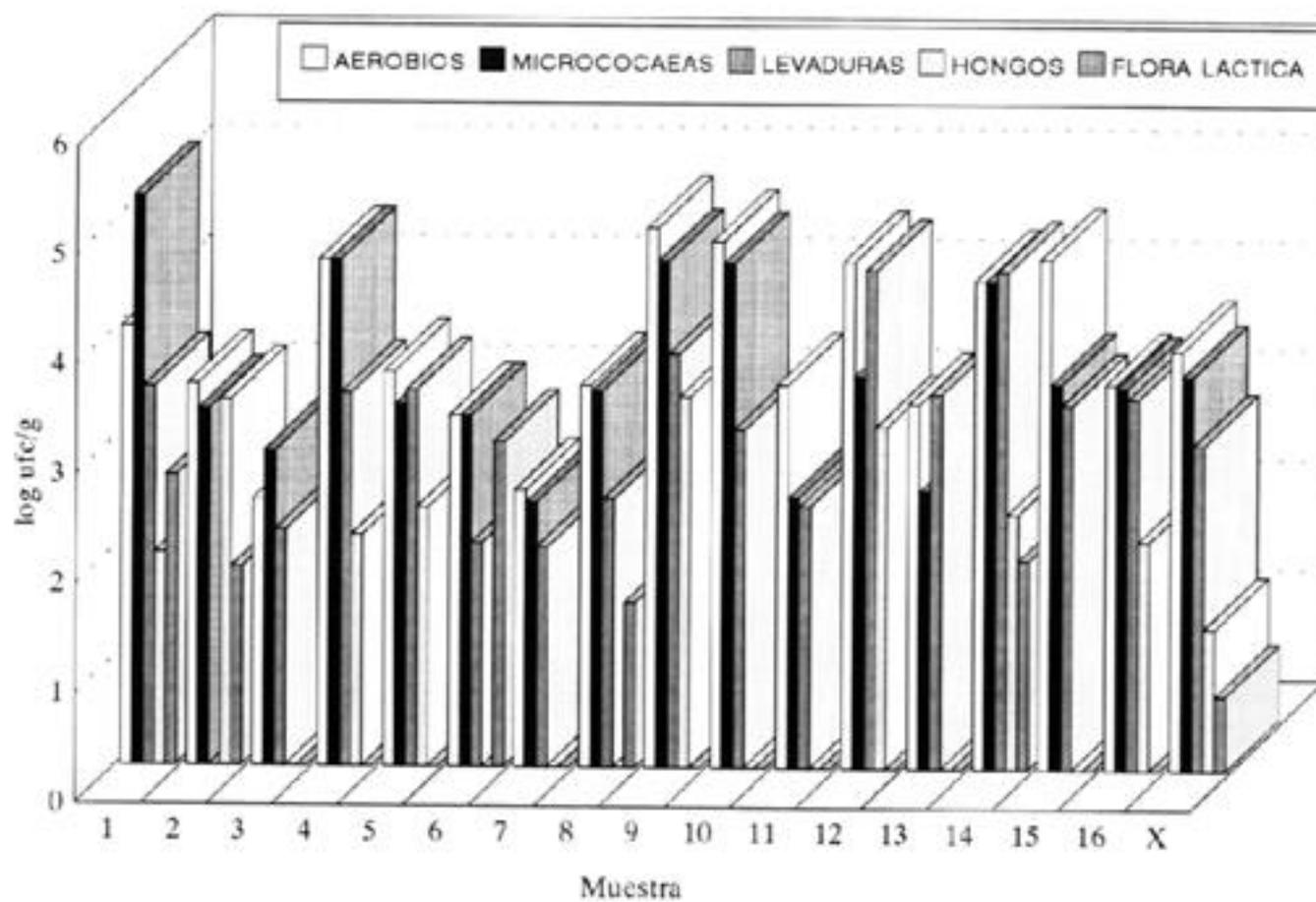


Figura III.3. Representación gráfica de los recuentos microbiológicos de la sal de curado de jamones de cerdo blanco (tiempo intermedio de salazón: 4-6 meses)

III.3. EVOLUCIÓN DE LOS RECuentOS MICROBIOLÓGICOS DE LA SAL DE CERDO IBÉRICO Y DE CERDO BLANCO DURANTE EL PERÍODO DE SALAZÓN

En la tabla III.7 se recogen los recuentos microbiológicos (aerobios, micrococáceas, levaduras, hongos y flora láctica) de 2 muestras de sal de curado de cerdo ibérico y 2 muestras de cerdo blanco analizadas en tres etapas del período de salazón (2, 4 y 7 meses). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la ausencia de una tendencia definida en la evolución de todos los grupos microbianos analizados.

Los únicos grupos microbianos presentes en las muestras de sal en todas las fases del período evolutivo fueron los aerobios mesófilos y las micrococáceas. Solamente en una de las muestras, que corresponde a sal de curado de cerdo ibérico (muestra nº 1), se observa un incremento en estos recuentos a lo largo del período evolutivo, correspondiendo en el caso de los aerobios mesófilos a 1,3 unidades logarítmicas y en las micrococáceas a 1 unidad logarítmica.

Las levaduras solamente no se detectaron en una de las muestras, durante toda la etapa evolutiva (nº 2 de cerdo ibérico) y en las 3 restantes no se apreció un aumento significativo. En el caso de los hongos, en 2 muestras se obtuvieron recuentos durante las tres fases estudiadas, aunque no se observó ningún incremento en su número, en las otras 2 muestras no se detectaron en uno de los períodos analizados. Los recuentos de flora láctica no fueron uniformes ya que en el caso de las muestras de cerdo blanco estuvieron presentes solamente en 2 de las etapas estudiadas y en el cerdo ibérico únicamente en la etapa intermedia en cada una de las muestras analizadas.

CERDO BLANCO				CERDO IBERICO		
MUESTRAS	1	2	X	1	2	X
MESES	AEROBIOS			AEROBIOS		
2	2,61	5,41	4,01	3,75	4,00	3,88
4	3,43	3,91	3,67	4,34	4,39	4,37
7	2,69	5,38	4,04	5,06	4,49	4,78
	MICROCOCACEAS			MICROCOCACEAS		
2	2,20	5,14	3,67	3,74	4,04	3,89
4	3,43	3,98	3,71	4,14	3,53	3,83
7	2,59	4,55	3,57	4,90	4,20	4,55
	LEVADURAS			LEVADURAS		
2	2,05	5,54	3,30	3,32	---	1,66
4	2,47	3,75	3,11	3,04	---	1,52
7	2,79	3,30	3,06	3,75	---	1,88
	HONGOS			HONGOS		
2	1,30	3,07	2,19	2,00	1,47	1,73
4	3,04	2,11	2,58	1,98	---	0,99
7	---	2,49	1,25	1,47	1,54	1,51
	FLORA LACTICA			FLORA LACTICA		
2	---	1,39	0,70	---	---	---
4	2,78	---	1,39	3,54	1,30	2,42
7	1,39	---	1,89	---	---	---

III.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS MICROCOCÁCEAS

De acuerdo con los objetivos propuestos en la presente memoria, una vez realizados los recuentos de los distintos grupos microbianos en las muestras de sal, se procedió a la identificación solamente de las micrococáceas presentes por ser el grupo más abundante y en el que deben de estar incluídas las especies microbianas de mayor interés tecnológico. Para ello, se procedió en primer lugar a la adscripción a familia, mediante la tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Las 391 cepas aisladas en MSA fueron Gram positivas y 22 de ellas fueron catalasa negativas, lo que representa un 5,62%.

La adscripción a género y especie de las 391 cepas aisladas en MSA (18 de sal nueva, 169 de sal de cerdo ibérico y 204 de cerdo blanco), se llevó a cabo según lo descrito en Material y Métodos, en el apartado II.5.4.2 y II.5.4.3. De las 22 cepas catalasa negativas, no se pudieron identificar 19, las tres restantes fueron caracterizadas por el sistema API como pertenecientes a la especie *Aerococcus viridans*. Dos cepas catalasa positivas fueron consideradas por el sistema de identificación como *Stomatococcus*. No se realizó ningún tipo de estudio sobre el resto de los grupos microbianos aislados de la sal.

Las 367 cepas pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* se sometieron a las pruebas de la fermentación/oxidación de la glucosa (Hugh y Leifson) y crecimiento bajo condiciones anaerobias en un medio semisólido con tioglicolato (Evans y Kloos). Teniendo en cuenta los resultados relativamente anómalos obtenidos en estos tests, se optó por realizar la adscripción a género basándose exclusivamente en los resultados proporcionados por el sistema ATB 32 STAPH. De acuerdo con el test de Hugh y Leifson, 119 se considerarían *Staphylococcus*, pero teniendo en cuenta la capacidad de crecimiento en anaerobiosis un total de 187 pertenecerán a este género. Con respecto a la adscripción al género *Micrococcus* se observó el crecimiento en anaerobiosis de 85 cepas, hecho que se considera anómalo para este género.

En la tabla III.8 se recoge el comportamiento de las 367 cepas en ambos tipos de pruebas.

III.4.1. Adscripción a género de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de salazonado de jamones crudo-curados

La tabla III.9 recoge los resultados de adscripción a género de las 372 cepas de presuntas micrococáceas aisladas en MSA a partir de los 3 tipos de sal analizados.

En la sal nueva, las 18 cepas estudiadas pertenecen al género *Staphylococcus* (100%).

En la sal utilizada en el salazonado de jamones de cerdo ibérico la adscripción a género fue la siguiente: *Staphylococcus* 107 cepas (66,87%) y *Micrococcus* 53 cepas (33,12%).

En la sal de salazonado de jamones de cerdo blanco se adscribieron al género *Staphylococcus* 101 cepas lo que representa un 52,06%, al género *Micrococcus* 88 cepas (45,36%) y al género *Stomatococcus* 2 cepas (1%). En este tipo de sal 3 cepas no pertenecen a la familia Micrococcaceae, aunque fueron identificadas como anteriormente se ha comentado, como *Aerococcus viridans* utilizando el sistema de identificación ATB 32 STAPH

En la figura III.4 se recogen los porcentajes de cada uno de los géneros encontrados en los tres tipos de sal (nueva, de cerdo ibérico y de cerdo blanco) y la figura III.5 el porcentaje de los géneros aislados del conjunto de los tres tipos de sal analizados.

III.4.2. Adscripción a especie de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de salazonado de jamones crudo-curados

MICROCOCCUS

En la sal nueva no se puso en evidencia la presencia de ninguna especie perteneciente a este género.

En la tabla III.10 se recogen los resultados de la adscripción a especie de las 53 cepas de *Micrococcus* aisladas de la sal de salazonado de jamones crudo-curados de cerdo ibérico, teniendo en cuenta el porcentaje de identificación (del 99%, del 90% y del 75%). También se incluyen las cepas consideradas como dudosas si bien se adscriben a una determinada especie siguiendo los resultados proporcionados por el sistema ATB 32 STAPH. De ellas 31 cepas

pertenecen a la especie *M. lylae* (58,49%); 8 a *M. nishinomiyaensis* (15,09%); 7 a *M. varians* (13,21%) y 7 a *M. roseus* (13,21%).

La tabla III.11 contempla la adscripción a especie de las 88 cepas de *Micrococcus* aisladas de la sal utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados de cerdo blanco. *M. lylae* es la especie más abundante (las 50 cepas identificadas de esta especie representan el 56,81% del total), seguida de *M. luteus* con 15 cepas (17,05%), 12 cepas de *M. nishinomiyaensis* (13,64%) y 11 cepas de *M. roseus* (2,50%).

STAPHYLOCOCCUS

En primer lugar, se realizó la prueba de la coagulasa en las 226 cepas adscritas al género *Staphylococcus*, comprobándose la presencia solamente de una cepa coagulasa positiva, identificada como *S. intermedius*; no detectándose por lo tanto la presencia de *S. aureus*.

La tabla III.12 presenta la adscripción a especie de las 18 cepas de *Staphylococcus* aisladas de la sal nueva utilizada en la elaboración de jamones crudo-curados; de ellas corresponden 10 cepas a *S. xylosus* (55,55%), 5 a *S. equorum* (27,78%) y 3 a *S. Kloosii* (16,67%).

La tabla III.13 recoge la adscripción a especie de las 107 cepas de *Staphylococcus* aisladas de la sal utilizada en la elaboración del jamón crudo-curado de cerdo ibérico. En ella se puede observar que 46 cepas son de *S. xylosus* (lo que representa el 42,99% del total), 42 de *S. equorum* (39,25%), 9 de *S. saprophyticus* (8,41%), 3 de *S. simulans* (2,88%), 2 de *S. gallinarum* (1,87%), 2 de *S. sciuri* (1,87%) y 1 cepa de las siguientes especies: *S. chromogenes*, *S. intermedius* y *S. epidermidis* 2, representando el 0,93% cada una de ellas.

En la tabla III.14. figura la adscripción a especie de las 101 cepas de *Staphylococcus* aisladas de la sal utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados de cerdo blanco. Las especies identificadas fueron: *S. xylosus* (51 cepas que representan el 50,49%), *S. equorum* (20; 19,88%), *S. saprophyticus* (7; 6,93%), *S. capitis* (6; 5,94%), *S. sciuri* y *S. Kloosii* (4 cepas de cada especie; 3,96%), *S. gallinarum* (3; 2,97%), *S. schleiferi* y *S. hominis* (2 cepas de cada especie; 1,98%) y *S. lentus* y *S. caprae* (1 cepa de cada una de ellas que representa el 0,99%).

Además de las especies de *Micrococcus* y *Staphylococcus* el sistema API identificó a las 2 cepas del género *Stomatococcus*, presentes en la sal de curado de cerdo blanco, como pertenecientes a la especie *S. mucilaginosus*.

La adscripción a especie de las cepas de micrococáceas aisladas de los 3 tipos de sal analizados se recogen en las figuras III.6 (sal nueva), III.7 (sal de curado de cerdo ibérico) y III.8 (sal de curado de cerdo blanco). En la gráfica III.9 y en la III.10 se representa la adscripción a especie de las 141 cepas de *Micrococcus* y de las 226 cepas de *Staphylococcus*, respectivamente, aisladas de los 3 tipos de sal.

TEST	TOTAL N° (367)	%	STAPHYLOCOCCUS Número (226)	%	MICROCOCCUS Número (141)	%
GLUCOSA						
Fermentación	119	32,4	119	52,6	---	---
Oxidación	218	59,4	93	41,1	125	88,65
No reacción	30	8,17	14	6,19	16	11,34
CRECIMIENTO						
ANAEROBICO	272	74,1	187	82,7	85	60,28

Tabla III.8. Comportamiento de las 367 cepas de *Staphylococcus* y *Micrococcus* aisladas de la sal de curado de jamones crudo-curados frente a las pruebas de fermentación/oxidación de la glucosa y del crecimiento en anaerobiosis

GENERO	SAL NUEVA	% DE CEPAS	SAL DE CERDO IBERICO	% DE CEPAS	SAL DE CERDO BLANCO	% DE CEPAS
Staphylococcus	18	100	107	66,87	101	52,06
Micrococcus	---		53	33,12	88	45,36
Stomatococcus	---		---		2	1,03
Aerococcus	---		---		3	1,55
Total	18	100	160	100	194	100

Tabla III.9. Adscripción a género de las 372 cepas de presuntas Micrococáceas aisladas en MSA

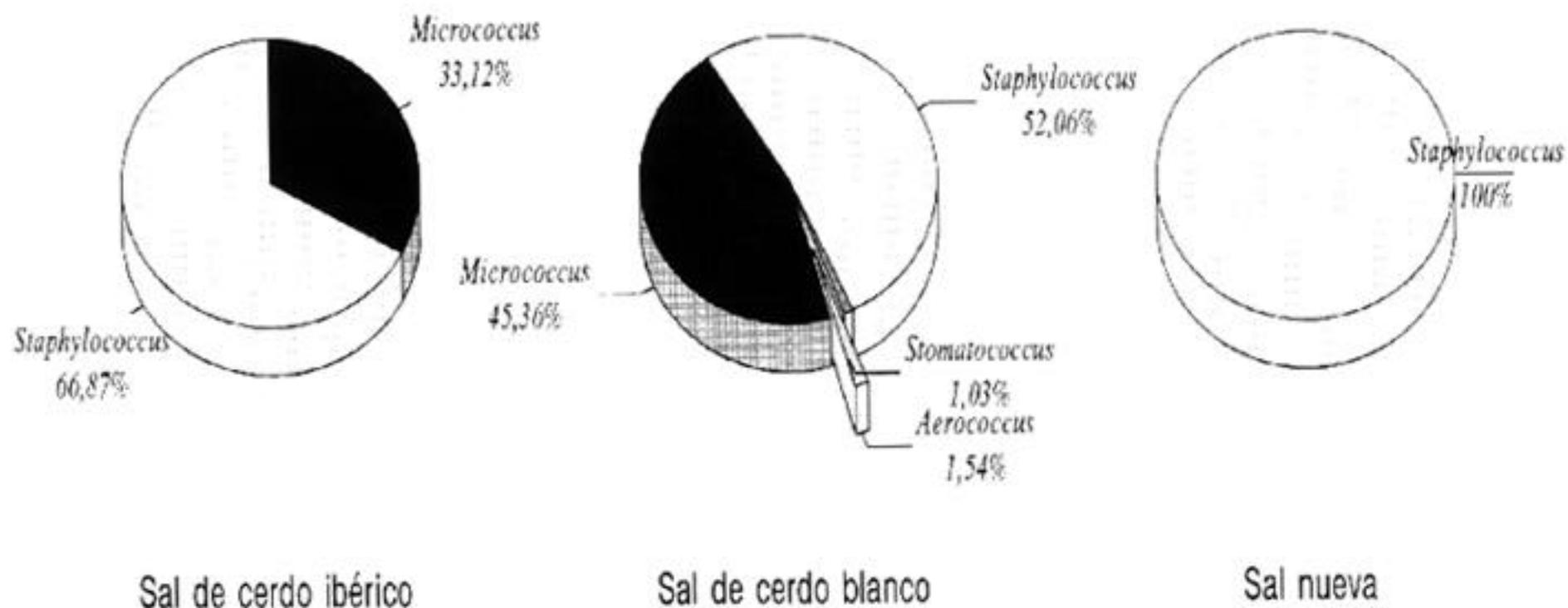


Figura III.4. Representación gráfica de la adscripción a género de las Micrococáceas aisladas de la sal de curado de jamones crudo-curados.

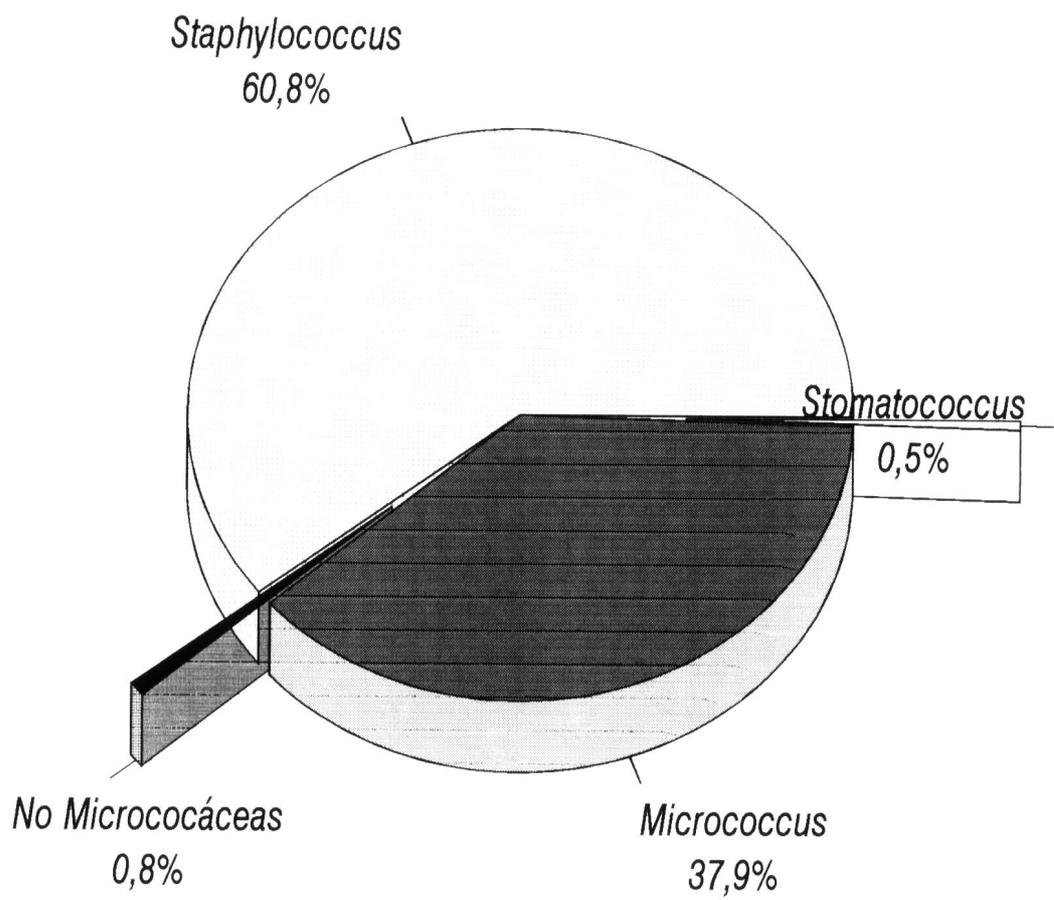


Figura III.5. Abundancia relativa de los géneros de las 372 cepas de Micrococáceas aisladas en MSA

ESPECIE	CEPAS CON ≥99% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥90% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥75% DE IDENTIFICA CION	CEPAS DUDOSAS	% TOTAL CEPAS
<i>M.lylae</i>	3	4	7	17	58,49
<i>M.nishinomiyaensis</i>	2	2	2	2	15,09
<i>M.varians</i>	1	2	1	3	13,21
<i>M.rosens</i>	3	---	---	4	13,21
Total	9	8	10	26	100

Tabla III.10. Adscripción a especie de las 53 cepas de *Micrococcus* aisladas de la sal de curado de jamones de cerdo ibérico

ESPECIE	CEPAS CON ≥99% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥90% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥75% DE IDENTIFICA CION	CEPAS DUDOSAS	% TOTAL CEPAS
<i>M.lylae</i>	16	9	11	14	56,81
<i>M.luteus</i>	3	6	---	6	17,05
<i>M.nishinomiyaensis</i>	4	2	---	6	13,64
<i>M.rosens</i>	6	1	2	2	12,58
Total	29	18	13	28	100

Tabla III.11. Adscripción a especie de las 88 cepas de *Micrococcus* aisladas de la sal de curado de jamones de cerdo blanco

ESPECIE	CEPAS CON ≥99% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥90% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥ 75% DE IDENTIFICA CION	CEPAS DUDOSAS	% TOTAL CEPAS
S.xylosus	4	1	1	4	55,55
S.equorum	2	1	---	2	27,78
S.kloosii	1	---	1	1	16,67
Total	7	2	2	7	100

Tabla III.12. Adscripción a especie de las 18 cepas de Staphylococcus aisladas de la sal nueva utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados

ESPECIE	CEPAS CON ≥99% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥90% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥75% DE IDENTIFICA CION	CEPAS DUDOSAS	% TOTAL CEPAS
<i>S.xylosus</i>	22	10	7	7	42,99
<i>S.equorum</i>	25	5	2	10	39,25
<i>S.saprophyticus</i>	4	5	---	---	8,41
<i>S.simulans</i>	---	---	1	2	2,88
<i>S.sciuri</i>	---	---	1	1	1,87
<i>S.gallinarum</i>	1	1	---	---	1,87
<i>S.chromogenes</i>	---	---	---	1	0,93
<i>S.intermedius</i>	---	---	---	1	0,93
<i>S.epidermidis 2</i>	---	---	---	---	0,93
Total	52	21	11	23	99,99

Tabla III.13. Adscripción a especie de las 107 cepas de *Staphylococcus* aisladas de la sal de curado de jamones de cerdo ibérico

ESPECIE	CEPAS CON ≥99% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥90% DE IDENTIFICA CION	CEPAS CON ≥75% DE IDENTIFICA CION	CEPAS DUDOSAS	% TOTAL CEPAS
S.xylosus	19	11	9	12	50,49
S.equorum	9	4	1	6	19,88
S.saprophyticus	3	3	1	---	6,93
S.capitis	---	2	2	2	5,94
S.kloosii	---	---	2	2	3,96
S.sciuri	1	1	---	2	3,96
S.gallinarum	2	---	---	1	2,97
S.schleiferi	---	---	1	1	1,98
S.hominis	1	---	---	1	1,98
S.lentus	1	---	---	---	0,99
S.caprae	---	---	---	1	0,99
Total	36	21	16	28	99,99

Tabla III.14. Adscripción a especie de las 101 cepas de Staphylococcus aisladas de la sal de curado de jamones de cerdo blanco

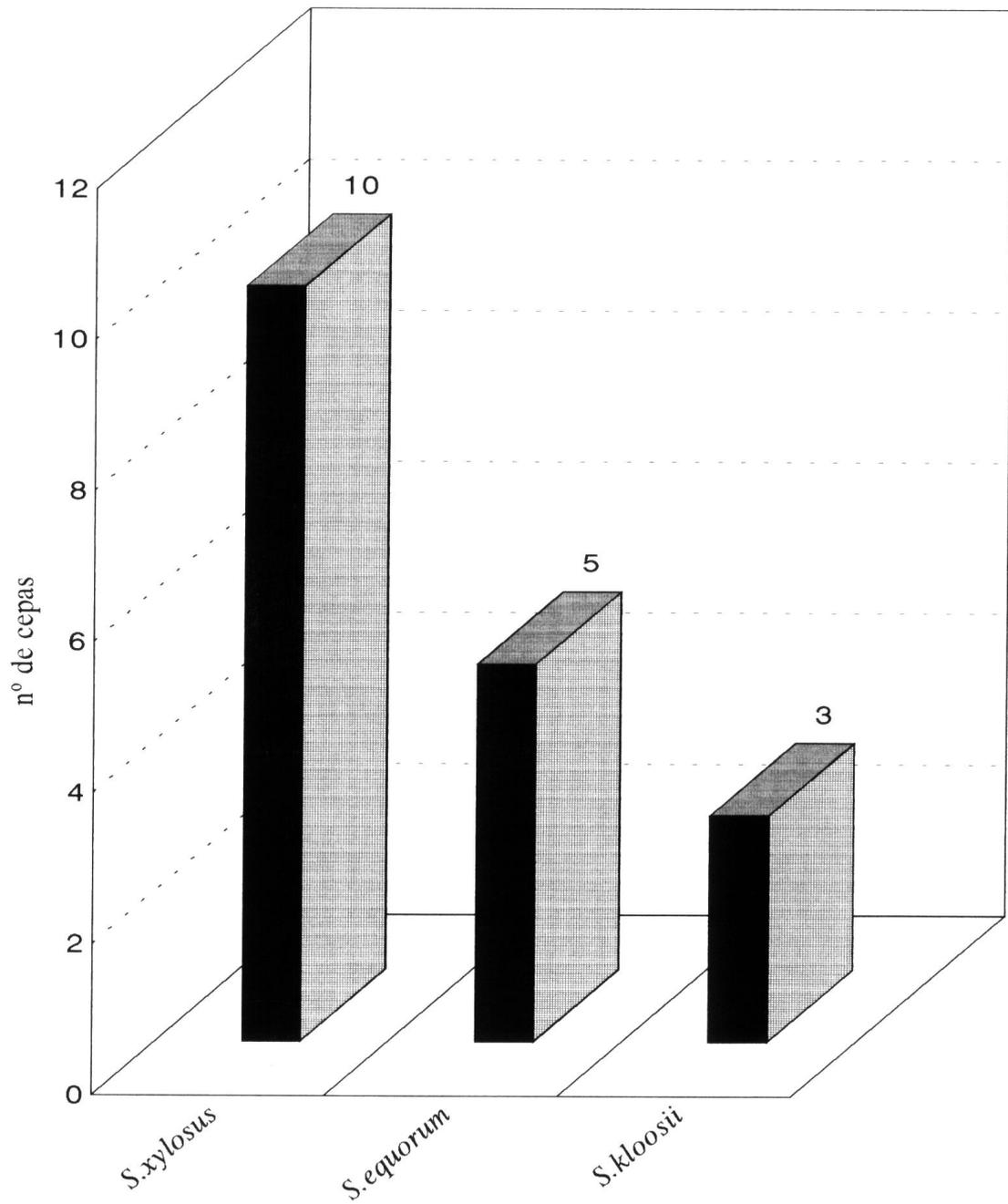


Figura III.6. Representación de la adscripción a especie de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal nueva utilizada en el salazonado de jamones crudo-curados

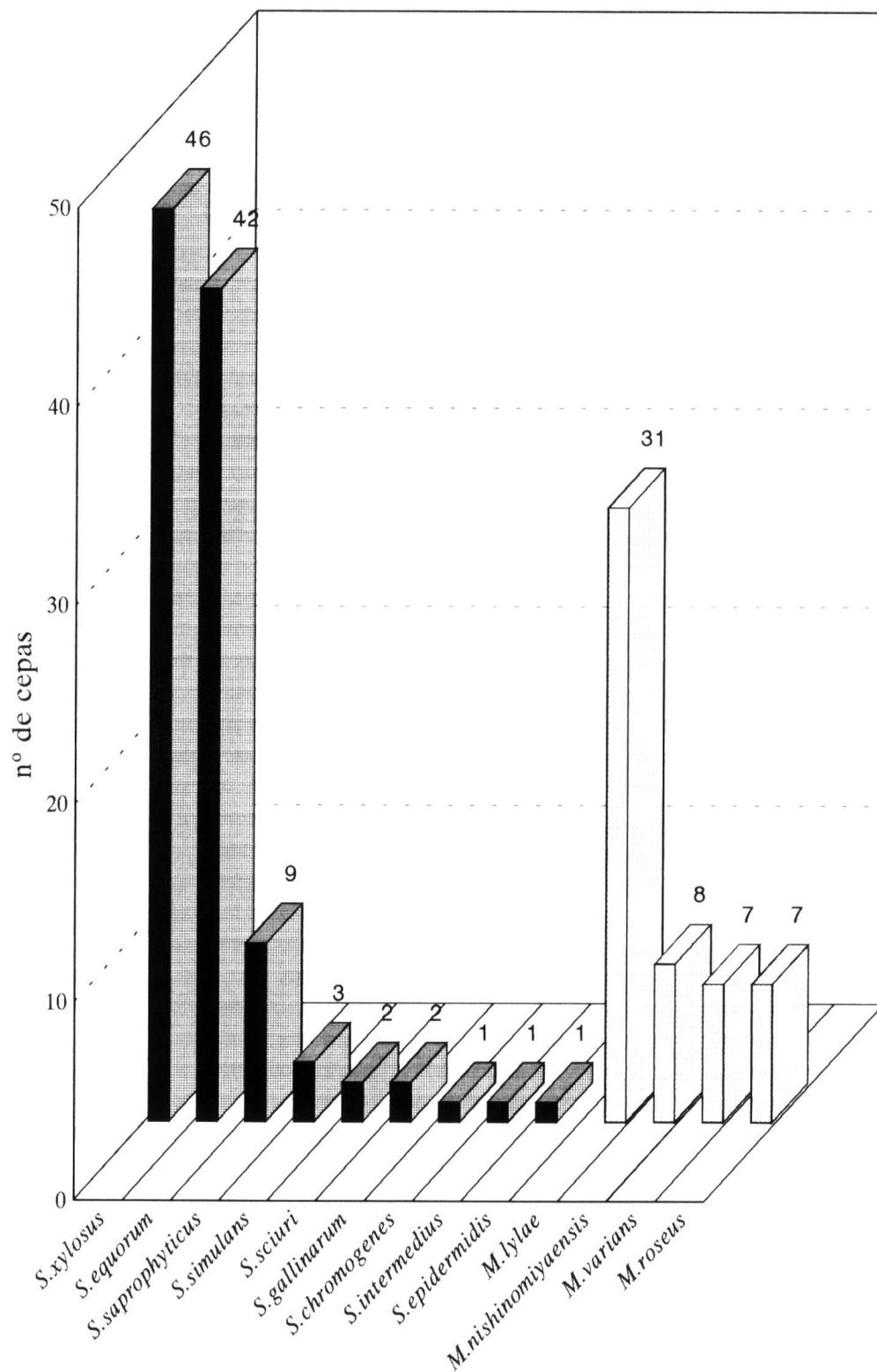


Figura III.7. Representación de la adscripción a especie de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de curado de jamones crudo-curados de cerdo ibérico

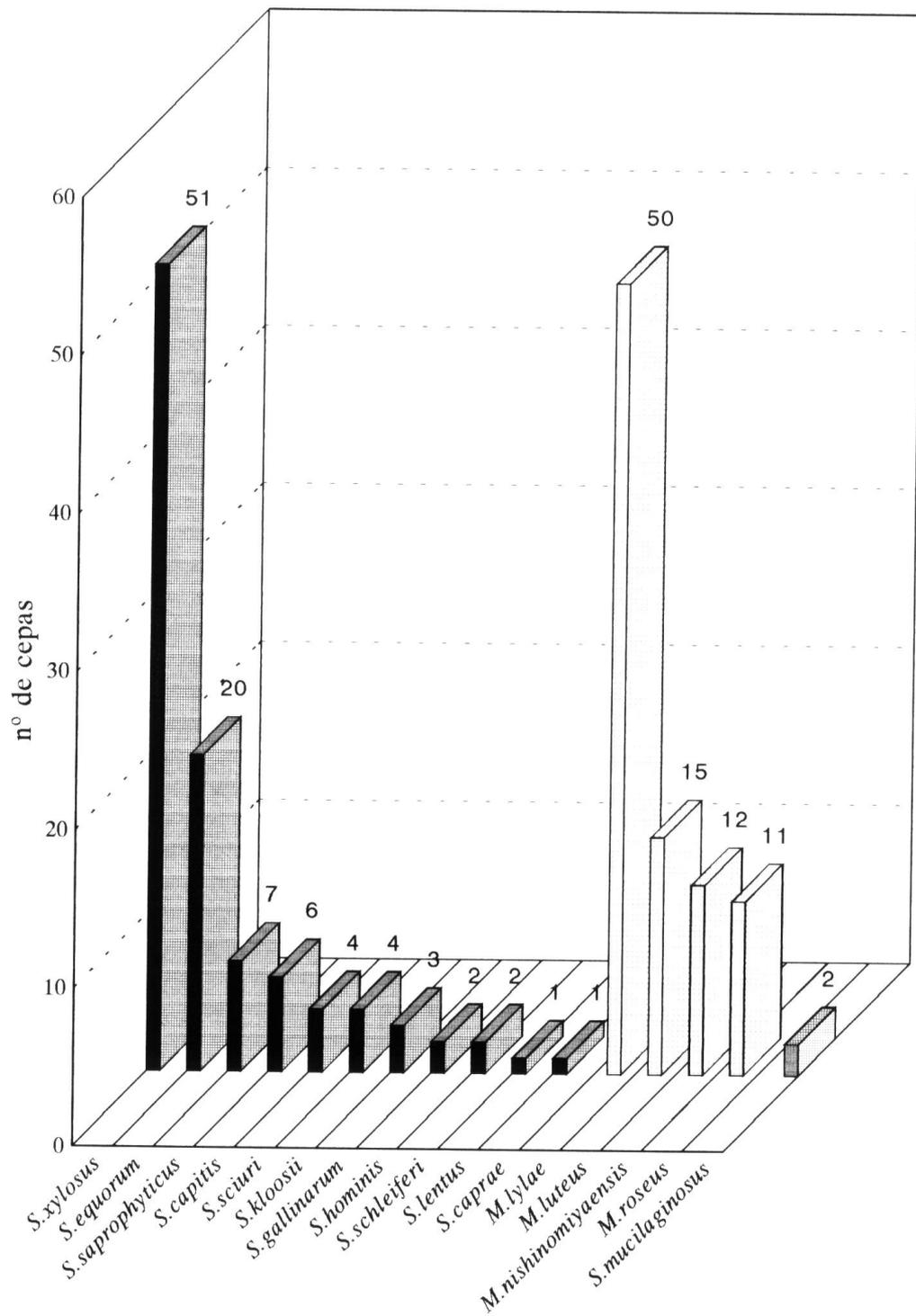


Figura III.8. Representación de la adscripción a especie de las cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de curado de jamones crudo-curados de cerdo blanco

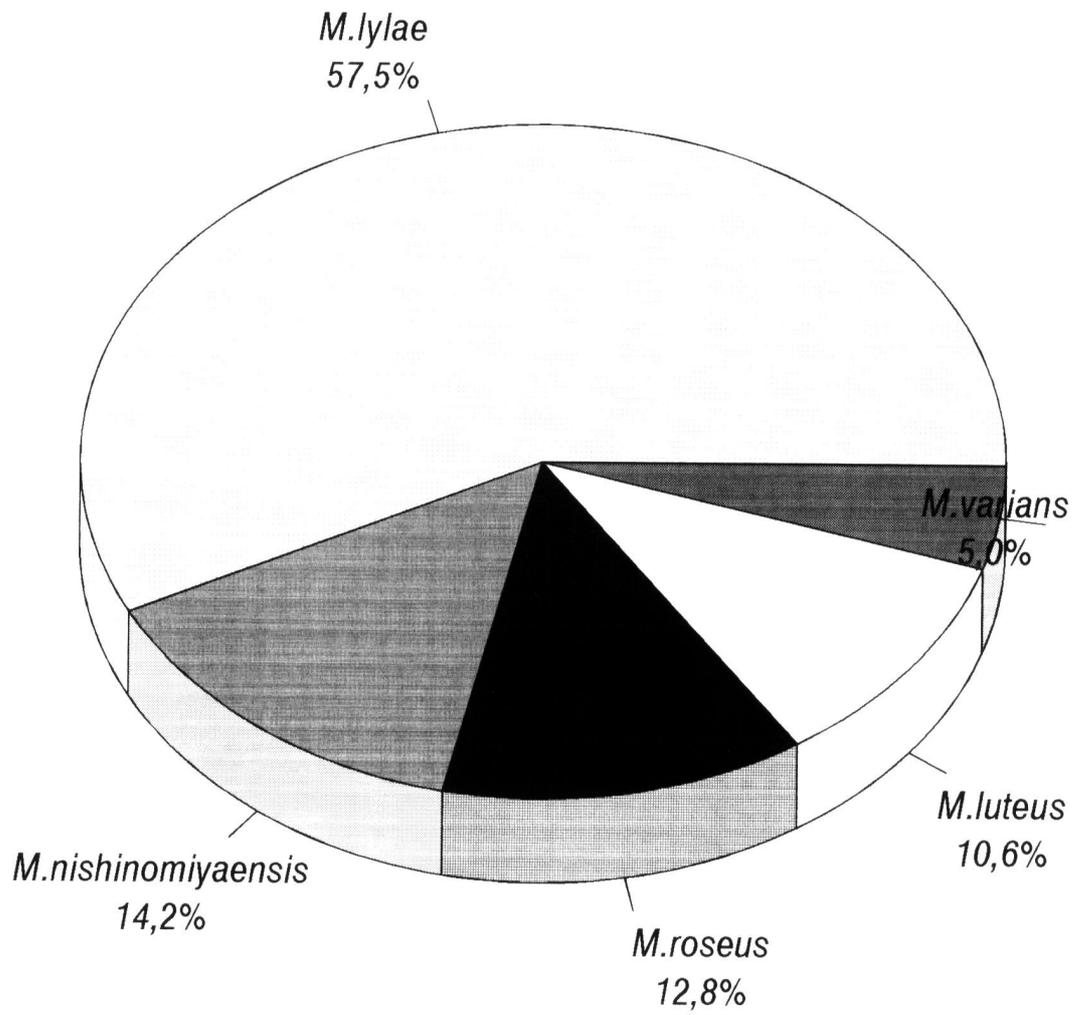


Figura III.9. Adscripción a especie de las 141 cepas pertenecientes al género *Micrococcus* aisladas de los 3 tipos de sal estudiados

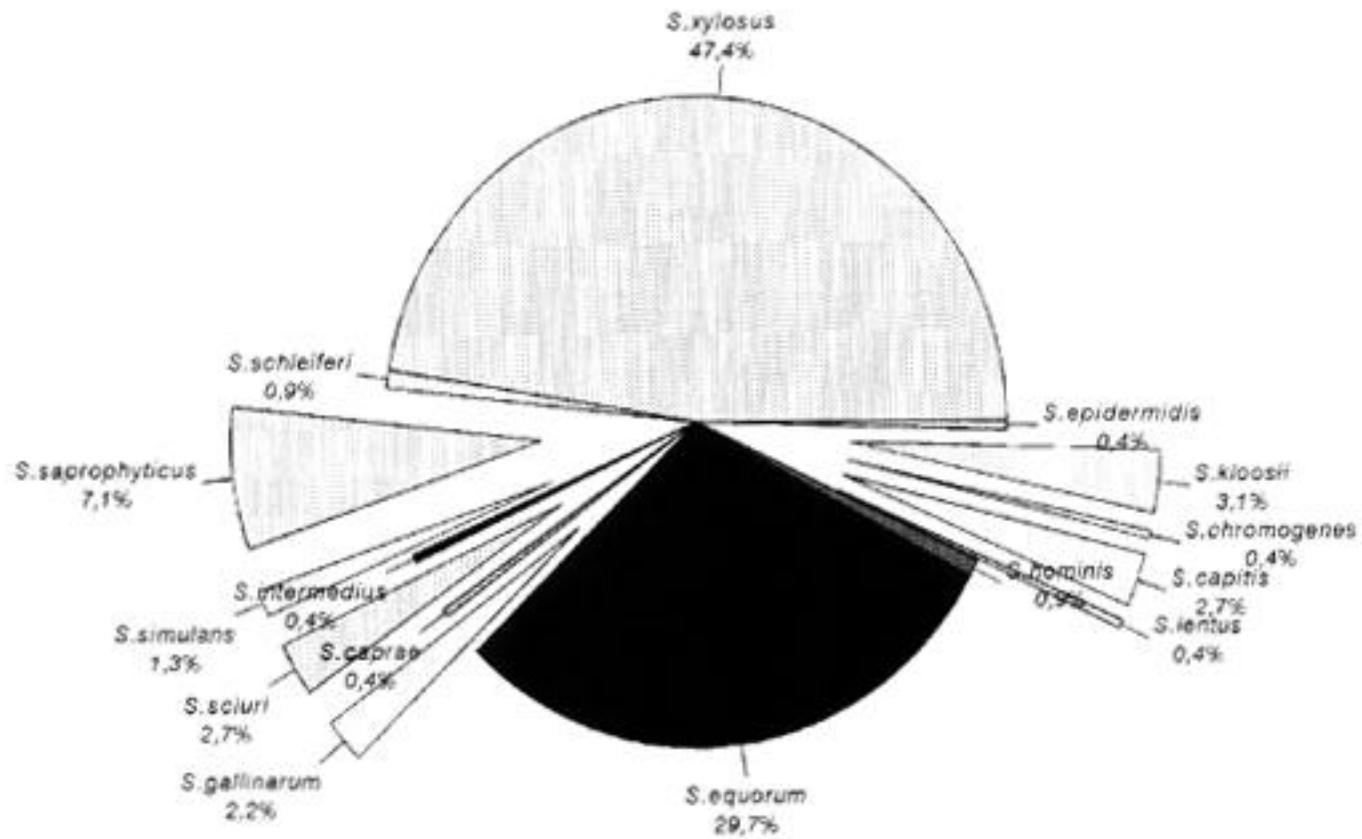


Figura III.10. Adscripción a especie de las 226 cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* aisladas de los 3 tipos de sal estudiados

III.5. PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO

III.5.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano

Para el estudio del efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano se determinaron inicialmente las curvas de crecimiento a 5 temperaturas diferentes (4°C, 11°C, 20°C, 25°C y 32°C). A partir de ellas se calcularon los siguientes parámetros:

- 1.- Duración de la fase de latencia (horas)
- 2.- Energía de activación (Julios/mol)
- 3.- Constante de la velocidad de crecimiento (horas⁻¹).
- 4.- Tiempo de generación (horas)

El número de cepas utilizadas en el presente estudio fue de 24 (12 *Micrococcus* y 12 *Staphylococcus*). Las especies pertenecientes a cada género objeto de estudio se recogen en la tabla III. 15.

Las figuras III.11, III.12, III.13, III.14 y III.15 representan gráficamente las curvas de crecimiento medio de las cepas de *Staphylococcus* y *Micrococcus* a cada una de las temperaturas de incubación. Como en ellas puede observarse las cepas de *Staphylococcus* presentan una velocidad de crecimiento superior a la de *Micrococcus* a las temperaturas de 4°C, 25°C y 32°C; mientras que a 11°C y 20°C la velocidad fue similar en ambos géneros.

Micrococcus	CEPA NUMERO	Staphylococcus	CEPA NUMERO
M.lylae	1	S.sciuri	3
M.nishinomiyaensis	2	S.equorum	4
M.nishinomiyaensis	16	S.saprophyticus	7
M.varians	17	S.lentus	14
M.varians	33	S.equorum	20
M.nishinomiyaensis	37	S.equorum	23
M.nishinomiyaensis	38	S.saprophyticus	27
M.lylae	39	S.xylosus	29
M.roseus	41	S.equorum	42
M.roseus	52	S.saprophyticus	54
M.roseus	58	S.saprophyticus	63
M.varians	72	S.xylosus	65

Tabla III.15. Identificación de las cepas de Micrococcus y Staphylococcus

Las figuras III.16 y III.17 muestran las curvas de crecimiento de dos cepas de las 2 especies más abundantes del género *Micrococcus* (*M. lylae* y *M. nishinomiyaensis*) y las figuras III.18 y III.19 las de dos cepas de las 2 especies mayoritarias del género *Staphylococcus* (*S. xylosus* y *S. equorum*).

III.5.1.1. Fase de latencia

En las tablas III.16 y III.17 se recoge la duración de la fase de latencia expresada en horas de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus*, respectivamente. En las mismas puede observarse que esta fase aumenta notablemente a medida que disminuye la temperatura de incubación. Comparando estos resultados se puede ver que los valores medios de la fase de latencia en el caso de los *Micrococcus* es superior al de las cepas de *Staphylococcus* en todas las temperaturas de incubación, excepto a 11°C, en la que las especies de este género presentan una duración de la fase de latencia 16 horas superior a la de las especies del género anterior.

Considerando los resultados obtenidos para cada una de las especies estudiadas y referidos a la temperatura de 4°C-generalmente la utilizada en el salazonado de los jamones-, se observa en el caso del género *Micrococcus*, que *M. lylae* es la especie con mayor período de latencia -superior a 500 horas- seguido de *M. varians* y *M. roseus*- ambas con 300 horas aproximadamente; por el contrario *M. nishinomiyaensis* es la que menor fase de latencia posee. En el caso del género *Staphylococcus* todas las especies presentan una fase de latencia muy similar a dicha temperatura y que generalmente oscila entre las 200 y 300 horas.

III.5.1.2. Energía de activación

Para el cálculo de la energía de activación de las cepas de Micrococáceas estudiadas fue necesario el establecimiento de la representación de Arrhenius que representa el logaritmo de la constante de la velocidad de crecimiento (μ) en función del inverso de la temperatura absoluta. En las figuras III.20, III.21, III.22 y III.23 se recogen a manera de ejemplo, las representaciones de Arrhenius de las dos especies más abundantes de *Micrococcus* (*M. lylae* y *M. nishinomiyaensis*) y *Staphylococcus* (*S. xylosus* y *S. equorum*), respectivamente, a las temperaturas de incubación.

A partir de las representaciones gráficas se calculó la energía de activación (Tabla III.18).

III.5.1.3. Constante de la velocidad de crecimiento y tiempo de generación

En las tabla III.19 y III.20, se recoge la constante de la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación, respectivamente, a las diferentes temperaturas de incubación de las 12 cepas de *Micrococcus* estudiadas. En todas ellas se observa un incremento significativo de la velocidad de crecimiento a medida que se eleva la temperatura de incubación.

A 4°C, temperatura próxima a la utilizada en la práctica industrial en la fase de salazonado de jamones crudo-curados, la mayoría de las cepas presentaron una velocidad de crecimiento muy lenta que oscila entre 0,001 y 0,002 h⁻¹, lo que significa que su tiempo de generación oscila entre 25-35 días. La cepa 2 (*M. nishinomiyaensis*) es la que mayor velocidad de crecimiento tiene (0,007 h⁻¹), mientras que la 1 (*M. lylae*) es la de crecimiento más lento (0,0003 h⁻¹).

A 11°C la cepa 39 (*M. lylae*) es la que tiene un crecimiento más bajo y la cepa 37 (*M. nishinomiyaensis*) es la que posee el más elevado.

A 20°C las cepas de *Micrococcus* tienen una velocidad media de crecimiento de 0,054 h⁻¹, lo que equivale a un tiempo de generación de 15,2 h. Conviene comentar la rapidez en el crecimiento observado en la cepa 1 (*M. lylae*) -velocidad de crecimiento: 0,130 h⁻¹ y tiempo de generación: 5,3h-.

Las cepas estudiadas presentan a 25°C y 32°C, una velocidad media de crecimiento de 0,159 h⁻¹ y 0,354 h⁻¹ y un tiempo de generación de 4,8 h y 2,1 h, respectivamente. Es interesante destacar que la cepa 17 (*M. varians*) fue la que presentó mayor crecimiento a ambas temperaturas

En la figura III.24 se representa gráficamente la constante de la velocidad de crecimiento y en la figura III.25 el tiempo de generación de las cepas de *Micrococcus* a las diferentes temperaturas de incubación.

La tabla III.21 y la III.22 presentan la constante de la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación, respectivamente, de las 12 cepas de *Staphylococcus* estudiadas a las diferentes temperaturas de incubación (4°C, 11°C, 20°C, 25°C y 32°C). Al igual que ocurre con los *Micrococcus* se observa que el crecimiento es más rápido a medida que aumenta la temperatura de incubación.

A 4°C las cepas objeto de estudio tienen un valor medio de velocidad de crecimiento de 0,004 h⁻¹ (tiempo de generación: 286,6 h). La cepa número 14 (*S. lentus*) fue la de más rápido crecimiento (velocidad de crecimiento: 0,008 h⁻¹; tiempo de generación 86,6 h).

A 11°C, al igual que ocurre a 4°C y a 20°C, la cepa de más rápido crecimiento fue la número 14 (*S. lentus*) y la de menor la número 7 (*S. saprophyticus*).

Las cepas número 65 (*S. xylosus*) y 63 (*S. saprophyticus*) presentaron el crecimiento más rápido a 25°C y 32°C, respectivamente.

Las figuras III.26 y III.27 recogen gráficamente la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación, respectivamente, de las cepas de estafilococos estudiadas.

Al comparar los valores medios de la constante de la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas, se observa un más rápido crecimiento de los estafilococos a todas las temperaturas de incubación, que es particularmente evidente a 32°C. En la figura III.28 se recoge gráficamente los valores medios de la velocidad de crecimiento de las especies pertenecientes a los dos géneros citados.

III.5.2. Actividad lipolítica

En la tabla III.23 se recoge la actividad lipolítica de las 24 cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas utilizando como sustrato tocino dorsal de cerdo, expresada en términos de % de ácido oleico generado por los microorganismos en 100 g de grasa.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una actividad lipolítica muy similar en las cepas de *Micrococcus* (valor medio 0,53% de ácido oleico) y *Staphylococcus* (valor medio 0,54%), con muy ligeras variaciones entre las distintas cepas de cada género, aunque más evidentes en las especies de *Staphylococcus*.

En las figuras III.29 y III.30 se expresa gráficamente la actividad lipolítica de las cepas estudiadas.

En la tabla III.24 se recogen los resultados de la actividad lipolítica de las cepas de Micrococáceas estudiadas frente a la tributirina, pudiendo observar en ella que las cepas de *Staphylococcus* presentan un grado de lipólisis ligeramente superior al de las cepas de

Micrococcus, como lo demuestran la longitud de los radios formados en la hidrólisis de la tributirina.

III.5.3. Capacidad proteolítica

En la tabla III.25 figura la actividad proteolítica frente a la gelatina de las 24 cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas. Todas las cepas de *Staphylococcus* desarrollaron actividad proteolítica excepto la número 14 (*S. lentus*). En el caso del género *Micrococcus* las cepas números: 1 y 39 pertenecientes a la especie *M. lylae* y las 41, 52 y 58 a *M. roseus*, fueron positivas; las 7 restantes no desarrollaron proteólisis.

III.5.4. Efecto de la actividad de agua

En las tablas III.26 y III.27 se recoge el efecto del ClNa en el crecimiento de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas, respectivamente; los resultados obtenidos se expresan en términos de transmitancia. La mayoría de los micrococos presentan un mejor crecimiento en el medio sin sal que cuando el mismo tiene una concentración 0,5M; solamente 3 cepas, las números 2, 16 y 37 (*M. nishinomiyaensis*), ven favorecido su crecimiento a dicha molaridad. A niveles de 1,5 M cuatro cepas ven paralizado su desarrollo: las números 52 (*M. roseus*), 39 (*M. lylae*), 37 (*M. nishinomiyaensis*) y 41 (*M. roseus*).

Excepto las cepas números 1 (*M. lylae*) y 38 (*M. nishinomiyaensis*), todas las demás dejan de crecer a tasas de cloruro sódico 2,5 M y solamente la cepa 1 sigue siendo ligeramente activa a 3 M y 4,5 M.

En el caso de los estafilococos siete cepas muestran un mejor crecimiento al añadir cloruro sódico al medio hasta una concentración 0,5 M. A niveles 1,5 M, solamente dos cepas, las números 23 (*S. equorum*) y la 27 (*S. saprophyticus*) no mostraron crecimiento. A las concentraciones 3 M y 4,5 M solamente mostró crecimiento la cepa número 3 (*S. sciuri*).

Al comparar el comportamiento entre ambos géneros se observa un mejor crecimiento en presencia de sal de los estafilococos que de los micrococos a las concentraciones 0,5, 1,5 y 2,5 M.

En la figura III.31 se recoge gráficamente los valores medios del efecto del ClNa en el crecimiento de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

En la tabla III.28 y en la figura III.32 se recoge la a_w mínima de crecimiento de las 24 cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas.

III.5.5. Reducción de nitratos a nitritos

Según lo indicado en el apartado II.5.4.3 en primer lugar se determinó cualitativamente la reducción de nitratos a nitritos mediante el test incorporado en la galería de identificación ATB 32 STAPH. En ellas se observó, que en las cepas con alto grado de identificación pertenecientes al género *Micrococcus*, 15 resultaron no reductoras lo que representa el 23,44%; del género *Staphylococcus*, 12 no reducían los nitratos lo que equivale a un 8,63%.

En cuanto a las cepas con bajo % de identificación, 5 del género *Micrococcus* (21,74%) no presentaban esta propiedad, así como 3 cepas del género *Staphylococcus* (10,34%).

La determinación cuantitativa se llevó a cabo según lo descrito en Material y Métodos, quedando reflejados los resultados en las tablas III.29 y III.30 en las que aparecen las cantidades de nitrito generadas por las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* a partir de las 500 y 200 ppm de nitrato adicionado. Cuando se adicionaron 500 ppm al medio, solamente 1 cepa de *Micrococcus* la número 41 (*M. roseus*) fue capaz de liberar más de 20 ppm de nitrito, 7 más de 10 ppm y 3 cantidades inferiores a 7 ppm. La cepa nº 16 (*M. nishinomiyaensis*), dio lugar a niveles inferiores a 1 ppm, por lo que consideramos que no reduce los nitratos.

En el caso de *Staphylococcus* 7 cepas dieron lugar a cantidades de nitritos superiores a 10 ppm, generando el resto de las cepas menos de 7 ppm.

Cuando en el medio existía una concentración de 200 ppm de nitrato, 13 de las 24 cepas de micrococáceas estudiadas liberaron menos de 1 ppm, el resto lo hizo en niveles inferiores a 7,5 ppm.

III.5.6. Capacidad inhibidora del nitrito sobre el crecimiento bacteriano

En las tablas III.31 y III.32 se recoge la capacidad inhibidora sobre el crecimiento microbiano de diferentes concentraciones de nitrito sódico (0, 50, 100, 150 y 200 ppm). En el caso de las especies de *Micrococcus* todas crecieron normalmente hasta una concentración de

150 ppm; a 200 ppm solamente vio inhibido su crecimiento de una manera importante 80% - aproximadamente- la cepa nº 72 (*M. varians*), aunque también otras cepas vieron frenado su crecimiento pero de manera menos significativa, entre un 10-15%.

Los estafilococos tuvieron un comportamiento similar al de los micrococos y únicamente concentraciones de 200 ppm inhibieron el crecimiento microbiano en niveles del 20-30%, aproximadamente, en cuatro cepas.

La figura III.33 recoge la influencia de la presencia del nitrito en el crecimiento de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

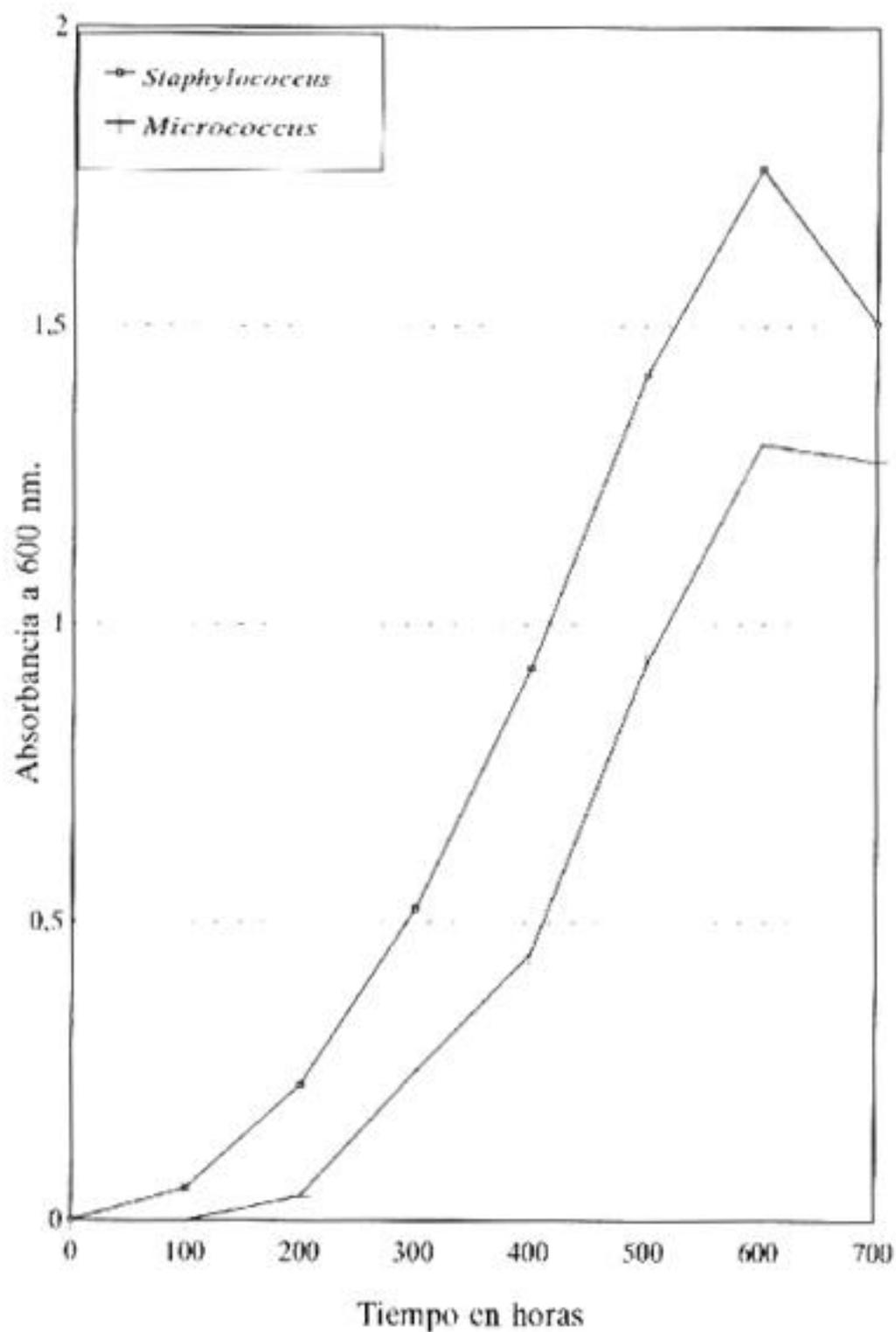


Figura III.11. Curvas de crecimiento medio de las cepas de *Staphylococcus* y *Micrococcus* a 4°C

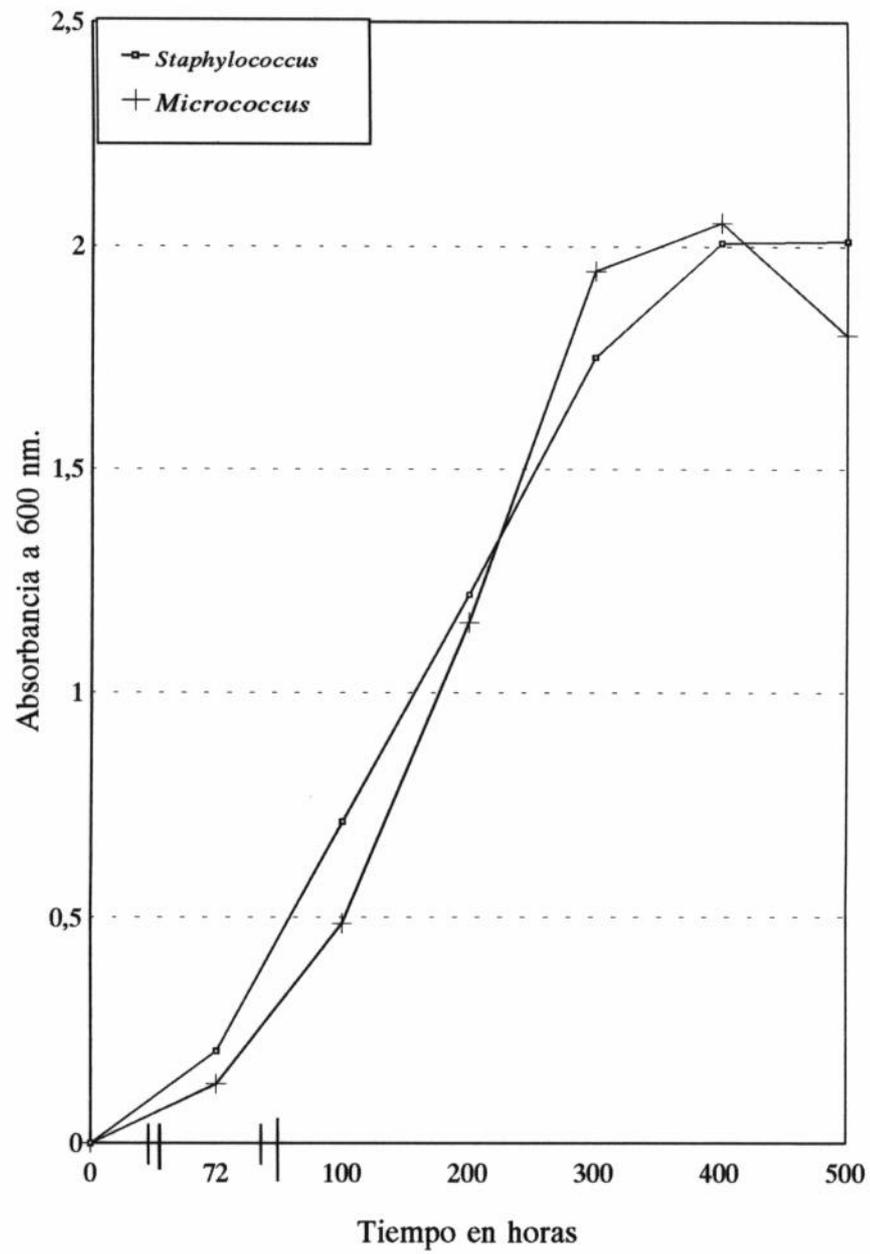


Figura III.13. Curvas de crecimiento medio de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* a 20°C

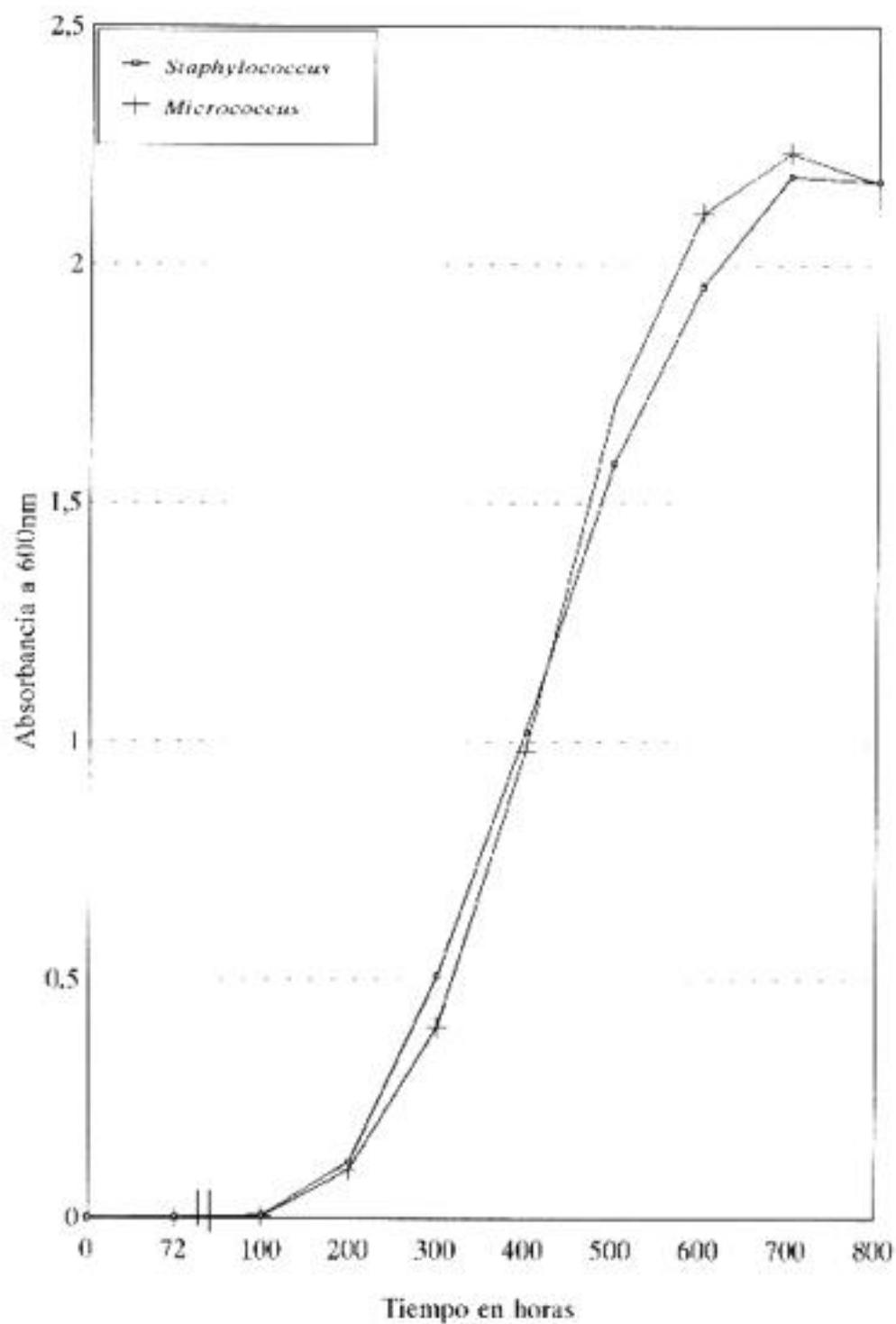


Figura III.12. Curvas de crecimiento medio de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* a 11°C.

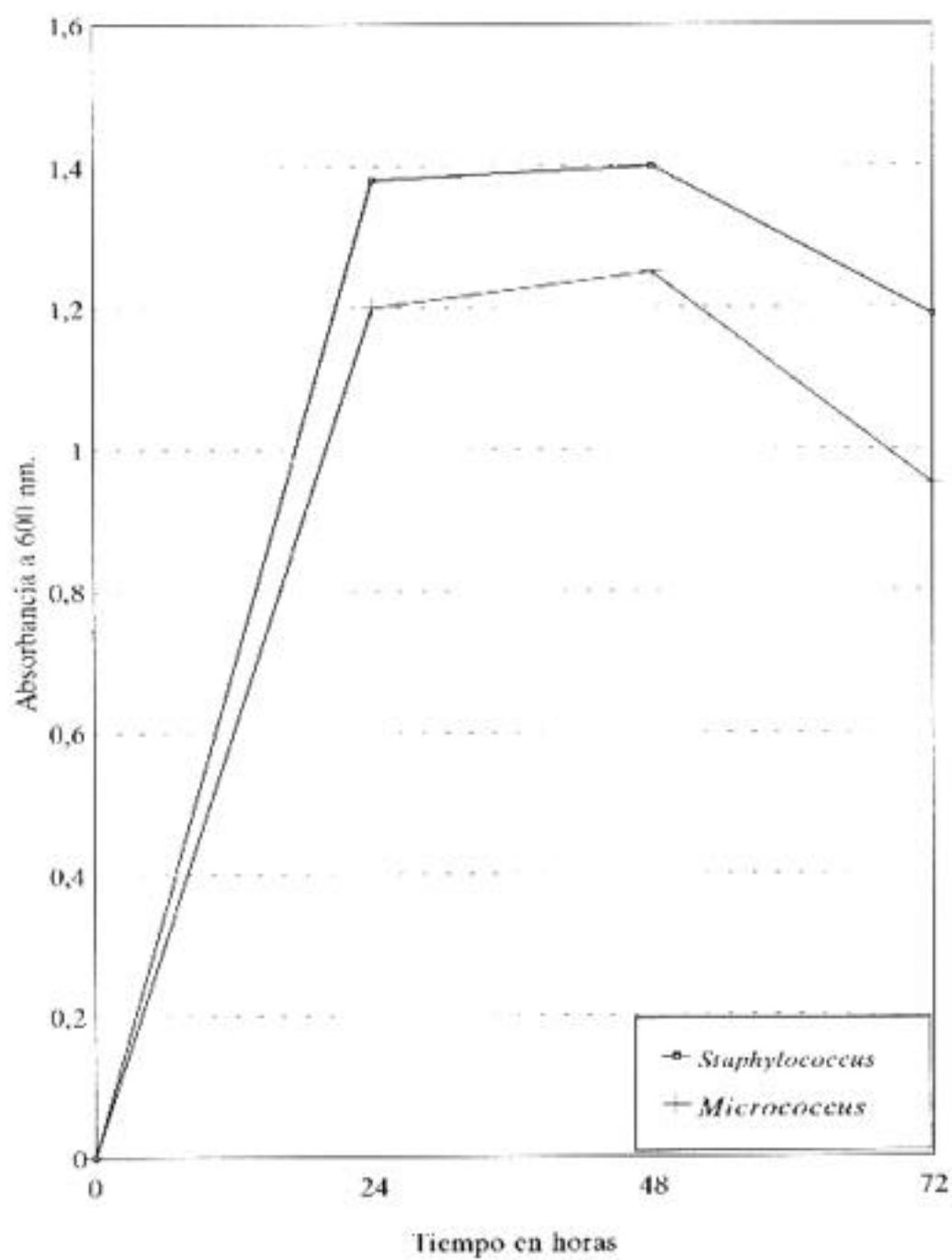


Figura III.14. Curvas de crecimiento medio de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* a 25°C

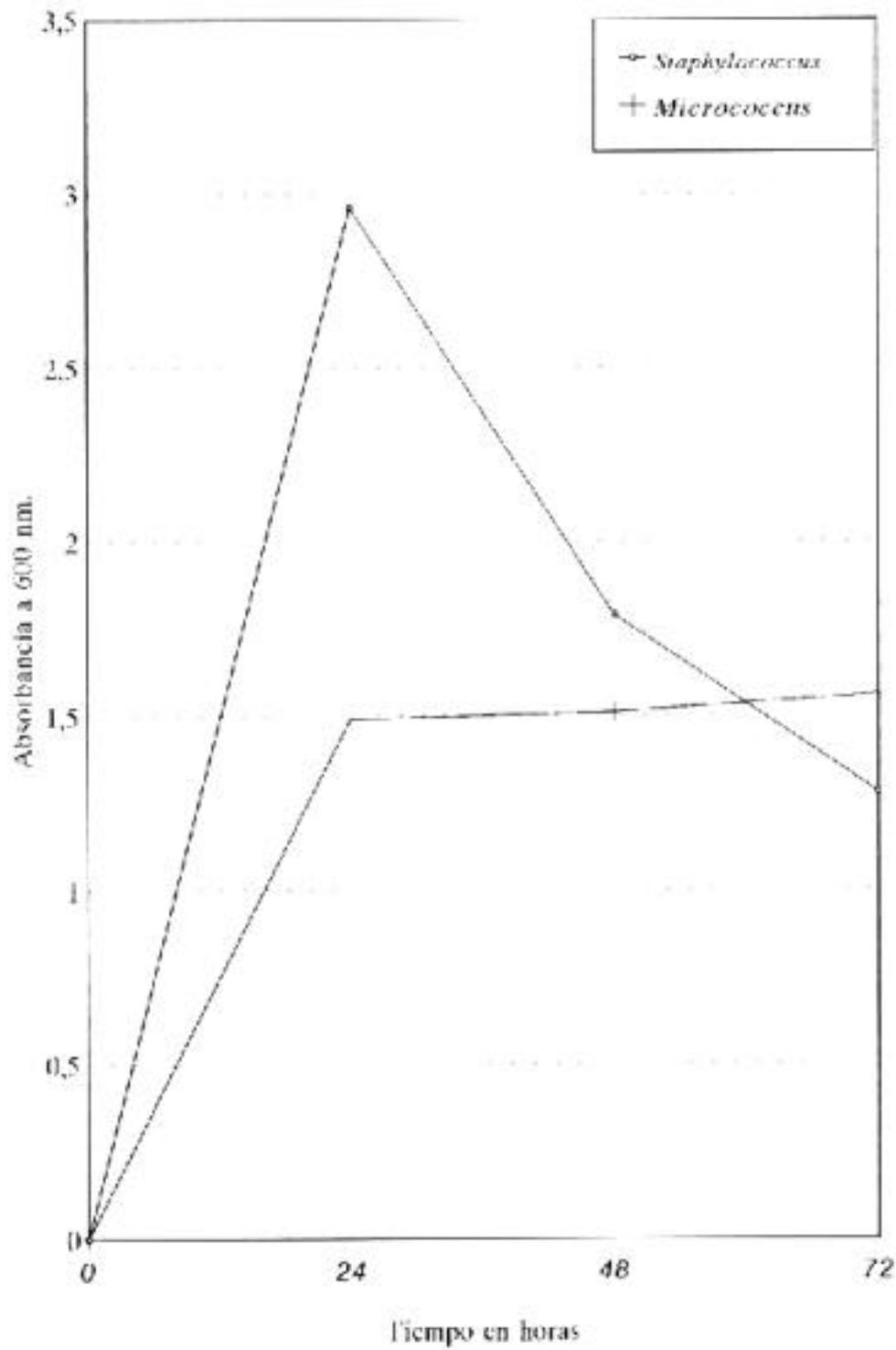


Figura III.15. Curvas de crecimiento medio de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* a 32°C

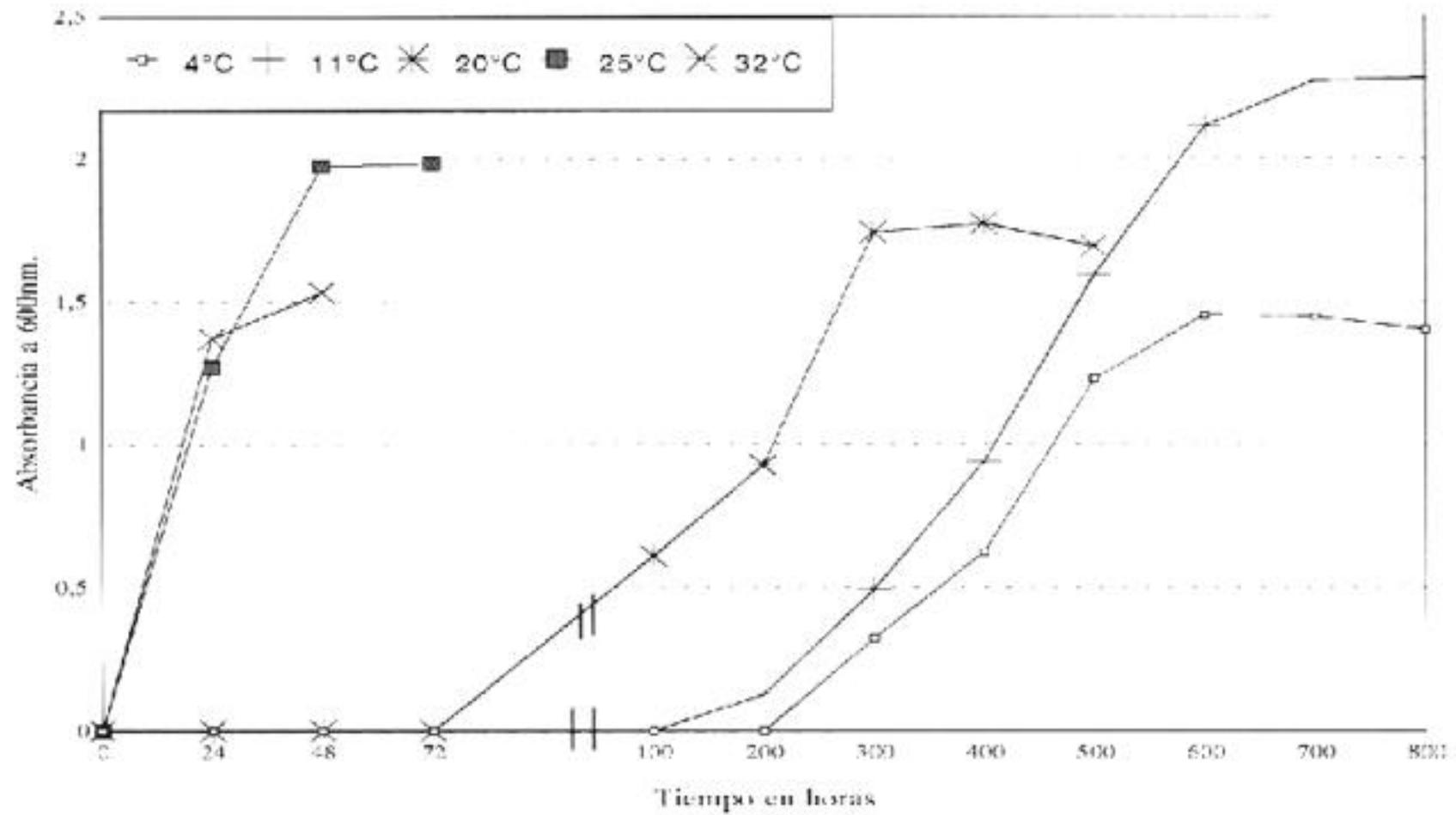


Figura III.16. Curvas de crecimiento de la cepa 1 (*M. lylae*)

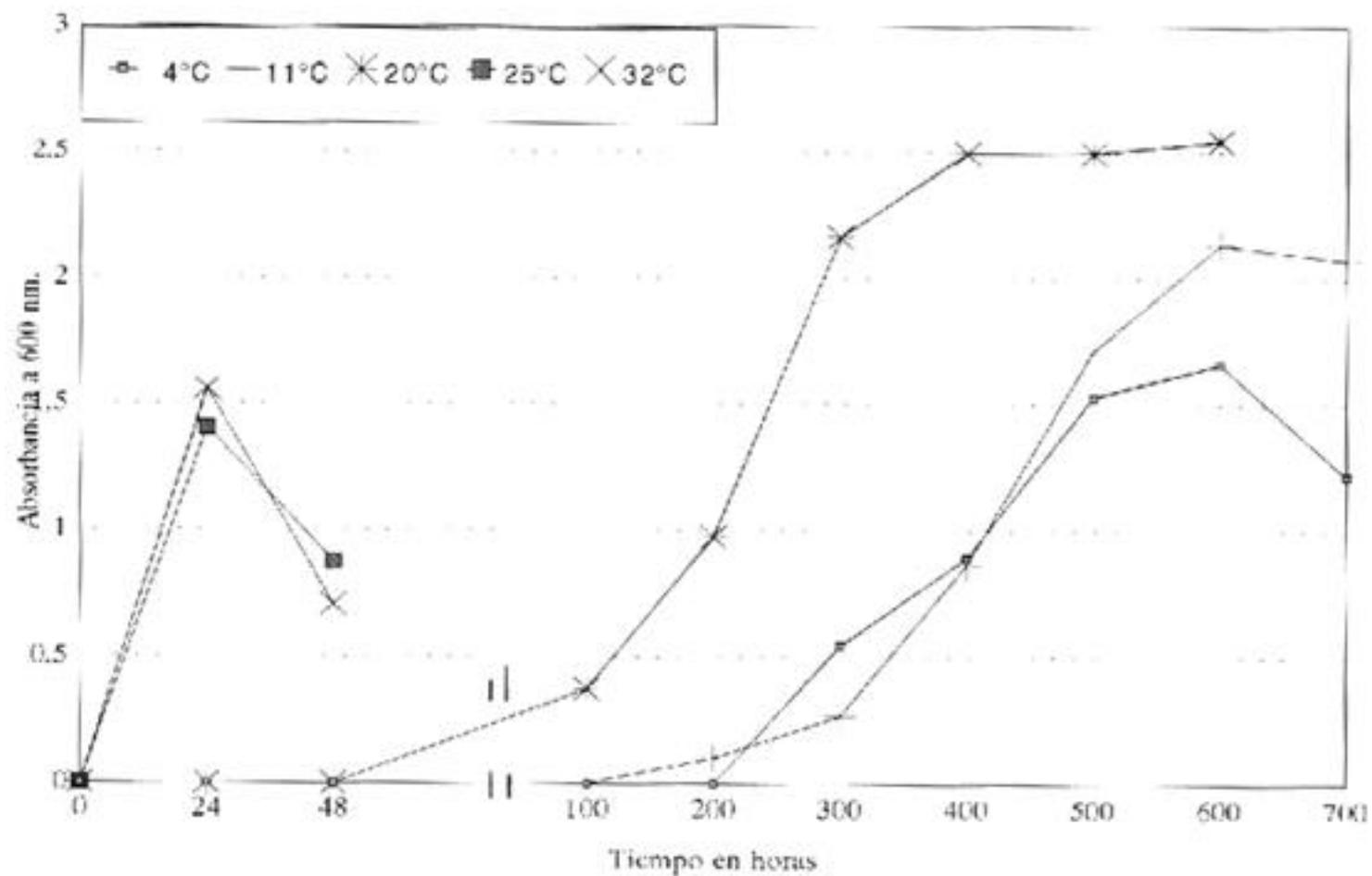


Figura III.17. Curvas de crecimiento de la cepa 37 (*M.nishinomiyaensis*)

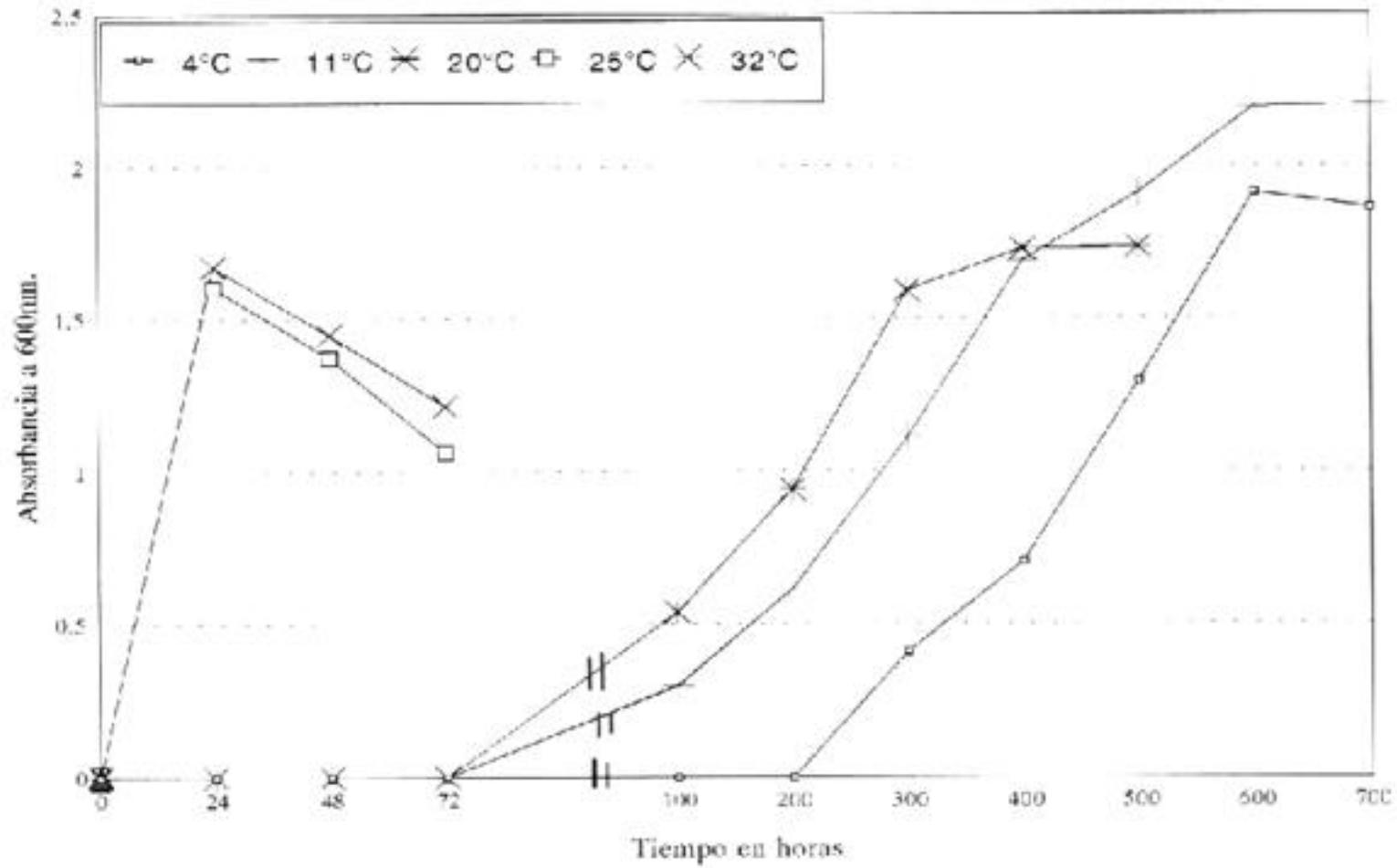


Figura III.18. Curvas de crecimiento de la cepa 65 (*S.xylosus*)

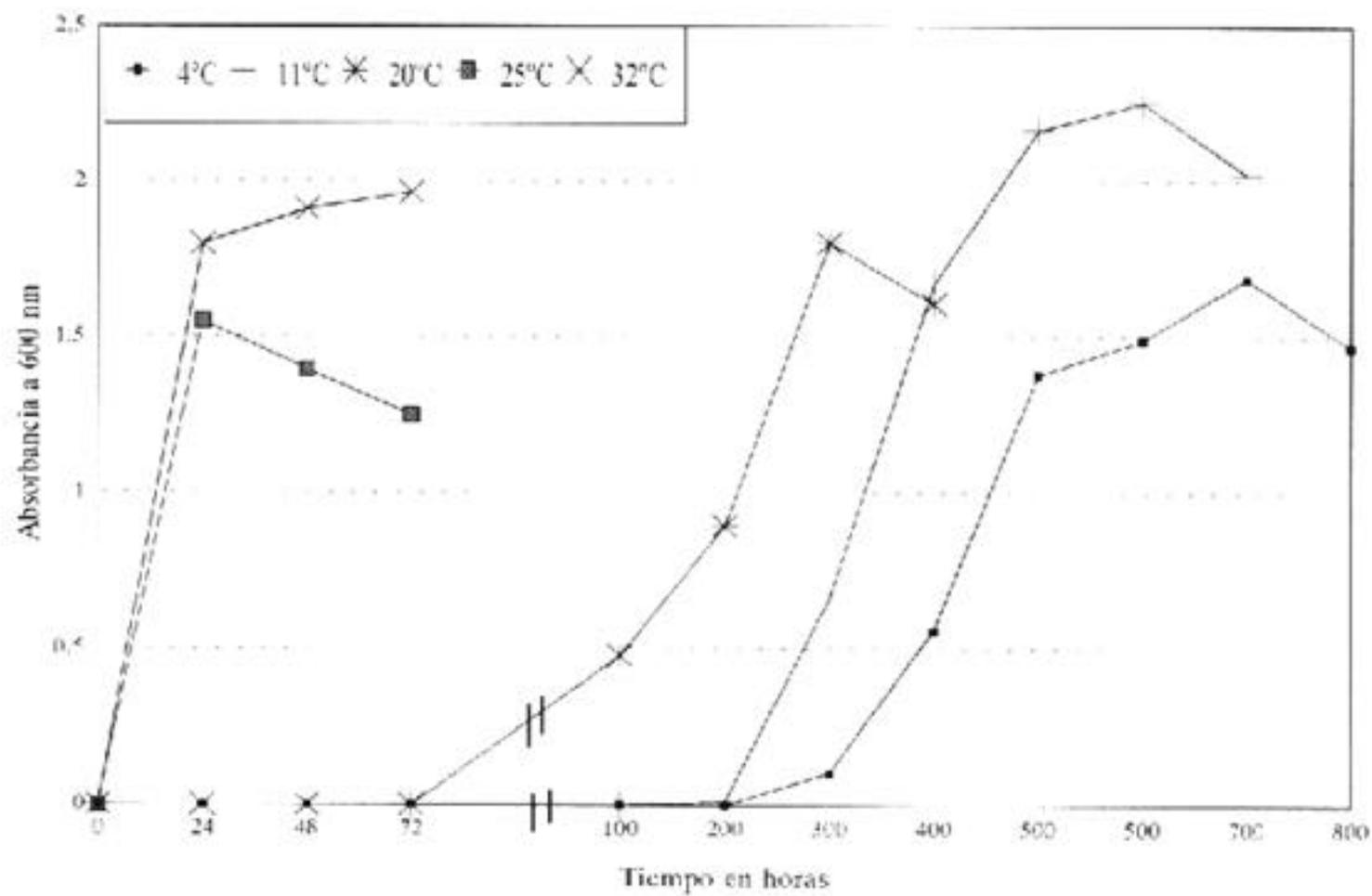


Figura III.19. Curvas de crecimiento de la cepa 20 (*S. equorum*)

CEPAS	32°C	25°C	20°C	11°C	4°C
1	7	24	71	245	532
2	8	17	42	172	228
16	2	3	57	183	241
17	2	3	100	228	308
33	3	3	95	243	294
37	2	4	56	100	110
38	7	8	100	148	152
39	8	16	80	152	600
41	2	2	70	101	286
52	1	3	52	100	295
58	1	3	40	146	297
72	5	11	100	243	295
X	4,00	8,08	71,92	171,75	303,16
D.T.	2,67	6,99	21,89	54,56	133,51

Tabla III.16. Fase de latencia de las cepas de *Micrococcus*, expresada en horas

CEPAS	32°C	25°C	20°C	11°C	4°C
3	1	2	100	189	253
4	2	2	48	100	200
7	3	3	59	134	202
14	3	4	25	193	267
20	3	5	50	290	278
54	1	2	14	202	319
65	4	4	100	201	400
23	1	5	20	211	263
27	2	5	60	194	221
42	1	2	65	209	289
63	2	2	21	175	287
29	1	1	50	157	201
X	2	3	51	187,91	265
D.T.	1	1,38	27,47	44,33	55,33

Tablas III.17. Fase latencia de las cepas de Staphylococcus, expresada en horas

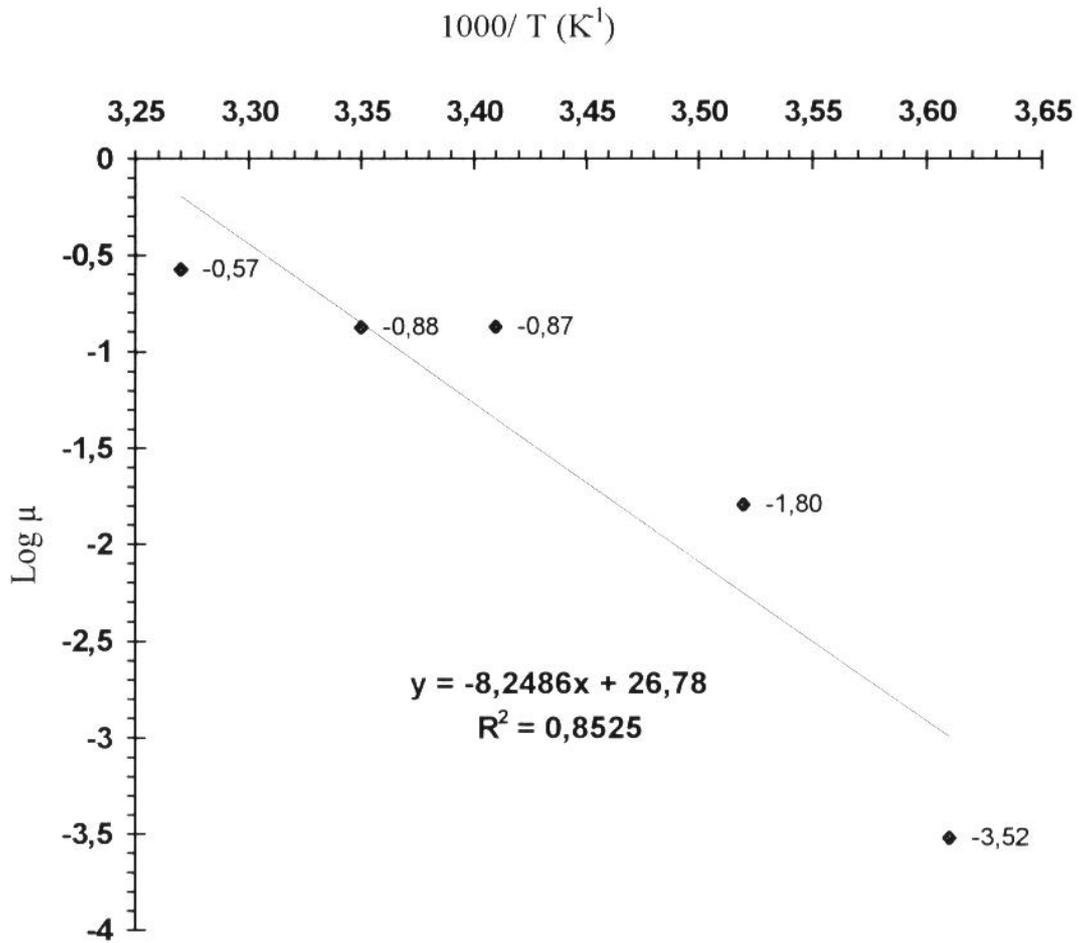


Figura III.20. Representación de Arrhenius de la relación entre la constante de la velocidad de crecimiento y la temperatura absoluta de la cepa I (*M. lylae*)

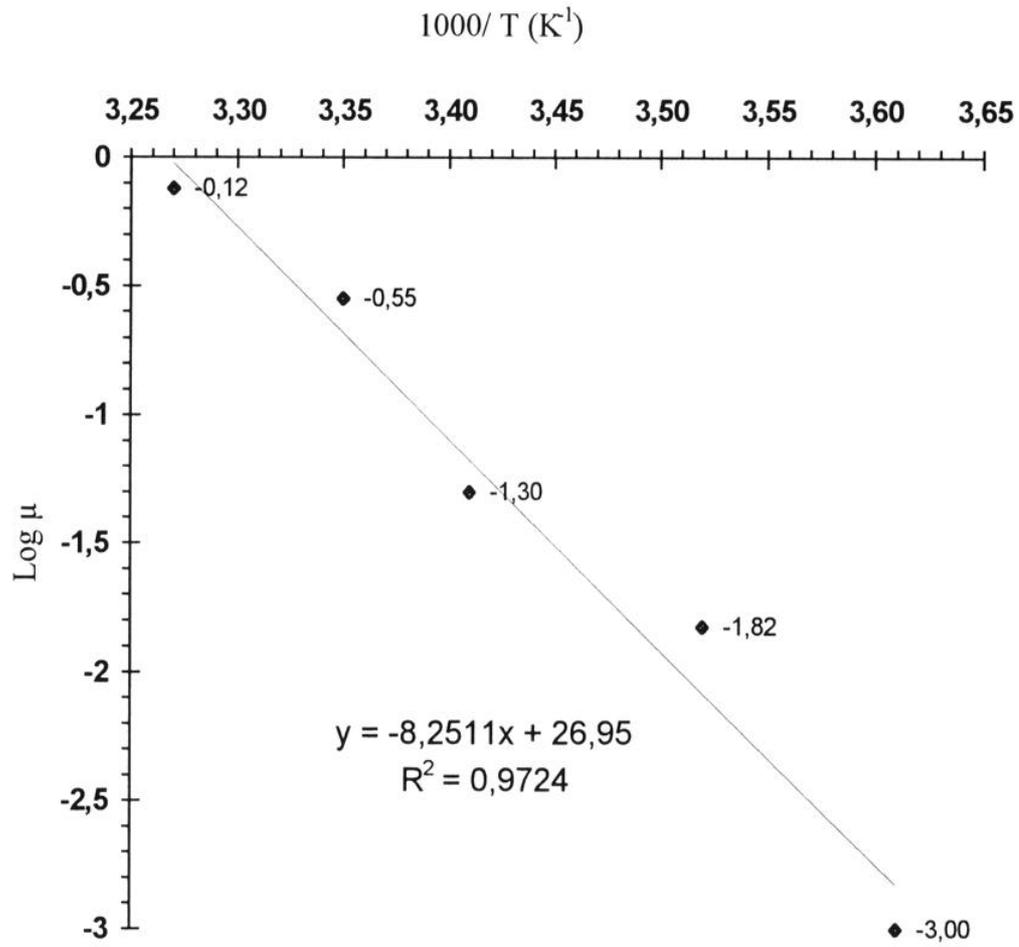


Figura III.21. Representación de Arrhenius de la relación entre la constante de la velocidad de crecimiento y la temperatura absoluta de la cepa 17 (*M. nishinomiyaensis*)

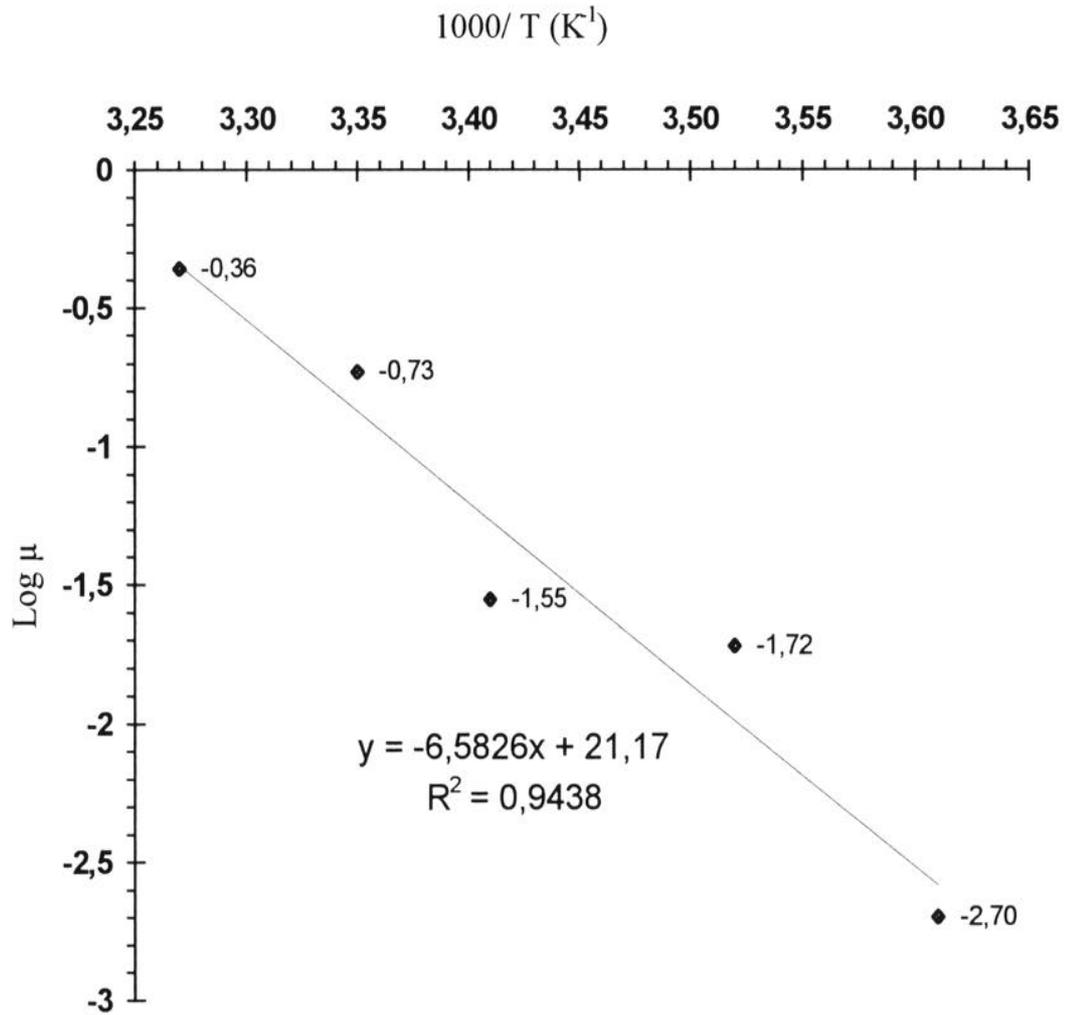


Figura III.22. Representación de Arrhenius de la relación entre la constante de la velocidad de crecimiento y la temperatura absoluta de la cepa 20 (*S. equorum*).

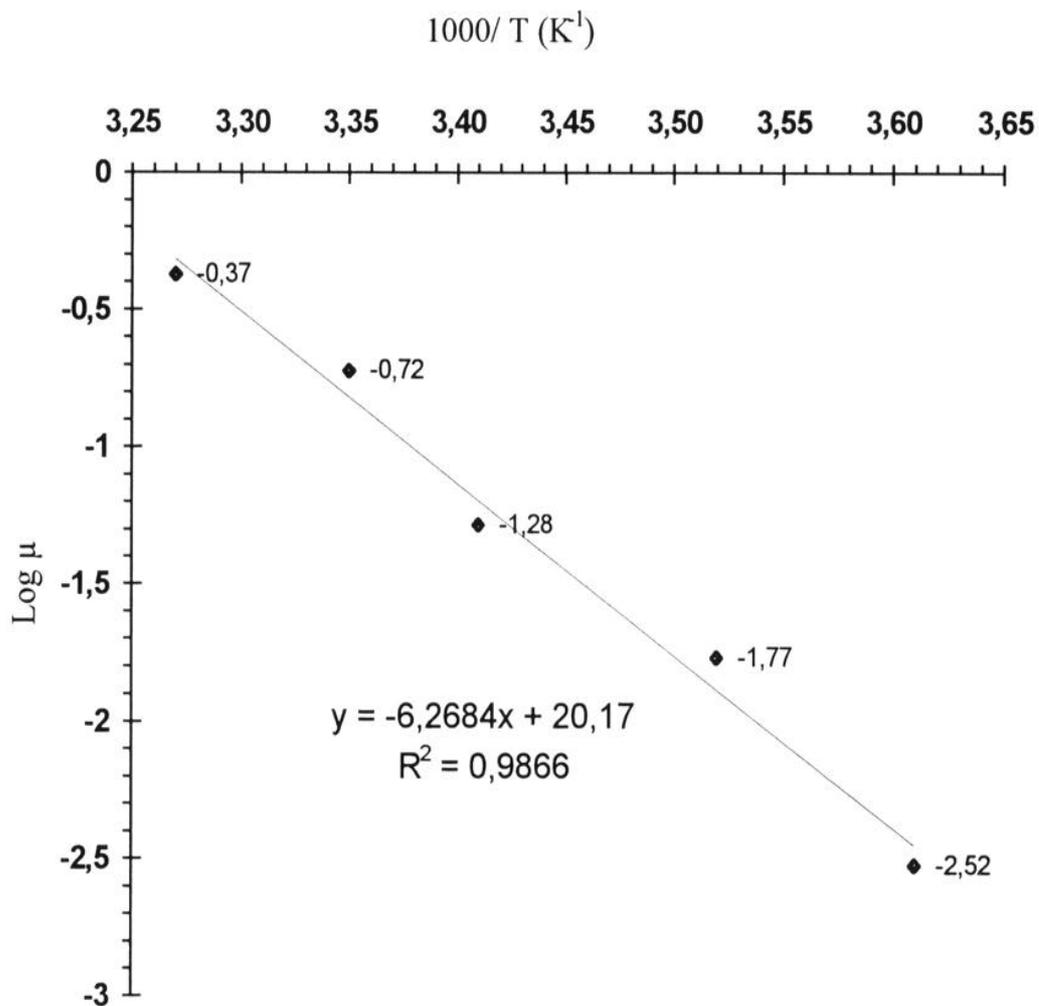


Figura III.23. Representación de Arrhenius de la relación entre la constante de la velocidad de crecimiento y la temperatura absoluta de la cepa 65 (*S. xylosus*).

Micrococcus	Energía de activación	Staphylococcus	Energía de activación
1	68,26	3	45,47
2	34,91	4	44,01
16	37,65	7	43,76
17	68,28	14	41,25
52	40,30	20	46,27
58	61,24	54	42,78
72	56,19	65	45,23
39	46,49	23	54,48
37	53,96	27	48,66
38	53,79	42	57,09
33	61,67	63	51,01
41	56,92	29	51,64
X	53,30		47,63
D.T-	10,08		4,73

Tabla III.18. Energía de activación de las cepas de Micrococcus y Staphylococcus, expresada en $E_a \times 1000$ (julios/mol)

CEPAS	4° C	11°C	20°C	25°C	32°C
1	0,0003	0,016	0,134	0,133	0,267
2	0,007	0,017	0,061	0,109	0,288
16	0,002	0,015	0,032	0,184	0,257
17	0,001	0,015	0,050	0,283	0,757
33	0,001	0,016	0,055	0,246	0,545
37	0,001	0,014	0,039	0,134	0,329
38	0,002	0,017	0,038	0,182	0,409
39	0,001	0,011	0,061	0,109	0,288
41	0,002	0,012	0,051	0,103	0,331
52	0,002	0,016	0,055	0,122	0,325
58	0,001	0,014	0,039	0,134	0,329
72	0,001	0,015	0,038	0,111	0,218
X	0,002	0,016	0,054	0,159	0,354
D.T.	0,002	0,003	0,026	0,056	0,148

Tabla III.19. Constante de la velocidad de crecimiento (μ) de las cepas de *Micrococcus*, expresadas en horas⁻¹

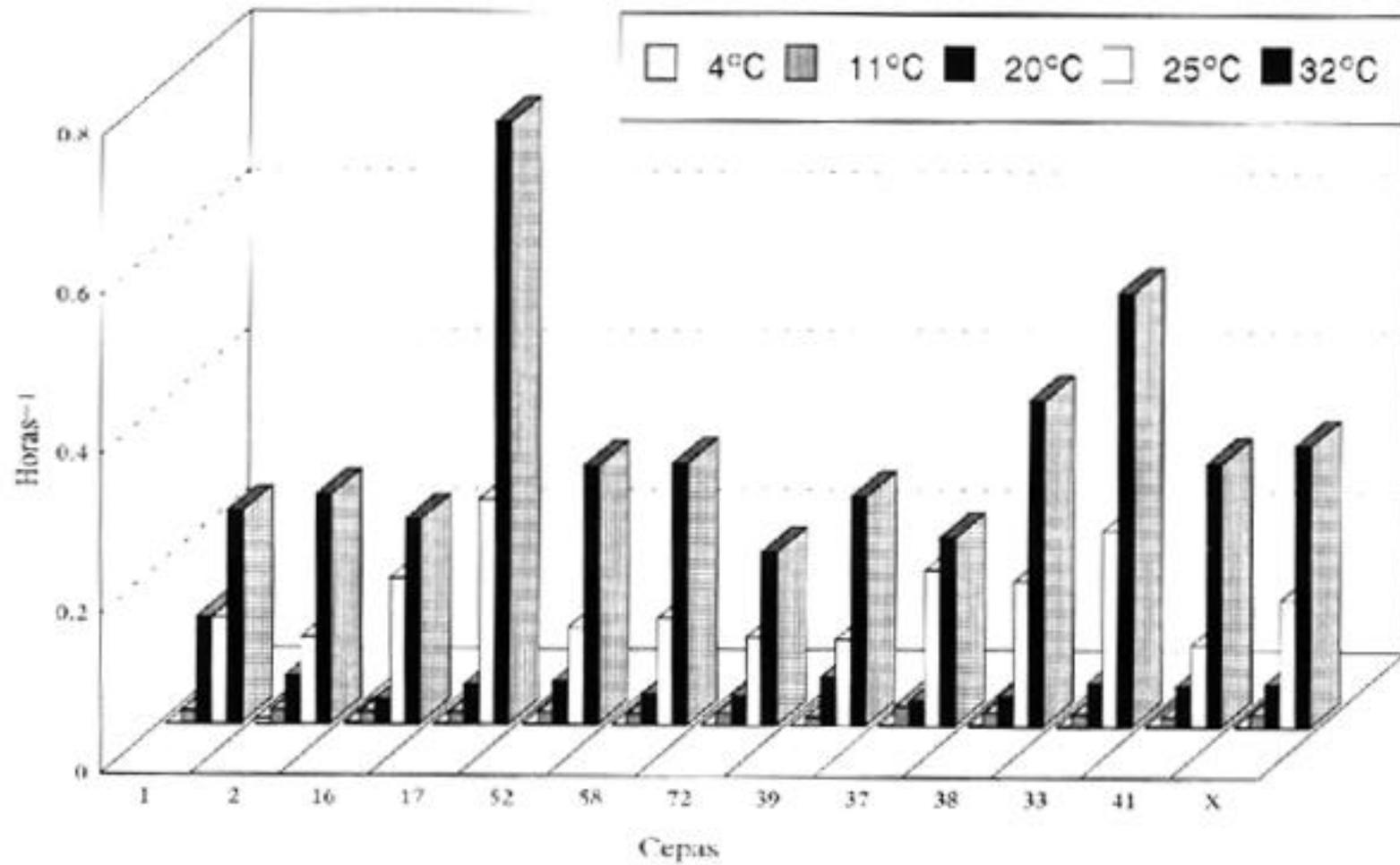


Figura III.24. Constante de la velocidad de crecimiento de las cepas de *Micrococcus*

CEPAS	4°C	11°C	20°C	25°C	32°C
1	2310	43,3	5,3	5,2	2,6
2	99,0	40,8	11,4	6,3	2,4
16	346,5	46,2	21,6	3,8	1,6
17	693,0	46,2	13,8	2,4	0,9
33	693,0	43,3	12,6	2,8	1,3
37	346,5	34,6	21,6	3,5	2,9
38	346,5	40,8	18,5	3,8	1,7
39	693,0	63,0	11,4	6,3	2,4
41	346,5	57,7	13,1	6,7	2,1
52	346,5	43,3	12,6	5,7	2,1
58	693,0	49,5	23,0	5,2	2,1
72	693,0	46,2	18,2	6,2	3,2
X	633,9	46,2	15,2	4,8	2,1
D.T.	542,00	7,36	5,08	1,43	0,063

Tabla III.20. Tiempo de generación de las cepas de *Micrococcus*, expresado en horas

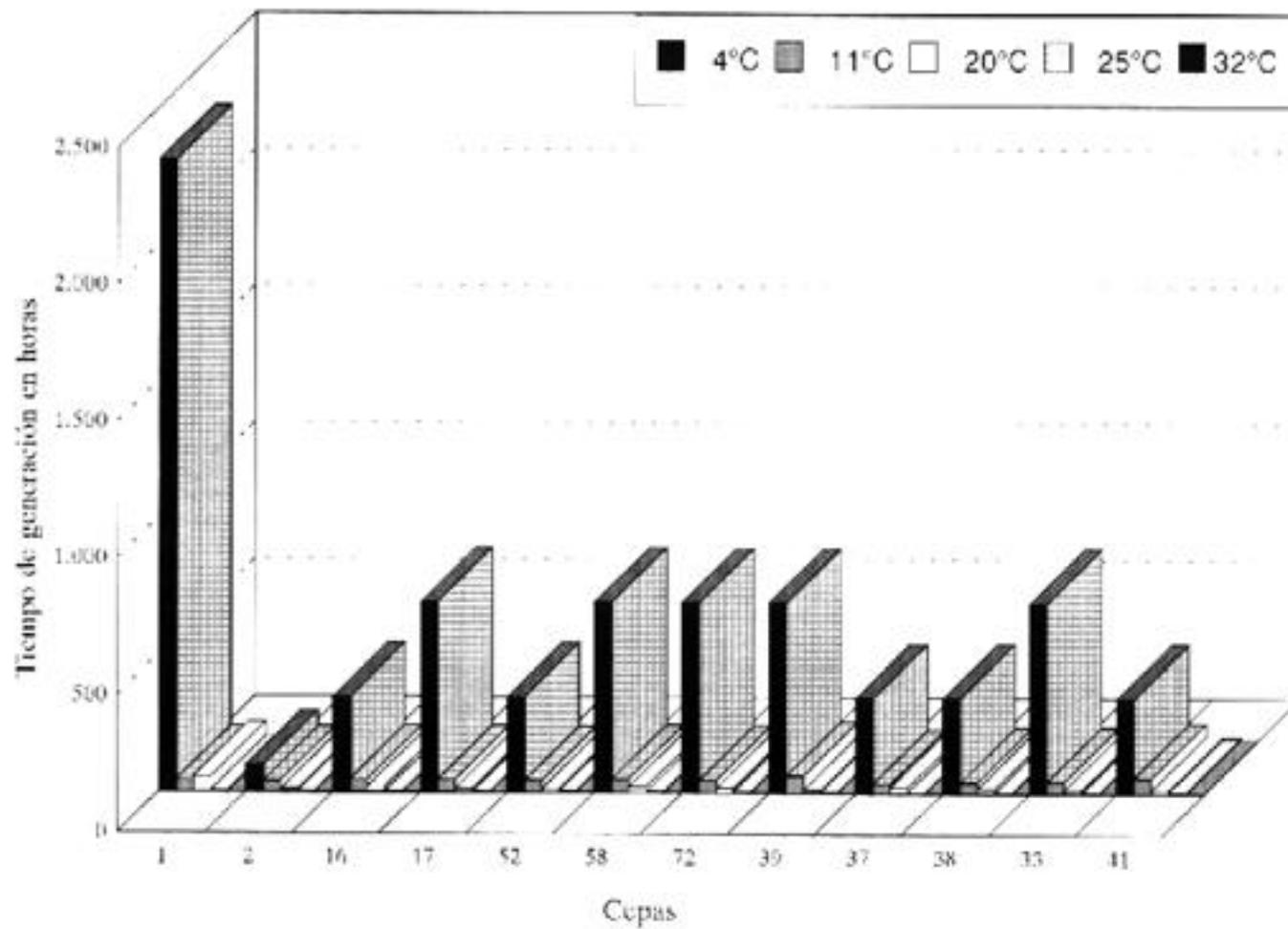


Figura III.25. Tiempo de generación de las cepas de *Micrococcus*

CEPAS	4° C	11°C	20°C	25°C	32°C
3	0,003	0,018	0,058	0,175	0,414
4	0,006	0,029	0,033	0,135	0,349
7	0,005	0,005	0,067	0,185	0,293
14	0,008	0,032	0,084	0,177	0,502
20	0,002	0,019	0,028	0,186	0,438
23	0,001	0,015	0,032	0,142	0,356
27	0,005	0,006	0,057	0,173	0,276
29	0,003	0,015	0,052	0,172	0,420
42	0,004	0,009	0,046	0,172	0,562
54	0,002	0,015	0,079	0,172	0,443
63	0,001	0,017	0,081	0,188	0,565
65	0,003	0,017	0,052	0,189	0,424
X	0,004	0,016	0,055	0,173	0,420
D.T.	0,002	0,001	0,021	0,020	0,087

Tabla III.21. Constante de la velocidad de crecimiento (μ) de las cepas de *Staphylococcus*, expresada en horas⁻¹

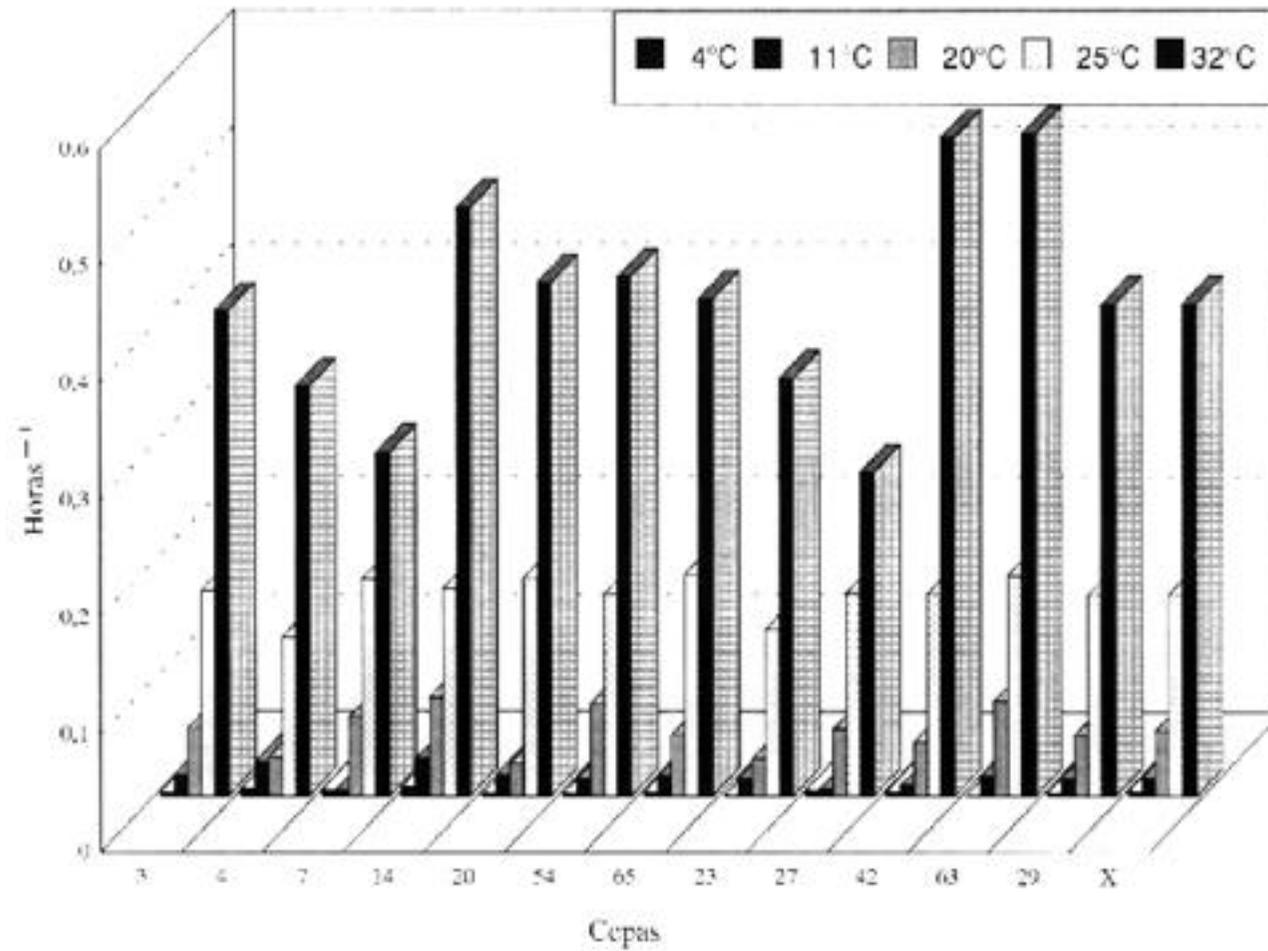


Figura III.26. Constante de velocidad de crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*

CEPAS	4° C	11°C	20°C	25°C	32°C
3	231,0	68,6	28,4	7,3	3,5
4	115,5	23,1	21,4	5,1	2,3
7	138,6	138,6	10,3	3,7	1,3
14	86,6	21,6	8,2	3,9	1,4
20	346,5	36,5	24,7	3,7	1,6
23	693,0	46,2	21,6	4,8	1,9
27	153,3	115,5	12,5	4,4	2,5
29	231,0	46,2	13,3	4,0	1,6
42	173,3	77,5	15,1	4,7	1,2
54	346,5	46,2	8,7	4,9	1,6
63	693,0	40,7	8,6	3,7	1,2
65	231,0	40,7	13,3	3,7	1,6
X	286,6	58,4	15,5	4,4	1,8
D.T.	197,60	34,53	6,56	0,99	0,64

Tabla III.22. Tiempo de generación de las cepas de *Staphylococcus*, expresado en horas

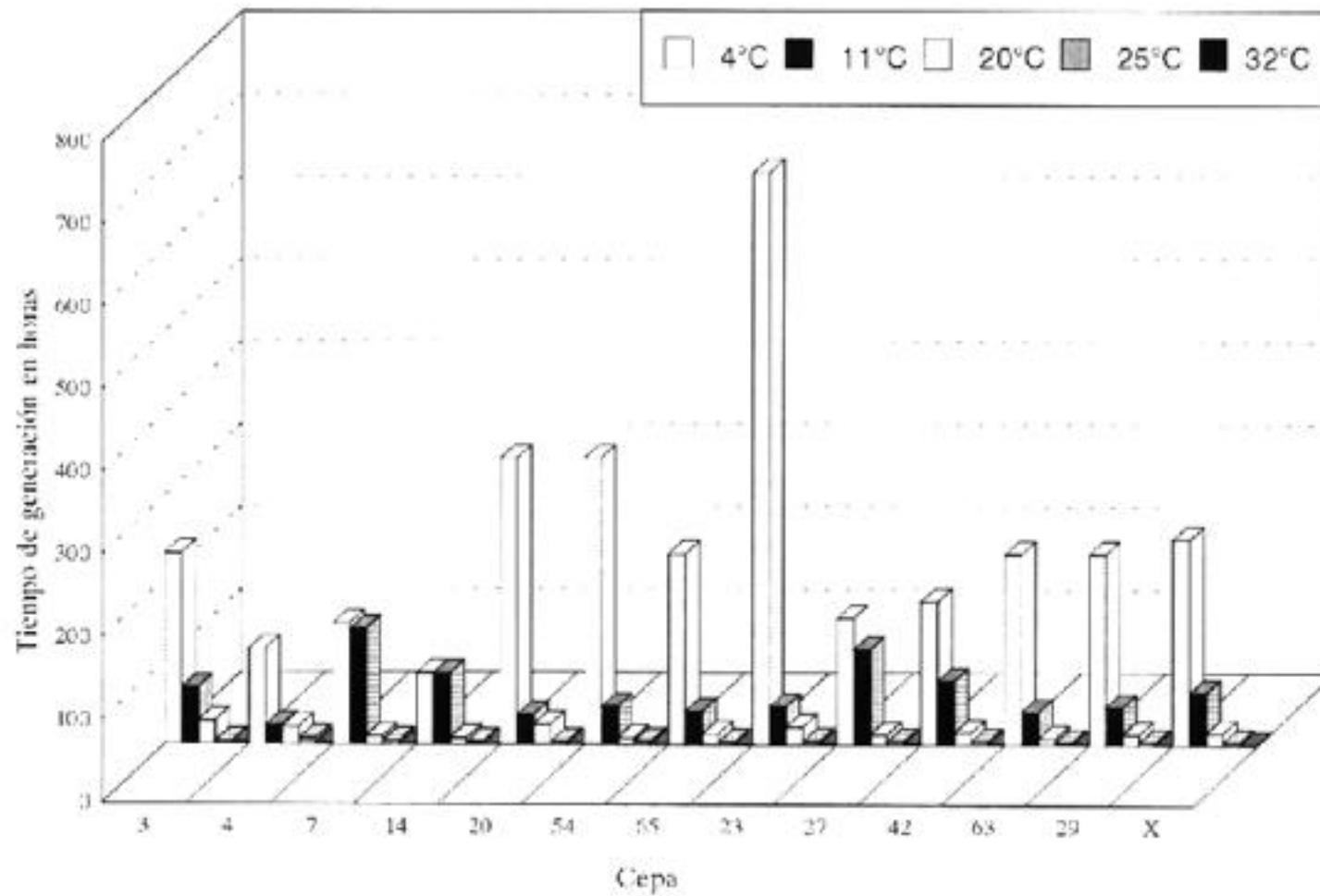


Figura III.27. Tiempo de generación de las cepas de *Staphylococcus*

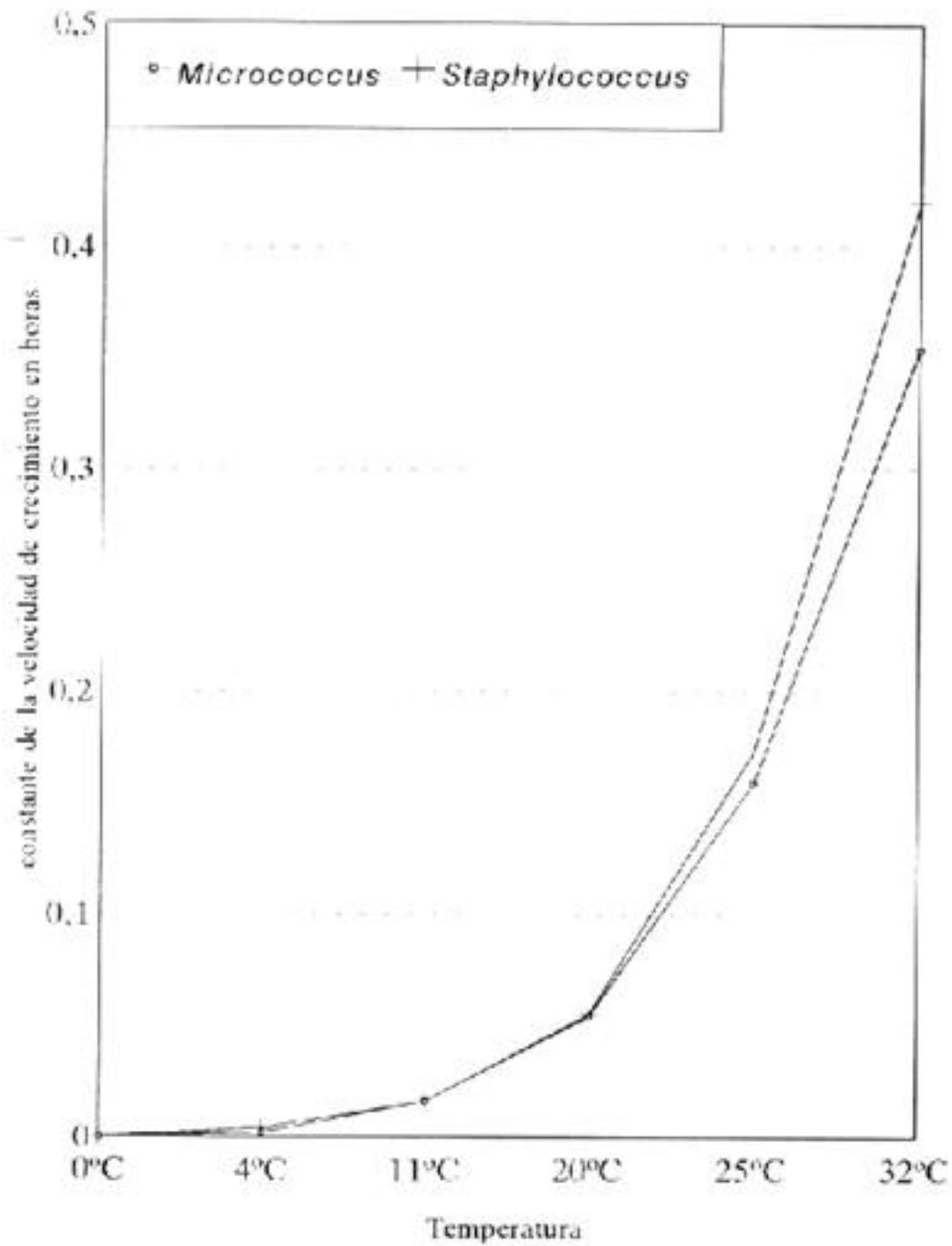


Figura III.28. Valores medios de la constante de la velocidad de crecimiento de *Micrococcus* y *Staphylococcus*

Micrococcus		Staphylococcus	
1	0,48	3	0,39
2	0,43	4	0,68
16	0,59	7	0,56
17	0,60	14	0,46
33	0,69	20	0,59
37	0,46	23	0,42
38	0,49	27	0,40
39	0,51	29	0,44
41	0,52	42	0,67
52	0,47	54	0,73
58	0,48	63	0,73
72	0,59	65	0,41
X	0,53		0,54
D.T-	0,071		0,134

Tabla III.23. Capacidad lipolítica sobre tocino dorsal de cerdo de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* expresada en % de ácido oleico/100 g de grasa

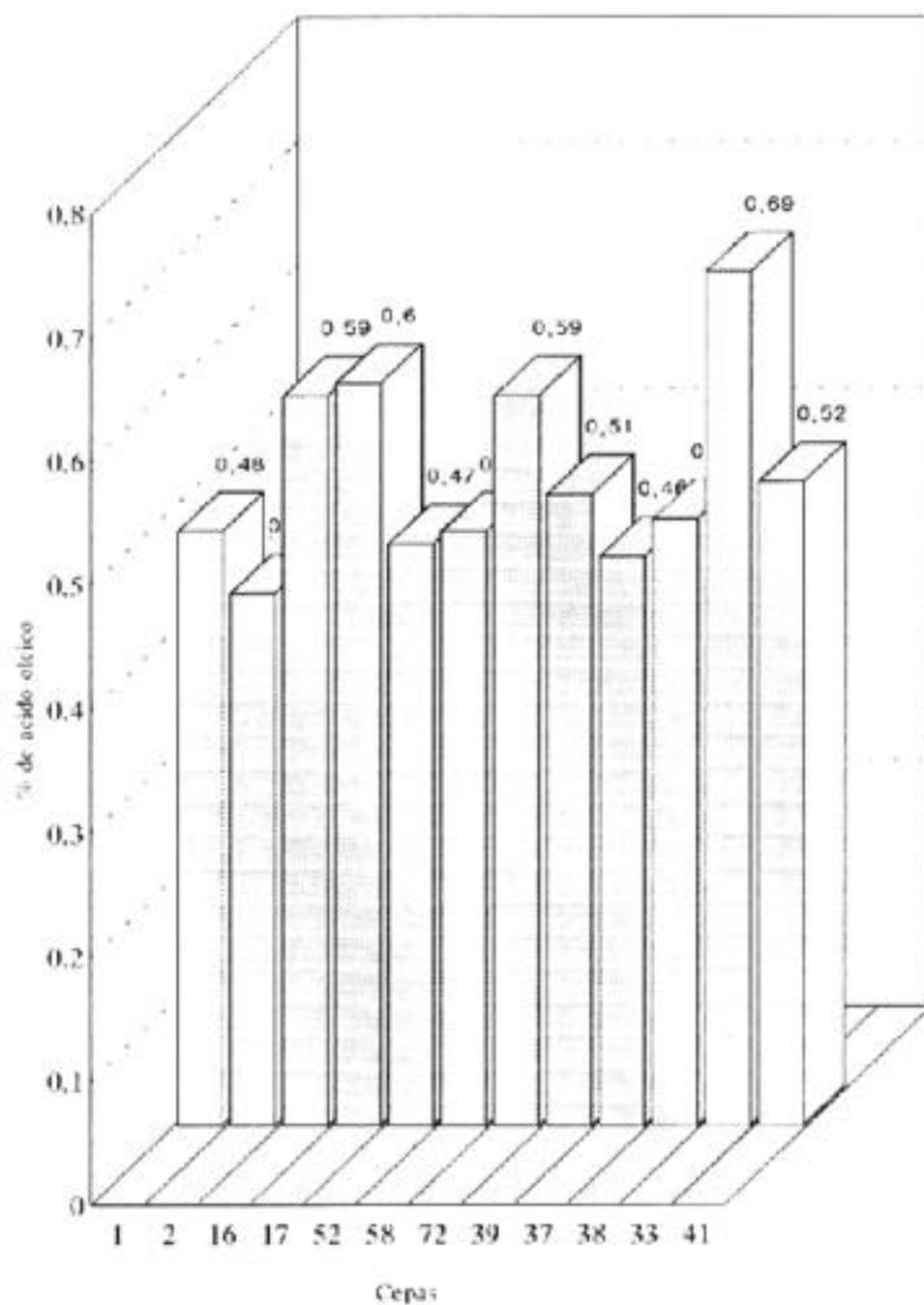


Figura III.29. Capacidad lipolítica de las cepas de *Micrococcus*

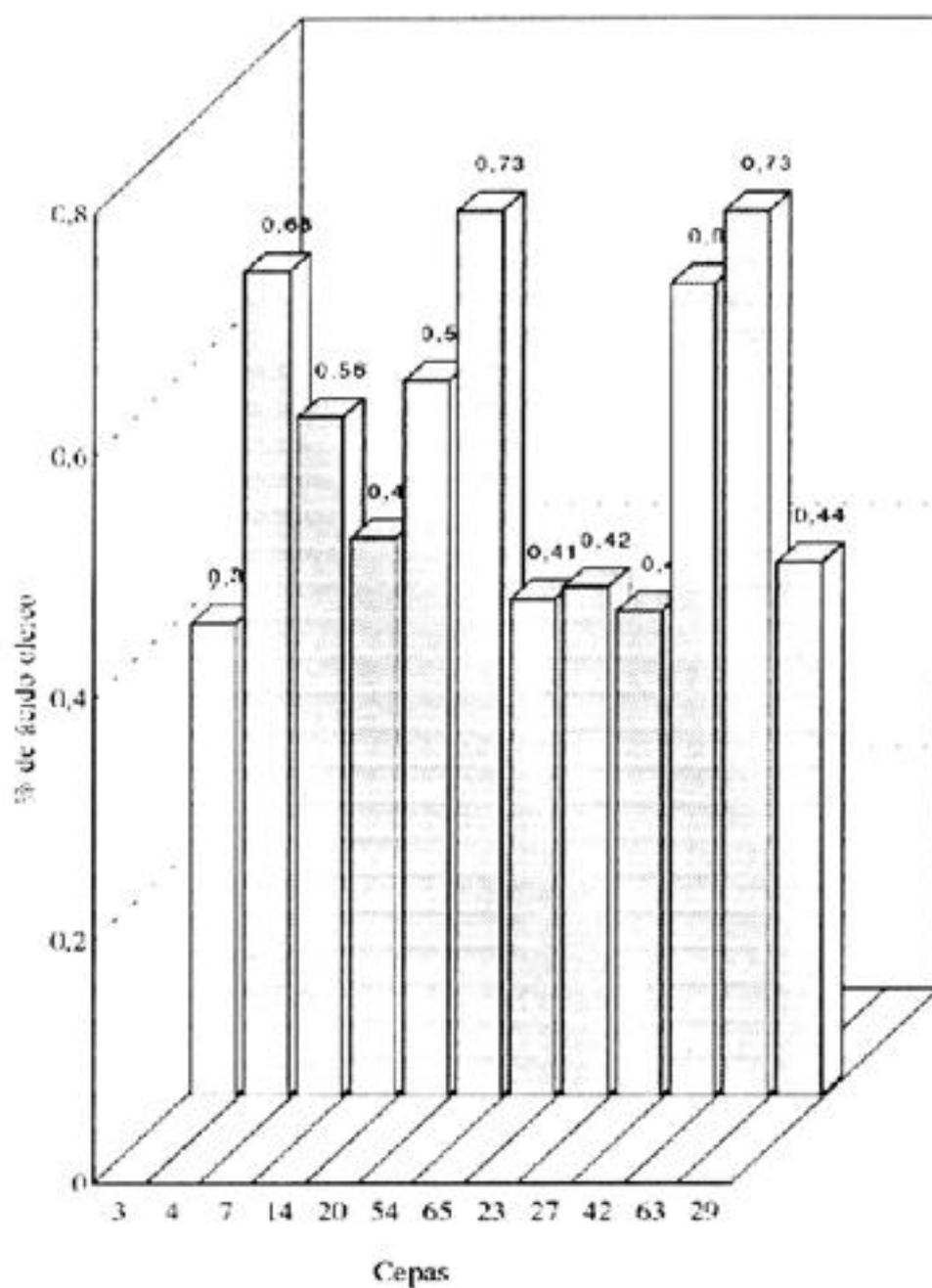


Figura III.30. Capacidad lipolítica de las cepas de *Staphylococcus*

Micrococcus		Staphylococcus	
1	4	3	2
2	4	4	5
16	2	7	4
17	4	14	---
33	2	20	4
37	4	23	5
38	2	27	4
39	5	29	5
41	2	42	5
52	2	54	4
58	2	63	5
72	4	65	4

Tabla III.24. Actividad lipolítica de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* frente a la tributirina, expresada como el radio en mm de la zona hidrolizada

Micrococcus	Hidrólisis de la gelatina	Staphylococcus	Hidrólisis de la gelatina
1	3	3	2
2	---	4	2
16	---	7	3
17	---	14	---
33	---	20	2
37	---	23	2
38	---	27	3
39	2	29	2
41	2	42	3
52	3	54	3
58	3	63	3
72	---	65	2

Tabla III.25. Actividad proteolítica de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* frente a la gelatina, expresada como el radio en mm de la zona hidrolizada

CEPAS	0 M	0,5 M	1,5 M	2,5 M	3 M	4,5 M
1	12,3	12,9	55,2	94,8	92,5	95,6
2	6,8	2,3	66,4	100,0	100,0	100,0
16	10,1	8,9	52,4	100,0	100,0	100,0
17	7,7	32,4	60,7	100,0	100,0	100,0
33	3,6	11,8	96,4	100,0	100,0	100,0
37	6,8	3,9	100,0	100,0	100,0	100,0
38	4,9	19,2	86,5	90,20	100,0	100,0
39	6,7	7,7	100,0	100,0	100,0	100,0
41	24,2	46,3	100,0	100,0	100,0	100,0
52	6,3	12,3	100,0	100,0	100,0	100,0
58	36,2	49,0	62,8	100,0	100,0	100,0
72	12,9	15,1	93,3	100,0	100,0	100,0
X	11,5	18,5	81,4	98,7	99,4	99,6
D.T.	9,08	15,02	18,93	2,95	2,07	1,21

Tabla III.26. Valores de transmitancia obtenidos al estudiar la influencia del CINA en el crecimiento de las cepas de *Micrococcus*

CEPAS	0 M	0,5 M	1,5 M	2,5 M	3 M	4,5 M
3	41,8	19,5	53,4	98,0	99,2	98,7
4	2,4	1,3	45,9	91,0	100,0	100,0
7	6,9	10,4	61,6	90,6	100,0	100,0
14	32,2	25,8	55,0	100,0	100,0	100,0
20	11,3	27,2	56,4	100,0	100,0	100,0
23	7,7	2,0	100,0	100,0	100,0	100,0
27	3,8	2,02	100,0	100,0	100,0	100,0
29	11,7	13,7	88,2	92,2	100,0	100,0
42	6,3	4,0	73,7	88,6	100,0	100,0
54	4,5	23,2	56,4	100,0	100,0	100,0
63	19,2	6,2	86,1	96,2	100,0	100,0
65	8,27	33,2	66,2	100,0	100,0	100,0
X	13,0	14,0	70,2	96,4	99,9	99,9
D.T.	11,7	10,88	18,12	4,29	0,22	0,36

Tabla III.27. Valores de transmitancia obtenidos al estudiar la influencia del CINa en el crecimiento de las cepas de Staphylococcus

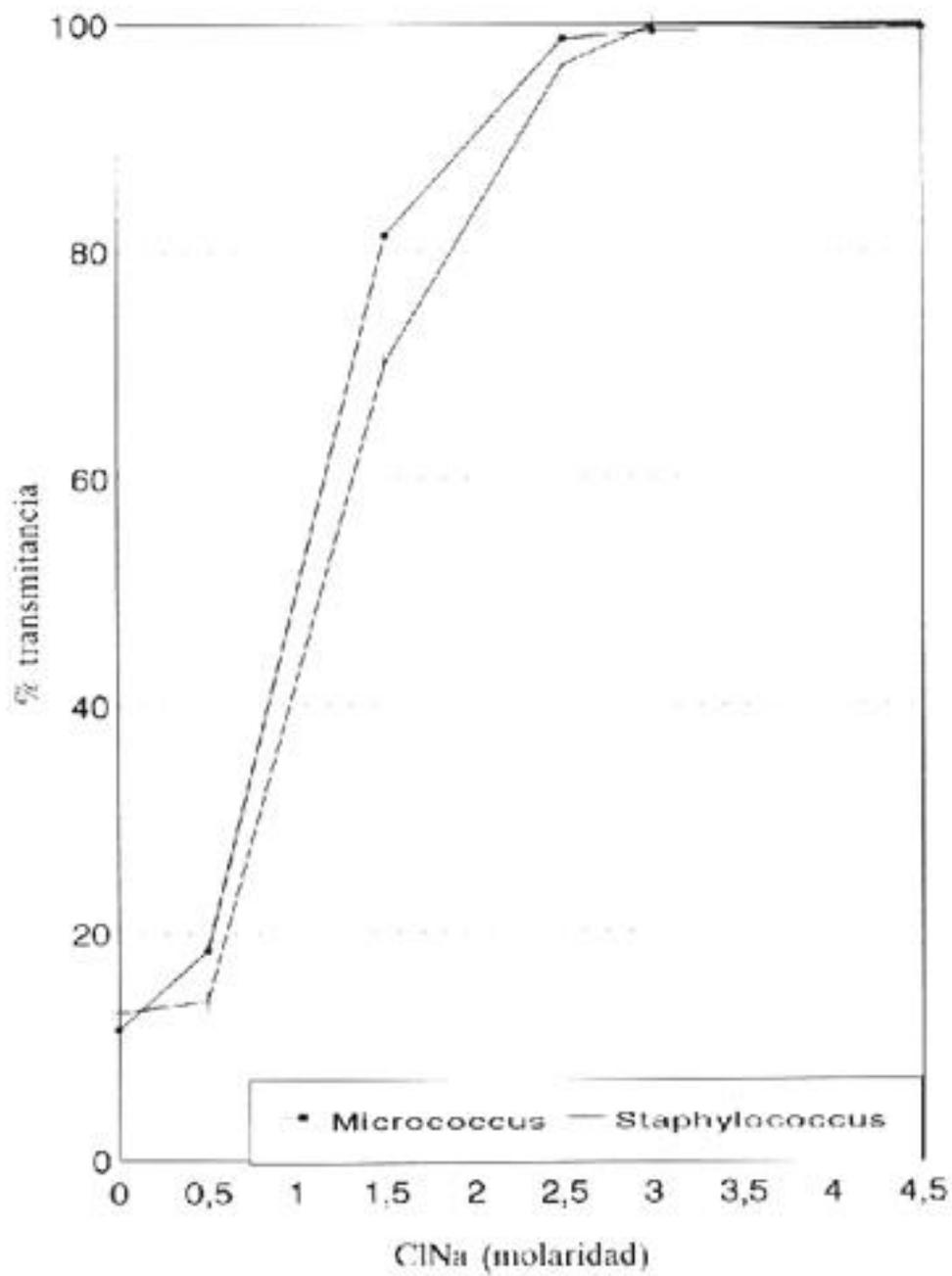


Figura III.31. Valores medios del efecto del ClNa en el crecimiento de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas expresado en % de transmittancia.

MICROCOCCUS	ACTIVIDAD DE AGUA MINIMA	STAPHYLOCOCCUS	ACTIVIDAD DE AGUA MINIMA
1	0,776	3	0,776
2	0,894	4	0,865
16	0,894	7	0,865
17	0,894	14	0,894
33	0,894	20	0,894
37	0,950	23	0,950
38	0,865	27	0,950
39	0,950	29	0,865
41	0,950	42	0,865
52	0,950	54	0,894
58	0,894	63	0,865
72	0,894	65	0,894
X	0,900		0,881
D.T.	0,047		0,043

Tabla III.28. Aw mínima de crecimiento de las cepas Micrococcus y Staphylococcus aisladas de la sal del curado de jamones crudo-curado

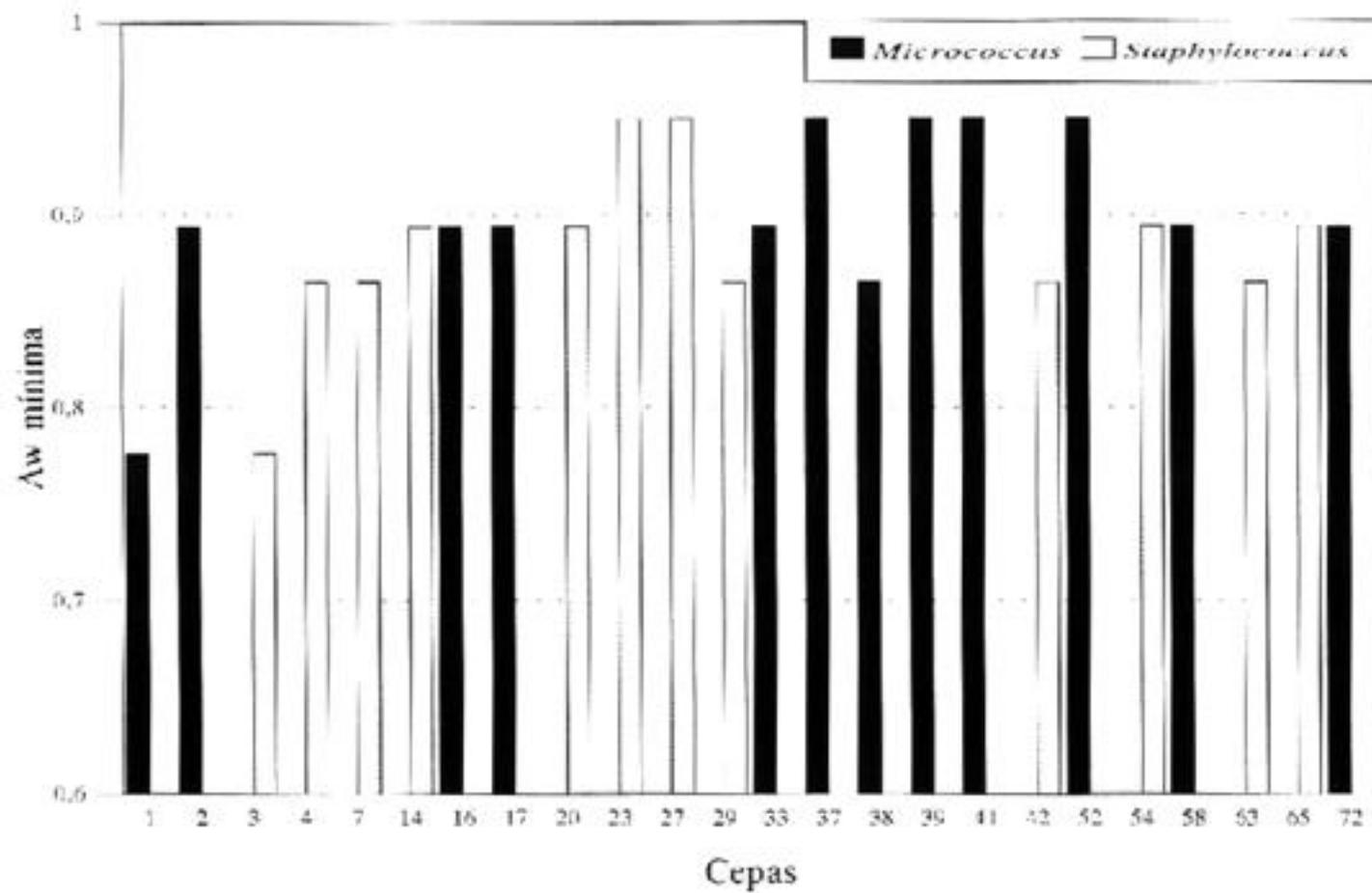


Figura III.32. Aw mínima de crecimiento de las 24 cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas de salazonado de jamones crudo-curados.

MICROCOCCUS	500 ppm	200 ppm
1	2,6	<1
2	18,0	5,8
16	<1	<1
17	12,4	<1
33	18,0	5,6
37	12,4	<1
38	18,0	5,2
39	1,5	<1
41	23,5	3,8
52	6,5	<1
58	10,4	<1
72	14,0	5,0

Tabla III.29. Cantidad de nitritos liberada por las cepas de Micrococcus a dos concentraciones de nitratos en el medio (500 y 200 ppm), expresada en ppm

STAPHYLOCOCCUS	500 ppm	200 ppm
3	15,0	2,4
4	7,0	2,2
7	15,0	<1
14	2,5	<1
20	3,4	<1
23	18,0	<1
27	13,0	1,9
29	6,6	<1
42	18,0	<1
54	2,8	2,0
63	14,0	7,5
65	13,0	5,0

Tabla III.30. Cantidad de nitritos liberada por las cepas de Staphylococcus a dos concentraciones de nitratos en el medio (500 y 200 ppm), expresada en ppm

CEPAS	0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
1	1,945	1,928	1,832	1,853	1,705
2	1,783	1,712	1,633	1,594	1,518
16	2,010	1,873	1,928	1,946	1,731
17	1,835	1,836	1,834	1,798	1,685
33	2,357	2,306	2,335	2,313	2,292
37	2,275	2,168	2,205	2,252	2,258
38	1,841	1,778	1,738	1,682	1,572
39	2,142	2,173	2,133	2,187	2,175
41	1,706	1,628	1,637	1,674	1,642
52	2,034	2,068	1,992	2,066	1,968
58	2,279	2,234	2,251	2,255	2,233
72	1,085	1,080	0,903	0,953	0,261
X	1,941	1,898	1,868	1,881	1,753
D.T.	0,327	0,323	0,368	0,369	0,527

Tabla III.31. Influencia de la presencia de distintas concentraciones de nitrito en el medio en el crecimiento de las cepas de *Micrococcus*, expresada en absorbancia a 600 nm

CEPAS	0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
3	2,050	2,153	2,152	2,165	2,152
4	1,762	1,813	1,746	1,703	1,646
7	2,234	2,413	2,187	2,282	2,165
14	1,549	1,614	1,446	1,427	1,014
20	2,065	2,086	1,980	1,998	1,943
23	2,263	2,264	2,238	2,280	2,064
27	2,274	2,249	2,276	2,284	2,266
29	1,857	1,732	1,715	1,684	1,462
42	1,781	1,690	1,705	1,668	1,465
54	2,111	2,105	2,065	2,133	2,143
63	1,956	1,696	1,765	1,568	1,541
65	2,332	2,266	2,299	2,305	2,277
X	2,019	2,006	1,964	1,958	1,844
D.T.	0,233	0,267	0,268	0,312	0,389

Tabla III.32. Influencia de la presencia de distintas concentraciones de nitrito en el medio en el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus*, expresada en absorbancia a 600 nm

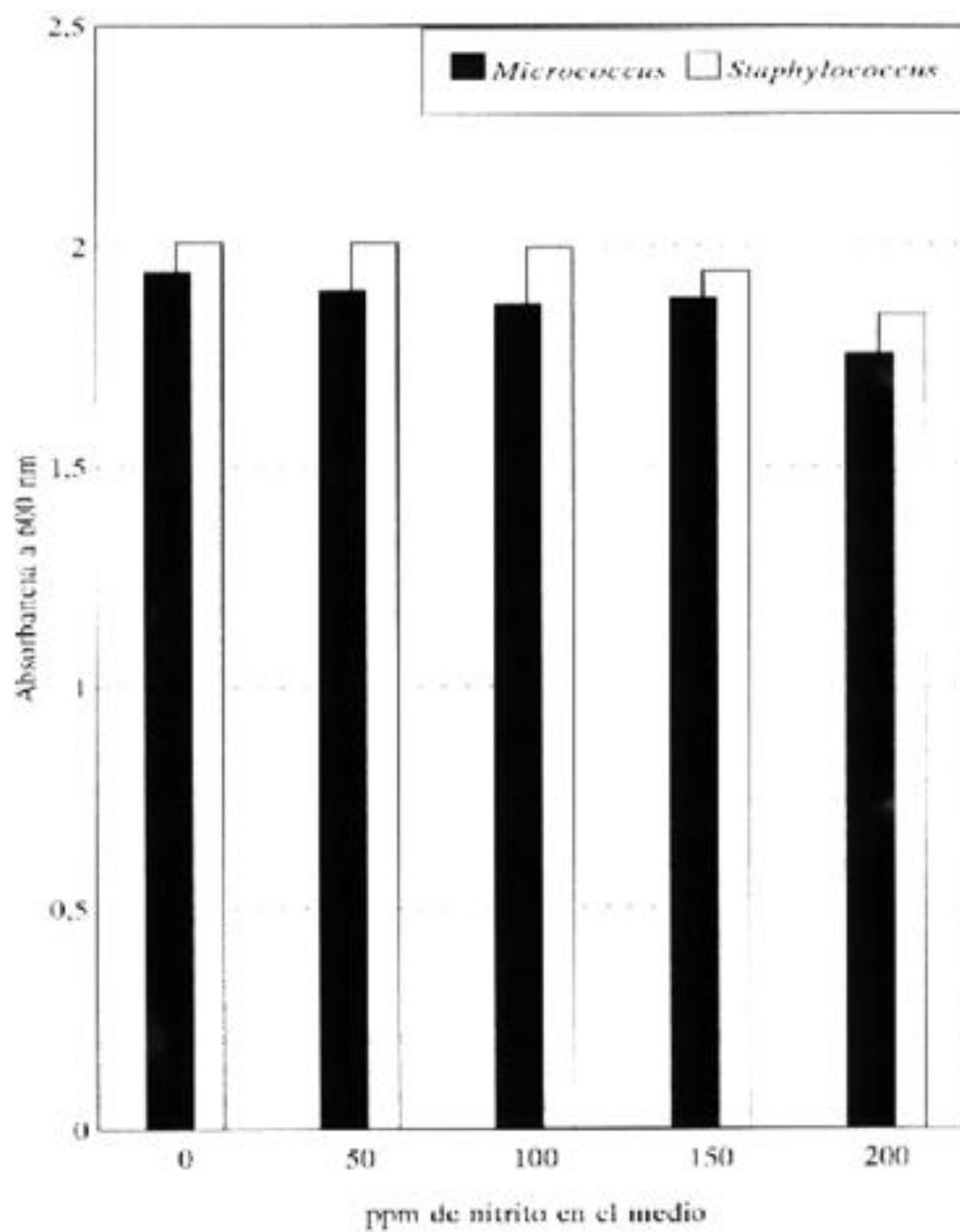


Figura III.33. Influencia de la presencia de nitrito en el medio de cultivo en el crecimiento de las Micrococcáceas. Valores medios de las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus*

IV. DISCUSIÓN

No son muy abundantes en la bibliografía consultada los datos referentes a los parámetros químicos y físico-químicos de la sal y salmueras con los que comparar nuestros resultados.

El contenido en humedad y cenizas de la sal marina nueva utilizada en la elaboración de jamones crudo-curados es similar al observado en 15 muestras de sal "solar" por Shewan (1951). Los niveles de humedad tanto de la sal de curado de jamones ibéricos como de cerdo blanco son superiores a los de la sal nueva, este hecho lógicamente se debe a la presencia de parte del agua muscular liberada durante el proceso de salazonado. Esta misma causa debe ser también la responsable del menor contenido en cenizas de la sal de curado, en comparación con el de la sal nueva. Teniendo en cuenta los valores obtenidos en ambos parámetros químicos, el contenido en materia orgánica oscila entre el 1,5-2%.

En la sal nueva los nitratos están presentes en cantidades traza. En cuanto a la sal de curado de jamones de cerdo ibérico no hemos detectado la presencia de nitratos en ninguna de las 8 muestras analizadas. Solamente hemos encontrado estas sales en una de las muestras de sal de curado de jamones de cerdo blanco con una tasa de 7,3 ppm.

La determinación de nitratos ha sido escasamente llevada a cabo en la sal de curado y en las salmueras de los productos cárnicos enteros. Solamente Massacra (1964) la ha realizado en la salmuera de la bresaola, obteniendo niveles de 7.100 ppm a las 4 horas y de 770 ppm a los 20 días, cantidades que consideramos muy altas, habida cuenta de las tasas adicionadas a la mezcla de curado (20,25 g de NO_3K /quintal de carne)

En cuanto a los nitritos solamente se ha detectado su presencia en 4 de las 16 muestras de sal de curado de jamones de cerdo blanco, con valores que oscilan entre 10,3 ppm y 17,3 ppm y en una de las muestras de sal de curado de jamones de cerdo ibérico (12,4 ppm).

Los niveles de nitritos observados en distintos tipos de salmueras varían entre las 0,4-1,5 ppm encontradas por Cantoni *et al.* (1968) en la salmuera del jamón cocido y las 0,2-2,7 ppm obtenidas por Cantoni *et al.* (1967) en la salmuera de la "coppa". Sin embargo, Massacra (1964) obtiene tasas tan altas como 53 ppm a los 20 días en la salmuera de la bresaola.

La presencia de nitratos y nitritos en algunas muestras de sal de curado -a niveles próximos a 10 ppm- pone de manifiesto la utilización de estos agentes del curado en el proceso de salazonado de jamón, si bien las cantidades detectadas son inferiores a las que se suelen adicionar inicialmente. La razón de esta disminución se debe lógicamente a las transformaciones que sufren estos compuestos y a su penetración en el jamón.

El pH de la sal nueva y de la sal de curado de cerdo ibérico alcanzó un valor próximo a 6,6, sin embargo, en el caso de la sal de cerdo blanco, fue de 7,13. Desconocemos la razón de esta diferencia.

Estos valores de pH son muy superiores a los observados en la salmuera de la bresaola por Massacra (1964) y que oscilan entre 5-5,4. Estas diferencias probablemente se deben a la permanencia del ácido láctico liberado de la carne en la salmuera de la bresaola, mientras que en nuestro caso, tanto el ácido láctico como otros componentes liberados del tejido muscular dejan de estar en contacto con la sal durante la fase de salazonado. De la misma manera los valores de pH obtenidos por Cantoni *et al.* (1967) en la salmuera de la "coppa" son inferiores a los nuestros, ya que oscilan entre 5,5 y 6.

En el caso de la salmuera del jamón cocido, Cantoni *et al.* (1968) cita valores de pH comprendidos entre 6,2 y 8,3, con un valor medio de 7-7,4.

La microbiología de la sal marina nueva utilizada en el salazonado de los jamones crudo-curados, ha sido escasamente estudiada. Los recuentos de aerobios mesófilos observados por Carrascosa *et al.* (1988), Cornejo *et al.* (1992) y Marín *et al.* (1993) oscilan entre 3,60 y 5 log ufc/g, siendo por lo tanto superiores a los valores medios observados en nuestro caso para este grupo microbiano (2,45 log ufc/g).

Carrascosa *et al.* (1988) y Cornejo *et al.* (1992) han puesto de manifiesto en la sal nueva niveles de Micrococáceas de 3,90 y 5 log ufc/g, respectivamente. Estos valores son superiores a los puestos en evidencia por nosotros -1,66 log ufc/g- para este grupo microbiano. En las dos únicas muestras de sal analizadas por estos dos autores, se detectó la presencia de levaduras, hecho que observamos nosotros en una muestra de las 5 estudiadas; así mismo, los primeros autores pusieron en evidencia la presencia de bacterias ácido-lácticas, que en nuestro caso solo estuvieron presentes también en una sola de las muestras.

Marín *et al.* (1993) son los únicos autores que han estudiado la presencia de diversos grupos microbianos en la sal de curado de jamones crudo-curados elaborados por el proceso de salazonado en seco. Dichos autores, observaron recuentos de aerobios mesófilos de 5,85 log ufc/g, cifras superiores a las observadas por nosotros; estos recuentos son dos unidades logarítmicas superiores a las encontradas por los mismos autores en la sal nueva. En nuestro caso también la sal de curado presenta un mayor número de microorganismos aerobios mesófilos que la sal nueva, aproximadamente dos unidades logarítmicas superior, ya que en el caso de la sal de curado de cerdo ibérico el valor medio obtenido en este recuento fue de 3,77 log ufc/g y en la de cerdo blanco de 3,82 log ufc/g. El resto de los grupos determinados por Marín *et al.* (1993) -estreptococos fecales, enterobacterias y clostridios sulfito-reductores- no han sido estudiados en nuestras muestras.

A diferencia de lo que ocurre con la sal nueva y la sal de curado, la microbiología de las salmueras utilizadas en la salazón de diversos productos cárnicos ha sido estudiada por diversos autores. Los recuentos de aerobios totales obtenidos por Cantoni (1964) en la salmuera de la bresaola de 20 días fueron del orden de 8,27 log ufc/g. En la salmuera de la coppa, Cantoni *et al.* (1967) han obtenido recuentos que oscilan entre 7,38 log ufc/g y 8,84 log ufc/g. Por otra parte, Cantoni *et al.* (1968) en salmuera de jamón cocido obtuvieron en los recuentos totales valores comprendidos entre 6,23 log ufc/g y 7,04 log ufc/g. Estos resultados son superiores a los encontrados en las sales de curado de jamones analizadas por nosotros. La razón de esta diferencia debe estar en el menor contenido en sal de estas salmueras en comparación con la sal de curado, lo que lógicamente, entre otros factores, facilitará el crecimiento microbiano.

Las Micrococáceas constituyen el grupo predominante en las muestras de sal de curado analizadas por nosotros, observaciones similares han sido realizadas en distintos tipos de salmueras.

Los recuentos obtenidos en nuestro caso en la sal de curado de jamones de cerdo ibérico fueron de 3,63 log ufc/g y en la de cerdo blanco de 3,59 log ufc/g. Niveles del mismo orden de magnitud han sido observados para las micrococáceas y gérmenes halotolerantes en la superficie del jamón crudo-curado español (Silla *et al.*, 1989; Hernández y Huerta, 1993) y en la de la cecina de vacuno (García, 1994), inmediatamente después de sufrir la fase de salazón. Estos valores los consideramos como muy bajos para que este grupo microbiano desarrolle a nivel apreciable algún tipo de acción beneficiosa durante la fase de salazonado. Recuentos superiores han sido descritos en la salmuera de la bresaola -8,37 log ufc/g- (Cantoni, 1964), de la coppa -7,4-8,79 log ufc/g- (Cantoni, 1967), del jamón cocido -6,31 log ufc/g- (Cantoni *et al.*, 1968) y del jamón crudo-curado alemán -6 log ufc/g- (Schillinger y Lüke, 1989); en este último caso solo estaban presentes en 37 de las 47 muestras estudiadas. Sin embargo, Papa y Grazia (1991) al estudiar la salmuera del jamón cocido obtuvieron valores similares a los nuestros en 2 de las muestras analizadas por ellos con un valor de 3,90 log ufc/g y las 6 restantes presentaron tasas que oscilaron entre 4,07 log ufc/g y 4,77 log ufc/g.

Comparando los niveles de Micrococáceas obtenidos por nosotros en la sal nueva y en la sal de curado se observa un valor más alto en esta última -2 unidades logarítmicas-. Probablemente la razón de este hecho radique en el aporte microbiano por parte de los propios perniles y de los utensilios utilizados en el proceso de elaboración, más que al desarrollo de los microorganismos aportados por la sal. Ya que si este incremento se debiera exclusivamente al desarrollo de la flora presente en la sal nueva solo se observarían estafilococos, y en la sal de salazonado también hay micrococos

El medio de cultivo que hemos empleado para el recuento de Micrococáceas ha sido el Agar Mannitol Sal (Oxoid), también utilizado por otros autores (Giolitti *et al.* 1971a; Baldini *et al.*, 1977; Raczynski *et al.*, 1978; Carrascosa *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988; Silla *et al.*, 1985, 1989; Cornejo *et al.*, 1991). Por otra parte, resultó bastante idóneo ya que el 96,3% de las cepas aisladas pertenecían a la familia Micrococcaceae. Cornejo *et al.* (1992) también lo utilizaron para estudiar el desarrollo de las Micrococáceas durante el proceso rápido de maduración del jamón, aislando en él un 96,4% de cepas pertenecientes a esta familia. Selgas *et al.* (1988) utilizando el mismo medio para aislar las micrococáceas de embutidos fermentados observaron la presencia de bacilos -que llegan a representar el 90% de los aislamientos en el día 2º de la maduración- y cocos Gram positivos y catalasa negativos.

Entre las cepas no pertenecientes a la familia Micrococcaceae (22), el sistema ATB 32-STAPH fue capaz de identificar 3 cepas presentes en la sal de curado de cerdo blanco incluídas en el género *Aerococcus*, especie *Aerococcus viridans*. Esta especie no ha sido citada como integrante de la flora microbiana de la sal, salmueras o productos cárnicos crudo-curados.

La evolución de la flora microbiana de la sal a lo largo del período de su utilización muestra la ausencia de una tendencia definida, observándose ligeras variaciones en los niveles de los distintos grupos microbianos. Estos resultados ponen en evidencia la ausencia de un desarrollo microbiano importante durante el período de utilización de la sal.

La razón de este hecho probablemente radique en una combinación de distintos factores, entre los que la baja actividad de agua y la escasa presencia de nutrientes deben ser unos de los más importantes en dificultar el crecimiento microbiano. La temperatura de salazonado (3-5°C) también debe contribuir a la ausencia de desarrollo microbiano.

Las dos pruebas iniciales realizadas para diferenciar los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* -crecimiento en anaerobiosis y fermentación/oxidación de la glucosa- pusieron de manifiesto un anómalo comportamiento en un número importante de cepas, aunque algunos autores consideran válidas ambas pruebas para la diferenciación de los dos géneros (Stengel, 1990). Resultados similares a los nuestros han sido observados por De la Rosa *et al.* (1990) en Micrococáceas aisladas de distintas semiconservas cárnicas españolas. Los citados autores pusieron también en evidencia respuestas no esperadas en la prueba de la sensibilidad a la lisostafina y en la producción de ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina. Estafilococos resistentes a la lisostafina han sido encontrados por Comi *et al.* (1992) en embutidos fermentados. Venugopal *et al.* (1994) llegaron a la conclusión de que para que la prueba de producción de ácido a partir de glicerol sea efectiva en la diferenciación de ambos géneros se necesitan tasas de eritromicina del orden de 10 µg/100 ml. En definitiva pues, parece que ninguna de las cuatro pruebas citadas son concluyentes a la hora de la diferenciación de ambos géneros.

En nuestro caso y como ya comentamos en el capítulo de resultados, hemos optado por la adscripción a género a partir de los datos proporcionados por el sistema de identificación ATB 32 STAPH.

Nuestros datos ponen de manifiesto que en la sal nueva todas las cepas de Micrococáceas aisladas pertenecían al género *Staphylococcus*.

En la sal de curado se observó la existencia de un mayor número de estafilococos que de micrococos y aunque el medio utilizado para el aislamiento es un medio relativamente selectivo para estafilococos, lo que implica una menor recuperación de micrococos, pensamos que este hecho se debe a la mayor resistencia a la sal de los estafilococos. El predominio de estafilococos, al igual que ocurre en la mayoría de los productos cárnicos, también podría explicarse, como argumenta Kotzekidou (1992), por la diferente demanda de oxígeno de los estafilococos y micrococos. Probablemente el bajo potencial redox potencia la inhibición de los micrococos, mientras que los estafilococos son anaerobios facultativos.

La carencia de datos sobre la presencia de ambos géneros en la sal de curado de jamones crudo-curados nos impide comparar nuestros resultados. Además, tampoco podemos realizarlo con las informaciones existentes sobre la microbiología de las salmueras utilizadas en la elaboración de diversos productos cárnicos como el bacon, jamón cocido etc., ya que en la mayoría de los casos se trata de estudios antiguos donde la diferenciación de *Micrococcus* y *Staphylococcus* era prácticamente imposible. En el caso de la salmuera de jamón cocido, Papa y Grazia (1991) han observado un claro predominio del género *Staphylococcus* (104 cepas frente a 16 de *Micrococcus*).

El predominio de estafilococos sobre micrococos ha sido también observado en jamones crudo-curados (Francisco *et al.*, 1981; Molina *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1986; Rheimbaben y Seipp, 1986, etc.), productos deshidratados de vacuno -bresaola, cecina, bündlerfleisch- (Bersani *et al.*, 1991; Kotzekidou, 1992; García, 1994, etc.) y embutidos fermentados (Fischer y Schleifer, 1980; Simonetti y Cantoni, 1983; Seager *et al.*, 1986; Comi *et al.*, 1986, 1992; Montel *et al.*, 1992; Buzzini *et al.*, 1994; Torriani *et al.*, 1994; Larpent *et al.*, 1994, etc.). Sin embargo, Vignolo *et al.* (1988) indicaron un predominio del género *Micrococcus* sobre *Staphylococcus* en embutidos fermentados.

Se observaron ciertas diferencias en cuanto al porcentaje relativo de ambos géneros en la sal de jamones ibéricos y de raza blanca. Mientras que en el primer caso, los estafilococos representan el 66,87% y los micrococos el 33,12%; en el segundo, los estafilococos, significan el 52,06% y los micrococos el 45,36%. Aunque desconocemos la razón de estas diferencias entre ambos tipos de sal, probablemente esté relacionada con el proceso de elaboración seguido en cada caso y las características de la materia prima empleada que

pueden influir en la presencia de micrococáceas. Por otra parte, Kotzekidou (1992) indica que el lugar geográfico puede determinar el nivel de estafilococos en los embutidos crudo-curados.

Además de micrococos y estafilococos se puso en evidencia la presencia en la sal de cerdo blanco de 2 cepas de *Stomatococcus*, e identificadas por el sistema ATB 32 STAPH como *S. mucilaginosus*, que forma parte de la flora normal de la cavidad bucal humana. No hemos encontrado en la bibliografía consultada información sobre la presencia de esta especie microbiana en sal, salmueras o productos cárnicos crudo-curados.

En relación con la identificación de las especies pertenecientes a ambos géneros, se ha observado un alto porcentaje de cepas dudosas (un 25% aproximadamente, para las cepas de estafilococos y un 40% en el caso de los micrococos). Sin embargo, a todas estas cepas se las consideró como pertenecientes a una determinada especie en función de los datos proporcionados por el sistema de lectura de las galerías API. En este sentido se escogió la primera opción por ser la que representa un porcentaje mayor de identificación (ver figura II.3).

Los sistemas de identificación API han sido frecuentemente utilizados para la adscripción a especie de cepas pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Generalmente se ha usado el sistema API-STAPH, más antiguo y por lo tanto con menos fiabilidad, que el ATB-32 STAPH utilizado por nosotros. Delarras (1991) considera que este último sistema de identificación es el más adecuado para el estudio de las micrococáceas en alimentos.

El API STAPH ha sido empleado en la identificación de Micrococáceas en distintos productos cárnicos: jamón crudo-curado español (Cornejo y Carrascosa, 1991; Carrascosa y Cornejo, 1991; Molina *et al.*, 1989) y embutidos crudos curados (Comi *et al.*, 1986, 1992; Soncini, 1982; Simonetti y Cantoni, 1983; Torriani *et al.*, 1994). También ha sido utilizado para la identificación de micrococáceas en salmuera de jamón cocido (Papa y Grazia, 1991).

Otros autores son también incapaces de identificar un número elevado -entre el 15 y el 25%- de cepas de estafilococos (Simonetti y Cantoni, 1983; Comi *et al.*, 1986, 1992; Pirone y Mangaelli, 1990; De la Rosa *et al.*, 1990) y de micrococos (Kloos *et al.*, 1979; De la Rosa *et al.*, 1994) debido a las propiedades atípicas que poseen las cepas.

Se han identificado en todos los tipos de sal 15 especies de *Staphylococcus* y 6 de *Micrococcus*. Las dos especies más abundantes de *Staphylococcus* son *S. xylosus* y *S. equorum*, que representan conjuntamente un 75% aproximadamente de la totalidad; ninguna de las especies restantes supera el 10%.

No hemos aislado en ninguna de las muestras de sal *S.aureus*, probablemente debido a la elevada concentración salina y a la baja a_w , así como a unas prácticas higiénicas correctas. Solamente hemos encontrado en la bibliografía consultada sobre la microbiología de la sal de curado y de las salmueras una referencia a la presencia o ausencia de *S. aureus*. Papa y Grazia (1991) encontraron 3 cepas de esta especie (2,4% del total de las aisladas) en la salmuera del jamón cocido. Tampoco se ha aislado esta especie del jamón ibérico (Francisco *et al.*, 1981; Rodríguez *et al.*, 1994), de la basturma (Kotzekidou, 1992) y de la cecina de vacuno (García, 1994). Por el contrario, se ha detectado su presencia en porcentajes entre el 2-5% de la totalidad de los estafilococos en embutidos fermentados (Comi *et al.*, 1992; Torriani *et al.*, 1994) y en semiconservas cárnicas españolas (De la Rosa *et al.*, 1994).

S. xylosus es la especie más abundante en los tres tipos de sal analizados por nosotros, tanto en la sal nueva (55,55% sobre el total de *Staphylococcus*), como en la sal de curado de cerdo ibérico (50,49%) y en la de curado de cerdo blanco (42,99%) Así mismo, es generalmente la especie más abundante en jamones crudo-curados (Molina *et al.*, 1989; Carrascosa y Cornejo, 1991; Cornejo y Carrascosa, 1991; Rodríguez *et al.*, 1994), en embutidos fermentados (Comi *et al.*, 1986; Seager *et al.*, 1986; Montel *et al.*, 1992; Torriani *et al.*, 1994; Larpent *et al.*, 1994) y en la bresaola (Bersani *et al.*, 1991). Se ha encontrado ocasionalmente en la piel humana y en la de primates (Kloos y Musselwhite, 1975; Kloos, 1980; Schleifer, 1986). También ha sido aislada de manantiales, suelo, arena de playa y aguas naturales. Raramente se ha asociado con infecciones humanas o animales.

S. equorum, al igual que *S. xylosus*, lo hemos encontrado en los tres tipos de sal donde es la segunda especie más abundante. Suele aislarse raramente en productos cárnicos crudo-curados aunque últimamente ha sido descrita en niveles del 7,7% de la totalidad de los estafilococos en el jamón ibérico, donde es después de *S. xylosus* la especie más abundante (Rodríguez *et al.* 1994). García (1994) ha puesto de manifiesto que es la especie predominante en la cecina de vacuno.

Las dos especies mayoritarias están muy relacionadas entre sí, ambas son coagulasa negativas, resistentes a la novobiocina y con un origen común; se aíslan casi exclusivamente de animales, sobre todo *S. equorum* (Prieto, 1990).

Es de destacar la abundancia relativa en la sal de *S. saprophyticus*, quizás la especie dentro del grupo de los estafilococos coagulasa negativos, junto con la oportunista *S. epidermidis*, más patógena (Marrie *et al.*, 1982; Schleifer, 1986). *S. saprophyticus*, que en nuestro caso es la tercera especie mayoritaria aislada de la sal de curado, no ha sido encontrada, sin embargo, en las muestras de sal nueva analizadas. También se ha aislado en diversos tipos de embutidos crudo-curados por Simonetti y Cantoni (1983), Seager *et al.* (1986) y Nychas y Arkoudelos (1990), en la basturma por Kotzekidou (1992), en jamón ibérico por Rodríguez *et al.* (1994) y en la cecina de vacuno por García (1994).

Hemos observado muy pocas cepas de estafilococos sensibles a la novobiocina, que generalmente se asocian con el hombre, como *S. epidermidis*, *S. capitis* o *S. hominis*

S. epidermidis es un patógeno oportunista que puede invadir y permanecer en aparatos médicos, como prótesis valvulares cardíacas (Dismukes *et al.*, 1973; Archer *et al.*, 1982). Esta especie puede ser responsable de infecciones postoperatorias en pacientes sometidos a operaciones cardíacas (Archer y Tenenbaum, 1980), endocarditis, peritonitis, etc. Ha sido aislada de la salmuera del jamón cocido (Papa y Grazia, 1991) y de la de la bresaola (Cantoni, 1964). Es la especie mayoritaria en la basturma (Kotzekidou, 1992) y la segunda en importancia en productos cárnicos pasterizados españoles (De la Rosa, 1990). Solamente hemos aislado una cepa con bajo porcentaje de identificación en la sal de cerdo ibérico.

S. capitis raramente se encuentra asociado con infecciones. En el hombre se encuentra en el cuero cabelludo, frente, cejas, cara, nariz y oídos, regiones en que son numerosas las glándulas sebáceas. Se han detectado 6 cepas de esta especie en la sal de jamón de cerdo ibérico. Es la especie más abundante en los productos cárnicos pasterizados españoles (De la Rosa, 1990). También se ha aislado de embutidos fermentados (Simonetti y Cantoni, 1983; Torriani *et al.*, 1994), de la cecina de vacuno (García, 1994) y del jamón curado español (Cornejo y Carrascosa, 1991).

S. hominis se puede encontrar asociado con una variedad de infecciones humanas - septicemia, conjuntivitis y heridas infectadas-. Vive habitualmente en la piel del hombre. Ha

sido aislada del chorizo de Cantimpalos, donde constituye la especie mayoritaria (Daporta, 1988). En nuestro caso solamente se aislaron dos cepas de la sal de cerdo blanco.

El resto de las especies de *Staphylococcus* puestas de manifiesto por nosotros en la sal de curado alcanzan tasas inferiores al 4% y en la mayoría de los casos se trata de cepas dudosas con un porcentaje de identificación inferior al 75%. Conviene comentar la escasa presencia de cepas (6) de *S. sciuri*, como ocurre en la mayoría de los estudios llevados a cabo en la identificación de las micrococáceas, aunque según Molina *et al.* (1989) esta especie representa el 44% de los estafilococos presentes en el jamón curado español. Es de destacar la presencia de 5 cepas de *S. gallinarum*, especie que no ha sido puesta de manifiesto en productos cárnicos crudo-curados, aunque sí en semiconservas españolas (De la Rosa *et al.*, 1994) y en carne de buey almacenada a vacío o en atmósfera de CO₂ (Venugopal *et al.*, 1994).

Los micrococos han sido aislados esporádicamente de gran variedad de fuentes como - suelo, lodo de estuarios, arena de playa, aguas (marina y dulce), plantas, carne y productos lácteos, fómites, polvo, aire, etc.- por numerosos autores (Pearse *et al.*, 1942; ZoBell y Upham, 1944; Abd-el Malek y Gibson, 1948; Aarosan, 1955; Pohja, 1960; Baird-Parker, 1962; Kitchell, 1962; Streby-Andrews y Kloos, 1971; Doeringer y Dugan, 1973, etc.).

Se han aislado micrococos de la piel del hombre, siendo *M. luteus* la especie más abundante, seguida de *M. varians*, *M. lylae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. kristinae*, *M. roseus*, *M. sedentarius* y *M. agilis* (Kloos *et al.*, 1974). También se han aislado de la piel de otros mamíferos: ardillas, ratas, perros, caballos y varios primates (Kloos *et al.*, 1976), siendo *M. varians* la especie más abundante.

La identificación de las especies de *Micrococcus* ha sido muy pocas veces llevada a cabo tanto en la sal como en los productos cárnicos crudo-curados, probablemente debido a la menor presencia de especies de este género en comparación con la de estafilococos.

En el caso de la sal de curado o de las salmueras utilizadas en el curado de productos cárnicos, solamente Cantoni (1964) puso de manifiesto la presencia de cinco especies de *Micrococcus* en la salmuera de la bresaola: *M. roseus*, *M. caseolyticus*, *M. flavus* y *M. conglomeratus*.

En los productos cárnicos curados se ha observado el predominio de *M. kristinae* en jamones ibéricos y en embutidos italianos (Comi *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1994; Torriani

et al., 1994), de *M. roseus* en la cecina de vacuno (García, 1994) y de *M. varians* en la basturma (Kotzekidou, 1992), en diversos tipos de embutidos (Fischer y Schleifer, 1980 y Vignolo *et al.*, 1988) y en semiconservas españolas (De la Rosa *et al.*, 1990).

En nuestro caso la especie más abundante fue *M. lylae*, que no ha sido descrita en productos crudo-curados, aunque ha sido identificada en semiconservas cárnicas españolas (De la Rosa *et al.*, 1990). Algo similar ocurre con *M. nishinomiyaensis* que solo ha sido citado en la cecina de vacuno (García, 1994) y en las semiconservas españolas (De la Rosa *et al.*, 1990).

No hemos detectado la presencia de *M. kristinae* en ninguna de las muestras de sal analizadas y solamente la de *M. varians* en la sal de curado de cerdo ibérico.

Una vez discutida la presencia de las distintas especies de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* en las sales de curado de cerdo ibérico y cerdo blanco, cabe preguntarse ¿Existen diferencias en este aspecto entre ambos tipos de sal?. En el caso de los estafilococos las 3 especies predominantes son las mismas -*S. xylosus*, *S. equorum* y *S. saprophyticus*-, si bien hay un claro predominio de *S. equorum* en la de cerdo ibérico (39%) sobre la de cerdo blanco (19%). Desconocemos cual puede ser la razón de esta diferencia. En cuanto al resto de las especies presentes, los resultados obtenidos no nos permiten llegar a establecer ninguna diferencia fundamental entre ambos tipos de sal.

En el caso de los micrococcos, conviene destacar la presencia de *M. luteus* en la sal de cerdo ibérico. Esta especie ha sido escasamente puesta de manifiesto, solamente De la Rosa *et al.* (1990) la ha encontrado en semiconservas españolas. Por el contrario *M. varians* cuya habitat es la piel de los mamíferos (Schleifer, 1986), está ausente en la sal de cerdo blanco, mientras que en la de ibérico se encuentra en una proporción del 13,21%.

¿Cual es el origen de los micrococáceas presentes en la sal de curado de jamones crudo-curados?

En el caso de los estafilococos, el hecho de que los dos más abundantes en la sal de curado -*S. xylosus* y *S. equorum*; que representan entre el 70-80% de la totalidad de los estafilococos-, sean también las dos especies mayoritarias en la sal nueva, significa que al menos un número importante de cepas presentes en la sal de curado tenga su origen en la propia sal utilizada. La procedencia de *S. saprophyticus* -especie ausente en la sal nueva- es

más difícil de justificar, aunque probablemente tenga un origen humano, habiendo sido además aislada de la piel del cerdo.

Teniendo en cuenta que en la sal nueva se han aislado solamente *Staphylococcus*, la presencia de especies del género *Micrococcus* en los otros tipos de sal analizados puede deberse al aporte por parte de las piezas del jamón y al medio ambiente del lugar de elaboración.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede llegar a la conclusión, de que la sal marina constituye una fuente importante de micrococáceas (fundamentalmente *Staphylococcus*) durante la etapa de salazonado, pero además la superficie de los jamones (Nottingham, 1982; Gardner, 1982; Carrascosa *et al.*, 1988, 1989; Silla *et al.*, 1989) y el propio ambiente de la fábrica contribuyen de una manera esencial a la presencia de microorganismos. También la presencia de algunas especies de origen humano pone de manifiesto la contaminación a través de los manipuladores.

Estas fuentes de microorganismos constituirán lo que algunos autores denominan "reservorio microbiano" (Cornejo *et al.*, 1992). La microbiología de este reservorio debe tener un reflejo en la del producto que está en contacto con la sal. En este sentido, aunque no hemos estudiado la microbiología de los jamones salazonados elaborados con las muestras de sal analizadas por nosotros, nuestros datos se pueden considerar comparables en términos generales a los de los autores que han estudiado la microbiología de los jamones crudo-curados ibéricos y de cerdo blanco. Dos son los aspectos comparables, el predominio de *Staphylococcus* sobre *Micrococcus* y que *S. xylosus* sea la especie mayoritaria (Molina *et al.*, 1989; Carrascosa y Cornejo, 1991; Cornejo y Carrascosa, 1991; Rodríguez *et al.*, 1994). Esta similitud es particularmente evidente en relación con los datos aportados por Rodríguez *et al.* (1994) para el jamón ibérico; las tres especies de estafilococos mayoritarias en dicho jamón - *S. xylosus*, *S. equorum* y *S. saprophyticus*- son las mismas que observamos nosotros; sin embargo, en el caso de los micrococcos los citados autores observan un predominio de *M. kristinae* aunque su identificación ha sido "tentativa".

En definitiva pues, parece existir una penetración hacia el interior del producto, aunque por mecanismos no totalmente aclarados. Existen varias teorías de penetración de los microorganismos hacia el interior del jamón crudo-curado.

Baldini *et al.* (1977) propusieron la arterial femoral como la principal vía de entrada de los microorganismos en los jamones italianos. Por otra parte, es bien conocido el hecho de que durante el proceso de elaboración del jamón crudo-curado español, se producen grietas y fisuras en la superficie, causadas por los procesos de desecación (Solé, 1978) y son estas vías las que facilitarían el acceso de los microorganismos al interior de los jamones (Cornejo *et al.*, 1992).

Otra vía de acceso pueden ser los poros formados durante el rigor mortis (Gill *et al.*, 1984) o los originados por los cristales de hielo producidos durante el congelado-descongelado de los perniles (Sikes y Maxcy, 1980). Chizzolini *et al.* (1993) opinan que los intercambios entre el interior y el exterior del jamón del agua y la sal a través de los vasos sanguíneos y las fascias del tejido conjuntivo, son los medios que las bacterias pueden usar para penetrar hacia el interior de la carne.

Uno de los aspectos más importantes de nuestro estudio ha sido establecer el efecto de la temperatura en el crecimiento de las 12 cepas de *Micrococcus* y otras 12 de *Staphylococcus*, representativas de las especies de Micrococáceas identificadas. No se observaron diferencias en los tiempos de generación (g) entre ambos géneros a las temperaturas de 32°C, 25°C, 20°C y 11°C; sin embargo, a 4°C el tiempo de generación de los micrococos es el doble de los estafilococos. Comi *et al.* (1992) tampoco observaron diferencias en los valores g a unas temperaturas similares a las nuestras entre *Micrococcus* y *Staphylococcus* procedentes de embutidos fermentados. La variabilidad observada entre las cepas estudiadas no nos permite establecer diferencias entre las distintas especies en las que este parámetro ha sido establecido.

Ortíz de Apodaca *et al.* (1993) han estudiado las curvas de crecimiento de 9 cepas de *Micrococcus* aisladas de diferentes tipos de quesos. En general, todas crecieron mejor a 32°C que a 25°C y 18°C como ocurre en nuestras cepas. A 12°C los tiempos de generación aumentaban notablemente, sobrepasando en términos generales las 100 horas.

Comparando los tiempos de generación obtenidos por nosotros a 11°C, 20°C, 25°C y 32°C con los de Ortíz de Apodaca *et al.* (1993), se observa que a 25°C y 32°C y 11°C nuestros tiempos de generación son sensiblemente inferiores, sin embargo, ocurre lo contrario a 20°C.

Los resultados obtenidos por nosotros en el caso de las cepas de *Micrococcus* son bastante similares a los descritos por Selgas *et al.* (1988) en 42 cepas de este género procedentes de embutidos desecados españoles, si bien en su caso la temperatura más baja estudiada fue de 11°C. Sin embargo, son mucho más altos que los citados por Comi *et al.* (1992) sobre todo para temperaturas inferiores a 32°C, que indican valores tan bajos a 4°C como 7 y 13 horas, a 11°C de entre 5 y 7 horas y a 15°C inferiores a 4 horas. Estos autores sugieren que las temperaturas utilizadas en la elaboración de los embutidos de los que proceden las muestras pueden seleccionar la microflora y haber aislado, por lo tanto, cepas que crecen rápidamente a bajas temperaturas y con bajos tiempos de generación. Este hecho no ha tenido lugar en nuestro caso, porque si la temperatura utilizada en la fase de salazonado hubiera seleccionado la flora, el tiempo de generación a 4°C y probablemente también a 11°C, debería ser muy inferior al observado.

De nuestros resultados se desprende que las cepas presentes en la sal son débilmente psicrófilas, lo que evidentemente puede comprometer muy seriamente las acciones beneficiosas esperables de los microorganismos durante la etapa de salazonado, como puede ser la propia reducción de nitratos a nitritos.

Así mismo, hemos determinado a partir de la representación de Arrhenius las correspondientes energías de activación de las 24 cepas estudiadas o en el caso de los micrococos que en nuestro caso resultaron muy similares, presentando las cepas de *Micrococcus* un valor medio de $53,30 \cdot 10^3$ julios/mol y las cepas de *Staphylococcus* $47,63 \cdot 10^3$ julios/mol. Estos valores son inferiores a los establecidos por Selgas (1988), en cepas de *Micrococcus* y que varían entre 60 y 160 (10^3 Julios/mol).

En cuanto a la fase de latencia, nuestras cepas presentan el mismo comportamiento que las estudiadas por Selgas (1988), ya que a medida que disminuye la temperatura de incubación, aumenta la duración de la misma.

Teniendo en cuenta al comportamiento de nuestras cepas en presencia de distintas concentraciones de ClNa en el medio de cultivo -0 M, 0,5 M, 1,5 M, 2,5 M, 3 M y 4,5 M-, correspondientes a actividades de agua de -0,999, 0,992, 0,950, 0,894, 0,865 y 0,776-, respectivamente, hemos observado en general un mejor crecimiento en presencia de sal de los estafilococos que de los micrococos, hecho que generalmente es admitido por la mayoría de los autores (Molina *et al.*, 1989; Papa y Grazia, 1991). En el caso de los micrococos 4 cepas dejaron de crecer a una concentración de 1,5 M, 10 a 2,5 M y 1 seguía creciendo a

concentraciones de sal 3 M y 4,5 M. La variabilidad observada por nosotros es similar a la descrita por Selgas (1988) en cepas aisladas de chorizos y a las de Ortíz de Apodaca *et al.* (1993) en las procedentes de quesos.

Por lo que se refiere al comportamiento de las cepas de estafilococos frente a las distintas concentraciones de ClNa, 2 cepas cesan totalmente en su crecimiento con una concentración de ClNa 1,5 M, 6 a 2,5 M, mientras que a niveles 3 M y 4,5 M solo crece la cepa número 3. No hemos encontrado en la bibliografía datos con los que comparar los resultados obtenidos por nosotros en las especies de estafilococos estudiadas. Sin embargo, conviene recordar que Troller y Stinson (1975) observaron que cepas diferentes de la especie *Staphylococcus aureus* se comportan de distinta manera frente a la acción del ClNa en el tiempo de generación.

Teniendo en cuenta estos resultados y los valores de a_w de la sal así como la escasa psicrofilia de las cepas estudiadas, difícil es escapar a la conclusión de que las micrococáceas presentes en la sal, por otra parte y como hemos comentado en recuentos relativamente bajos, deben ver su actividad en la misma seriamente restringida por estos parámetros.

Las 24 cepas de Micrococáceas estudiadas presentaron actividad lipolítica utilizando como sustrato tocino dorsal del cerdo. No se observaron prácticamente diferencias entre las diferentes especies de los dos géneros estudiados.

Comparando nuestros resultados con los de otros autores que también han estudiado la actividad lipolítica sobre la grasa de cerdo, observamos que nuestras cepas tienen una actividad superior a la descrita por Simonetti y Cantoni (1983) en 6 cepas de estafilococos y 2 cepas de micrococos, por Vignolo *et al.* (1988) para diversas cepas de *Micococcus varians* y por Carrasco *et al.* (1991) en 40 cepas de *Micrococcus*, procedentes en todos los casos de embutidos fermentados. Sin embargo, es similar a la encontrada por Comi *et al.* (1992) en la mayoría de las 16 cepas de Micrococáceas, pertenecientes a las especies: *S. xylosus*, *S. simulans*, *M. varians* y *M. kristinae* aisladas también de embutidos fermentados. La mayoría de las cepas originan en su estudio un porcentaje de ácido oleico entre el 0,11 y el 0,77%, si bien dos cepas no presentaron actividad lipolítica y otra alcanzó un valor tan alto como el 2,70%.

Cuando se usó tributirina como sustrato, las 24 cepas de Micrococáceas estudiadas, fueron todas activas menos una, aunque con una cierta variabilidad entre ellas. Resultados

similares han sido observados por Cornejo y Carrascosa (1991) en 35 cepas aisladas de jamón blanco español. En el estudio realizado por Carrascosa y Cornejo (1991) en 21 cepas de Micrococáceas aisladas de jamón blanco español, solamente observaron que 10 de ellas fueron moderadamente activas frente a la tributirina. Sin embargo, en estas dos últimas publicaciones los autores observan la ausencia de actividad cuando se utilizan como sustratos Tween 40 y 80; por el contrario, en el estudio de Comi *et al.* (1992), algunas cepas fueron activas frente al Tween 80.

Algunos autores (Jones y Richard, 1952; Alifax, 1979; Larpent *et al.*, 1994) consideran la prueba de la tributirina como presuntiva, debiendo confirmarse la capacidad lipolítica de un microorganismo en un medio en el que esté presente como sustrato un triglicérido más complejo, pudiendo ser de origen animal o vegetal.

Al igual que ocurre con la lipólisis son numerosos los autores que han estudiado la actividad proteolítica de diversas especies de Micrococáceas aisladas de productos cárnicos (De la Rosa *et al.*, 1990; Carrascosa y Cornejo, 1991; Cornejo y Carrascosa, 1991; Molina y Toldrá, 1992; Comi *et al.*, 1992; Venugopal *et al.*, 1994; Torriani *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos son muy variables cuando se utiliza gelatina como sustrato, como en nuestro caso.

Molina y Toldrá (1992) no observaron actividad en *S. xylosus*. Comi *et al.* (1992), por el contrario, pusieron de manifiesto que todas las cepas de *S. xylosus* fueron proteolíticas mientras que *S. sciuri* carece de dicha actividad. Cornejo y Carrascosa (1991) solamente observaron 3 de las 35 cepas estudiadas -el 88% corresponden a *S. xylosus*- como positivas. Venugopal *et al.* (1994) pusieron de manifiesto que todas las cepas de *S. gallinarum*, *S. saprophyticus* y *M. varians* aisladas de carne de buey envasada a vacío o en CO₂, licuaban la gelatina. De la Rosa *et al.* (1990) estudiaron la hidrólisis de la gelatina en diversas cepas de *Micrococcus*, observando distinto comportamiento incluso dentro de la misma especie. El mayor número de cepas positivas correspondía a *M. lylae* (90%) y el menor a *M. nishinomiyaensis* (6%). Torriani *et al.* (1994) han observado una escasa actividad proteolítica de diversas cepas de Micrococáceas aisladas de embutidos de los Abruzzo.

Rodríguez *et al.* (1995) estudiaron la actividad proteolítica de 48 cepas de Micrococáceas aisladas de jamón ibérico, utilizando como sustratos: caseína, gelatina y miosina, observando que solamente 6 cepas mostraron actividad frente a la caseína y ninguna frente a la gelatina, mientras que 30 redujeron en más de un 70% la intensidad de la banda de

miosina. Así mismo, indicaron que las cepas de *S. xylosus* aisladas eran las que mayor actividad proteolítica presentaban.

En nuestro caso, la mayoría de las cepas de *Staphylococcus* presentaron actividad hidrolítica frente a la gelatina excepto la única cepa estudiada de la especie *S. lentus*. Por el contrario, 3 cepas de *M. varians* y 4 de *M. nishinomiyaensis* no demostraron actividad proteolítica. De la Rosa *et al.* (1990) han observado resultados similares en relación con estas dos especies, ya que solamente son proteolíticas un 6% de las cepas de *M. nishinomiyaensis* y un 44% de *M. varians*. Estos resultados podemos considerarlos similares a los obtenidos por diversos investigadores, en los que se pone de manifiesto una amplia variabilidad, incluso dentro de la misma especie, en el comportamiento de las distintas cepas.

De las 369 cepas de Micrococáceas aisladas de la sal de salazonado, todas menos 36 (9,76%) fueron capaces de reducir los nitratos a nitritos según el test incorporado en las galerías de identificación ATB 32 STAPH.

Aunque son diversos los autores que han estudiado esta propiedad de un modo cualitativo en las Micrococáceas, no todos expresan sus resultados, habida cuenta que fundamentalmente la realizan con la finalidad, en unión de otras pruebas, de identificar las especies. Carrascosa y Cornejo (1991), observaron que el 76,43% de las Micrococáceas aisladas del jamón español, curado por un proceso lento lento, reducían los nitratos a nitritos. Cornejo y Carrascosa (1991) en jamón español sometido a un curado por un procedimiento rápido, observaron un porcentaje ligeramente inferior (63,75%). Comi *et al.* (1992) indican que de 132 cepas de Micrococáceas aisladas de embutidos el 84,85% poseen esta propiedad.

En definitiva pues, el comportamiento del conjunto de cepas estudiadas por nosotros es similar al observado por los citados autores.

En relación con el análisis cuantitativo de la capacidad reductora de nitratos, en las 24 cepas específicamente estudiadas y cuando la cantidad de estas sales en el medio fue de 500 ppm, 8 cepas de *Micrococcus* liberaron entre el 2 y el 4% de nitrito, mientras que las cuatro restantes originaron cantidades inferiores al 1%. Resultados similares han sido observados en *Micrococcus* aislados de chorizos por Selgas (1988), si bien en su caso, se observó una mayor variabilidad en el comportamiento de las cepas. Vignolo *et al.* (1988) observaron liberaciones de nitrito ligeramente inferiores en 23 cepas de *M. varians*, que oscilan entre el 1 y el 2% aproximadamente, cuando la tasa de nitrato fue de 1000 ppm.

En cuanto a las especies de *Staphylococcus*, 7 cepas originaron cantidades superiores a un 2,6% de nitrito, mientras que las 5 restantes dieron lugar a cantidades entre el 0,5 y el 1,4%. No hemos encontrado en la bibliografía datos con los que comparar nuestros resultados en relación con la capacidad reductora de los nitratos de los estafilococos.

Cuando se utilizaron 200 ppm de nitratos en el medio, 6 cepas de estafilococos y 5 de micrococcos originaron entre 1 y 3,75% de nitritos, las 12 restantes ocasionaron menos de un 1%.

Teniendo en cuenta estos resultados, similares a los obtenidos por los autores citados, además de los bajos recuentos de micrococáceas observados y de la escasa psicofilia de las cepas, es probable que la reducción de nitratos a nitritos, aunque aceptable "in vitro", tenga lugar de una manera excesivamente lenta durante la fase de salazonado de los jamones crudo-curados.

En relación con la inhibición del crecimiento microbiano ocasionado por la adición de nitritos al medio hemos observado que las 24 cepas estudiadas no se ven inhibidas por concentraciones de hasta 150 ppm y que a 200 ppm la mayoría presentan un buen crecimiento. No hemos encontrado en la bibliografía consultada estudios similares, si bien Cantoni (1964) observó en 5 cepas de "Micrococci" aisladas de la salmuera de la bresaola, que solo veían inhibido su crecimiento a partir de 2000 ppm de nitrito en el medio de cultivo. Carrascosa y Cornejo (1991) y Cornejo y Carrascosa (1991) observaron que un número importante de micrococáceas aisladas del jamón curado español crecían a 34°C y 4°C en presencia de 100 ppm de nitritos y un 10% de cloruro sódico.

En definitiva parece pues evidente que la presencia de nitritos en la sal de salazonado, a las concentraciones normalmente utilizadas en la práctica industrial, no significa un obstáculo en el crecimiento de las micrococáceas presentes.

V. CONCLUSIONES

1ª En la sal de curado utilizada en el salazonado de jamones crudocurados de cerdo ibérico y cerdo blanco el grupo microbiano predominante es el de las Micrococáceas, generalmente en niveles inferiores a 4 log ufc/g. También se ha puesto en evidencia en algunas muestras de sal la presencia de levaduras, hongos y flora ácido-láctica.

No se observaron grandes cambios en los recuentos de estos grupos microbianos a lo largo del período de vida útil de la sal durante el proceso de elaboración del jamón.

Los bajos recuentos de micrococáceas observados sugieren que las acciones de este grupo microbiano durante el período de utilización de la sal deben ser limitadas.

2ª Se ha observado, al igual que otros autores, en el procedimiento de identificación de las Micrococáceas, un número relativamente importante de cepas de clasificación dudosa, más apreciable en el caso de las especies del género *Micrococcus*. Así mismo, se ha apreciado un comportamiento atípico en algunas de las cepas tanto de las especies del género *Micrococcus* como de *Staphylococcus* al ser sometidas a las pruebas de fermentación/oxidación de la glucosa y crecimiento en anaerobiosis.

3ª En ambos tipos de sal predominan las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* sobre las de *Micrococcus*.

En la sal de curado de cerdo ibérico las especies de *Micrococcus* abundantes son: *M. Iylae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. variaos* y *M. roseus*. En la de cerdo blanca: *M. Iylae*, *M. luteus*, *M. nishinomiyaensis* y *M. roseus*.

En ambos tipos de sal las tres especies más abundantes de estafilococos son: *S. xylosus*, *S. equoram* y *S. saprophyticus*.

No se ha observado en ninguna de las muestras analizadas la presencia de *S. aureus*.

4^a Los distintos parámetros calculados a partir del estudio del efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano de 24 cepas (12 micrococcos y 12 estafilococos), representativas de las especies más abundantes presentes en la sal, pusieron en evidencia una baja psicofilia de todas las cepas.

5^a Las 24 cepas estudiadas mostraron una actividad lipolítica moderada frente a la grasa de cerdo. Solamente 5 cepas de estafilococos presentaron actividad proteolítica frente a la gelatina, mientras que 11 de micrococcos desarrollaron dicha actividad.

6^a Se observó una gran variabilidad en los valores de actividad de agua mínima de crecimiento (regulada por la adición al medio de cultivo de distintas concentraciones de sal) para las distintas cepas; aunque la mayoría deja de crecer a valores de a_w , superiores a 0,865. Los estafilococos presentaron un mejor crecimiento en presencia de sal que los micrococcos.

7^a La mayoría de las cepas de Micrococáceas presentan una aceptable capacidad de reducir los nitratos a nitritos "in vitro", aunque en las condiciones naturales los bajos recuentos de esta familia, su escasa psicofilia y la baja actividad de agua de la sal, deben limitar en gran medida dicha reducción.

8^a La presencia de nitritos hasta una concentración de 150 ppm no afecta al crecimiento de las 24 cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* estudiadas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-El Malek y Gibson, T.** (1948). Studies on the bacteriology of milk. II. The Staphylococci and Micrococci of milk. *J. Dairy Res.*, 15, 249.
- Alifax, R.** (1979). Etude de la lipolyse chez quelques levures isolees des denrees alimentaires variees. *Ann. Technol. Agric.*, 28, 255.
- Anónimo**, (1985). Análisis de Alimentos. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- A.P.H.A.** (1963). "Diagnostic procedures and reagents". A.P.H.A. Inc., New York, 4 th. Ed.
- Archer, G.L. y Tenenbaum, M.J.** (1980). Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* in patients undergoing cardiac surgery. *Antomicrob. Agents Chemother.*, 17: 269.
- Archer, G.L., Vishnavski, N. y Stiver, H.G.** (1982). Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with prothetic valve endocarditis. *Infect. Immun.*, 35: 627.
- Bacus, J.** (1986). Cured Meats. En "Utilization of Microorganisms in Meat processing" (A. N. Sharpe, Eds.). Research Studies, Press, LTD. USA.
- Baird-Parker, A.C.** (1962). The occurrence and enumeration, according to a new classification, of Micrococci and Staphylococci in bacon and on human and pig skin. *J. Appl. Bacteriol.*, 25: 352.
- Baird-Parker, A.C.** (1974). The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. *Annals of the New York. Academy of Sciences*, 236, 6.
- Baird-Parker, A.C.** (1979). Methods for identifying staphylococci and micrococci. En "Identification Methods for Microbiologists", (Eds. F. A. Skinner and D. W. Lovelock). Academic Press. London.

- Baldellon, CH. y Megraud, F.** (1985). Characterization of Microcococaceae strains isolated from the human urogenital tract by the conventional scheme and a micro-method. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 474.
- Baldini, P. y Raczynski, R.G.** (1979). Proc. Int. Meeting Microbiol. Technol. Tobiani Bagni, Parma. 107
- Baldini, P., Bernardi, E.P. y Raczynski, R.** (1977). "Indagini sul prosciutto tipico di Parma influenza della fase de salagione sull'evoluzione dei parametri chimico-fisici e della popolazione batterica. *Ind. Conserve*, 52, 16.
- Banwart, G.J.** (1981). *Basic Food Microbiology*. Avi Publish. Comp. Inc., Westport, Conneticut
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Parolari, G., Virgili, R., Buttini, R., Careri, M. y Mangia, A.** (1992). Flavor compound of dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2389.
- Barbut, S., Josephson, D.B. y Maurer, A.J.** (1985). Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *J. Food Sci.*, 50, 1356.
- Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C. y Talon, R.** (1993a). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Sci.*, 35, 275.
- Berdagué, J.L., Bonnaud, N., Rousset, S. y Touraille, C.** (1993b). Influence of pig cross breed on the composition volatile compound content and flavour of dry-cured ham. *Meat Sci.*, 34, 119.
- Bergan, T. y Kocur, M.** (1982). *Stomatococcus mucilaginosus* gen. nov. sp. nov. ep. rev., a member of the family Micrococcaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20; 107.
- Berger, R.G., Macku, C., German, J.B. y Shibamoto, T.** (1990). Isolation and identification of dry salami volatiles. *J. Food. Sci.*, 55, 1239.
- Bersani, C., Cantoni, C. y D'Aubert, S.** (1991). Osservazioni sugli Staphylococci coagulasi-nevativi (CNS) presenti negli insaccati crudi stagionati. *Ind. Alim.* XXX, 12.
- Beuchat, L.R.** (1983). Influence of A_w on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *J. Food Protect.*, 46, 135.
- Bohacek, J., Kocur, M. y Martinec, T.** (1965). Deoxyribonucleic acid base composition of *Micrococcus roseus*. *Antonie van Leuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, 35, 185.
- Bollgren, I., Nord, C.E. y Vaclavinkova, V.** (1981). Characterization of Coagulase Positive and Coagulase Negative staphylococci in the periurethral flora of adult women. *En*

“Staphylococci and Staphylococcal Infections” (Jeljaszewucz Ed.). Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, N.Y.

Buscailhon, S., Berdagué, J.L. y Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of french dry-cured ham. *J. Sci. Food Agric.*, 63, 69.

Buscailhon, S., Berdagué, J.L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C. y Monin, G. (1994). Relations between compositional traits and sensory qualities of french dry-cured ham. *Meat Sci.*, 37, 229.

Buttiaux, R., Beerens, H. y Tacquet, A. (1974). *Manual de techniques bacteriologiques.* (Flammarion Médecine-Sciences Ed.). París.

Buzzini, P., Rossi, J., Geranio, N., Tozzi, G. y Morosi, A. (1994). Fermented sausages produced in Umbria (Italy): Chemical, Microbiological and sanitary characteristics. *Microb. Alim. Nut.*, 12, 255.

Cantoni, C. (1964). Ricerche sulla flora microbica delle salmoie delle bresaola. *Arch. Vet. Ital.*, 15, 81.

Cantoni, C. y Calcinardi, C. (1967). Studi sul processo di maturazione delle bresaola. *Arch. Vet. Ital.*, 18, 49.

Cantoni, C. y Pizzo, P. (1980). Staphylococci coagulasi-negativi negli insaccati. *Ind. Aliment.*, 19, 99.

Cantoni, C., Molnar, M.R., Renon, P. y Calcinardi, C. (1967). Ricerche sulla microbiologia e la composizione chimica delle salamoie di coppe. *Arch. Vet. Ital.*, 18, 61.

Cantoni, C., Bianchi, M.A., D'Aubert, S. y Renon, P. (1968). Microbiologia e biochimica delle salamoie e microbiologia dei prosciutti da cuocere. *Arch. Vet. Ital.*, 19, 401.

Carrasco, M., Scarinci, H.E., Umansky G.N. y Simonetta, A.C. (1991). Technological properties of *Lactobacillus plantarum* and *Micrococcus* sp. strains in dry sausage ripening. *Microbiol. Alim. Nutr.* 9, 223.

Carrascosa, A.V. y Cornejo, I. (1991). Characterization of Micrococcaceae strains selected as potential starter cultures to spanish dry cured ham processes. 2. Slow process. *Fleischwirtsch.*, 71, 1187.

Carrascosa, A.V., Marín, M.E. y Cornejo, I. (1989). "Jamón serrano. Cambios microbiológicos y físico-químicos durante el curado lento". *Alimentaria*, 206, 15.

- Carrascosa, A.V., Marín, M.E., Avendaño, M.C. y Cornejo, I.** (1988). "Jamón serrano. Cambios microbiológicos y físico-químicos durante el curado rápido". *Alimentaria*, 194, 9.
- Comi, G., Cantoni, C. y Celori, F.** (1986). Considerazioni sugli stafilococchi coagulasi negativi degli insaccati crudi stagionati. *Ind. Aliment.*, 25, 378.
- Comi, G., Citterio, B., Manzano, M., Cantoni, C. y Bertoldi, M.** (1992). Evaluation and characterization of Micrococcaceae strains in Italian dry fermented sausages. *Fleischwirtsch.*, 72, 1679.
- Comi, G., Boschella, O., Conte, L. y Manzano, M.** (1995). Lipolytic activity of Micrococcaceae-strains isolated from dry sausages. *Fleischwirtsch.*, 75, 1153.
- Cornejo, I. y Carrascosa, A.V.** (1991). Characterization of Micrococcaceae strains selected as potential starters cultures in spanish dry-cured ham process. I. Fast process. *Fleischwirtsch.*, 71, 99.
- Cornejo, I., Carrascosa, A.V., Marín, M.E. y Martín, P.J.** (1992). Considerations about the origin of microorganisms that growth on the deep muscular tissues of dry-cured spanish hams during processing. *Fleischwirtsch.*, 72, 66.
- Croizet, F., Denoyer, C., Tran, N. y Berdagué, J.L.** (1992). Les composés volatils sur saucisson sec. Evolution au cours de la maturation. *Viandes Prod. Carnés*, 13, 167.
- Cross, C.K. y Ziegler, P.A.** (1965). A comparison of the volatile fractions from cured and uncured meat. *J. Food Sci.*, 30, 610.
- Cruickshank, R.** (1965). "Medical Microbiology", 14 th Ed. E&S., Livingstone Ltd., Edimburg, U.K.
- Curry, J.C. y Borovian, G.E.** (1976). Selective medium for distinguishing micrococci from staphylococci in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 4, 455.
- Chandler, R.E. y Mc Meekin, T.A.** (1989). Modelling the growth response of *Staphylococcus xylosus* to changes in temperature and glycerol concentration/water activity. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 543.
- Chang, I. y Watts, B.M.** (1950). Some effects of the salt and moisture on rancidity in fats. *Food Res.*, 15, 313.
- Chen, C.C., Pearson, A.M., Gray, J.I. y Merkel, R.A.** (1984). Effects of salt and some antioxidants upon the TBA numbers of meat. *Food Chem.*, 14, 167.

- Chirife, J., Ferro Fontán, C. y Scorza, C.O.** (1981). The intracellular water activity of bacteria in relation to the water activity of the growth medium. *J. Appl. Bacteriol.*, 50, 475.
- Chirife, J. y Resnik, S.** (1984). Unsaturated salt solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. *J. Food Sci.*, 49, 1486.
- Chizzolini, R., Rosa, P. y Novelli, E.** (1993). Biochemical and microbiological events of Parma ham production technology. *Microbiología*, 9, 26.
- Christian, J.H.B.** (1980) Specific solute effects on microbial water relations. En "Water Activity: Influences on Food Quality", (L.B. Rockland y G.F. Stewart, Eds.). Academic Press. New York.
- Dainty, R. y Blom, H.** (1995). Flavour chemistry of fermented sausages. En "Fermented Meats". (Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. Eds.) Blackie Academic and Professional. Glasgow.
- Daporta, P.** (1988). Microorganismos de interés tecnológico, con especial referencia a Micrococcaceae, en chorizos de la variedades "Cantimpalos" y "cerdo ibérico". "Tesina de licenciatura". Universidad de León, León, España.
- Delarras, C.** (1981). Etude taxonomique des Micrococcaceae. Thèse de Doctorat d'Etat, U.E.R. de Sciences Exactes es Naturelles de l'Université de Clermont-Ferrand II.
- Delarras, C.** (1991). Comparaison de l'identification de staphylocoques isolés d'aliments et d'origines diverses par trois microméthodes. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 9, 51.
- Dellaglio, F.S., Torriani, A., Sansidoni, F., Golinelli, D., y Termini, G.** (1984). Caratterizzazione dei batteri lattici nelle prime fasi di stagionatura del prosciutto di San Daniele. *Ind. Aliment.*, 23, 672.
- Dempster, J.F.** (1973). Curing Meat products. *Proc. Biochem. March*, 25.
- Devaux, J.P.** (1977). Etude de la reproductibilité d'une galerie expérimentale d'identification des Micrococcaceae. Rapport de stage. Laboratoire de Recherche API, 28390 La Balme Les Groutes, France.
- Dismukes, W.E., Karchmer, A.W., Buckley, M.J., Austen, W.G. y Swartz, M.N.** (1973). Prosthetic valve endocarditis: Analysis of 38 cases. *Circulation*, 48: 365.
- Dodds, K.L.** (1989). Combined effects of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked vacuum-packaged potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 656.

- Doeringer, R.H. y Dugan, P.R.** (1973). Growth relationship between the blue-green alga *Anacystis nidulans* and *Sarcina flava* in mixed culture. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- Dumont, J.P., Mouloud, M. y Goutefongea, R.** (1990). En "Flavor Science and Technology". (Eds. Bessiere, Y. y Thomas, A.F. John Wiley y Sons). Chichester, U.K.
- El Khateib, T., Schmidt, U. y Leistner, L.** (1987). Mikrobiologische stabilität von türkischer pastirma. *Fleischwirtsch.*, 67, 101.
- Ellis, R., Currie, G.T., Thornton, F.E., Bollinger, N.C. y Gaddis, A.N.** (1968). The prooxidant activity of sodium chloride on pork tissue. *J. Food Sci.*, 33, 555.
- Encinas, J.P.** (1993). Identificación de riesgos microbiológicos y puntos críticos durante la elaboración y maduración de embutidos crudo fermentados. "Tesis doctoral". Universidad de León, León. España.
- Evans, J.B. y Kloos, W.E.** (1972). Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating *Staphylococci* from *Micrococci*. *Appl. Microbiol.*, 23, 326.
- Evans, J.B., Bradford, W.L. y Niven, C.F.** (1955). Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and the *Staphylococcus*. *International Bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy*. 5, 61.
- Falk, D. y Guering, S.J.** (1983). Differentiation of *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. with the Taxo A bacitracin disk. *J. Clin. Microbiol.*, 18, 719.
- Faller, A. y Schleifer, K.H.** (1981). Modified oxidase and benzidine tests for separation of staphylococci and micrococci. *J. Clin. Microbiol.*, 13, 1031.
- Fey, H.** (1978). "Compendio de bacteriología general médica.". Ed. Acribia. Zaragoza.
- Fischer, U. y Schleifer, K.H.** (1980). Zum vorkommen der Grampositiven katalase positiven kokken in Rohwurst. *Fleischwirtsch.*, 60, 1046.
- Francisco, J.J., Gutiérrez, L.M., Menes, I., García, M.L., Díez, V. y Moreno, B.** (1981). Flora microbiana del jamón crudo-curado. *Anal. Bromatol.*, 32, 259.
- Freny, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont P.A.D., Nervi, C. y Fleurette, J.** (1988). *Staphylooccus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *J. Syst. Bacteriol.*, 38, 168.
- Frey, W.** (1983). Starter cultures for raw sausage production. *Fleischerei*, 34, 67.

- Froehlich, D.A., Gullet, E.A. y Osborne, W.R.** (1983). Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *J. Food Sci.*, 48, 152.
- García, I.** (1994). "Maduración de la cecina de vacuno: Parámetros químicos y microbiológicos". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Gardner, G.A.** (1982). Microbiology of processing: bacon and ham. En: "Meat Microbiology". (M.H. Brown Ed.). Appl. Sci. Publishers. London.
- Gardner, G.A. y Patton, J.** (1978). The bacteriology of bacon curing brines from multi-needle injection machines. 24 Europäisches Fleischforscherkongress, Kulmbach.
- Gemmel, C.G. y Dawson, J.E.** (1982). Identification of coagulase negative Staphylococci with the API System. *J. Clin. Microbiol.*, 16, 874.
- Giger, O., Charilaou, C.C. y Cundy, K.R.** (1984). Comparison of the API STAPH-IDENT and DMS Staph-Tract Systems with conventional methods used for the identification of coagulase negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 19, 68.
- Gill, C.O., Leet, N.G. y Penney, N.** (1984). Structural changes developing with rigor that facilitate bacterial invasion of muscle tissue. *Meat Sci.*, 10, 265.
- Giolitti, G., Cantoni, C., Bianchi, M., Renon, P. y Beretta, G.** (1971a). "Microbiologia e cambiamenti nei prosciutti crudi durante la stagionatura. *Arch. Vet. Ital.*, 22, 61.
- Giolitti, G., Cantoni, C., Bianchi, M., Renon, P. y Beretta, G.** (1971b). Microbiology and chemical changes in raw hams of Italian type. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 51.
- Glass, K. y Doyle, M.P.** (1991). Relationship between water activity of fresh pasta and toxin production by proteolytic *Clostridium botulinum*. *J. Food Protect.*, 54, 162.
- Gould, G.W.** (1985). Osmoregulation: is the cell just a simple osmometer? The microbiological experience, in A Discussion Conference: Water Activity: A Credible Measure of Technological Performance and Physiological viability? Faraday Div., R. So. Chem. Girton College, Cambridge, England.
- Gould, G.W.** (1988). Interference with homeostasis-food, En "Homeostatic mechanisms in microorganisms". (J.G. Banks, R.T.G., Board, G.W. Gould, and R.W. Mittenbury. Eds). Bath University Press. England.
- Gould, G.W. y Christian, J.H.B.** (1988). Characterization of the state of water in foods-biological aspects, En "Food Preservation by Moisture Control", (C.C. Seow. T.T. Teng. and C.H. Quah, Eds.) Elsevier, New York.

- Graham, P.P. y Blumer, T.N.** (1971). Bacterial flora of prefrozen dry-cured ham at three processing time periods and its relationship to quality. *J. Milk Food Technol.*, 34, 586.
- Gray, J.I. y Pearson, A.M.** (1984). Cured meat flavour. *Adv. Food Res.*, 29, 1.
- Hajek, V., Devriese, L.A., Mordarski, M., Goodfellow, M., Pulverer, G. y Varaldo, P.E.** (1986). Elevation of *Staphylococcus hyicus* subs. *chromogenes* to species status: *Staphylococcus chromogenes* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 8, 169.
- Harrigan, W.F. y McCance, M.E.** (1966). *Laboratory Methods in Microbiology*. London. England.
- Harrigan, W.F. y McCance, M.E.** (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press. London.
- Harrigan, W.F. y McCance, M.E.** (1986). *Métodos de laboratorio en microbiología*. Ed. Academia. León.
- Hess, E., Breer, C. y Lott, G.** (1976). Die Entwirkung der Mikroflora des dindenfleisches. *Fleischwirtsch.*, 5, 697.
- Hinrichsen, L.L., Montel, M.C. y Talon, R.** (1994). Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio* sp.(168) isolated from Danish bacon curing brines. *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 115.
- Hocking, A.D.** (1988). Strategies for microbial growth at reduced water activities. *Microbiol. Sci.*, 5, 280.
- Hernández, E. y Huerta, T.** (1993). Evolución de los parámetros microbiológicos del jamón curado. *Microbiología*, 9, 10.
- Huerta, T., Hernández, J. Guamis, B. y Hernández, E.** (1988). Microbiological and physico-chemical aspects in dry-salted Spanish ham. *Zentralbl. Mikrobiol.*, 143, 475.
- Hugas, M y Monfort J.M.** (1986). Microbial evolution during the curing of Spanish serrano hams. The influence of some preservatives on the microbial flora. Proc. 32th Europ. Meet. Meat Res. Work, Ghent Belgium.
- Hugh, R. y Leifson, E.** (1953). The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66, 24.
- Hussain, Z., Sotakes, L., Stevens, D.L., Schieven, B.C., Lanningan, R. y Jones, C.** (1986). Comparison of the Microscan System with the API STAPH-IDENT System for

species identification of coagulase negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 126.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1981). *Microorganisms in Foods. II. Sampling for Microbiological Analysis*. University of Toronto Press. Toronto.

Igene, J.O., Yamauchi, K., Pearson, A.M. y Gray, J.I. (1985). Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over flavour (WOF) in cured meat. *Food Chem.*, 18, 1.

Ingraham, J.L. (1958). Growth of Psychrophilic Bacteria. *J. Bacteriol.*, 76, 75.

Ingram, M. (1958). The general microbiology of bacon-curing brines with special reference to methods of examination. En "The Microbiology of Fish and Meat Curing Brines". (Eddy B.P. Ed.), HMSO, London.

Ingram, M. (1962). Microbiological principles in prepacking meats. *J. Appl. Bacteriol.*, 25, 259.

Jensen, L.B. (1954). En "Microbiology of meats". The Garrard Press. Champaign.

Johansson, G., Berdagué, J.L., Larson, M., Tran, N. y Borch, E. (1994). Lipolysis, Proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *P. pentosaceus* y *S. xylosum*. *Meat Sci.*, 38, 203.

Jones, A. y Richard, T. (1952). Nighth Blue and victoria as indicators in lipolysis media. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, 15, 82.

Kemp, J.D., Langlois, B.E. y Fox, J.D. (1978). Composition quality and microbiology of dry-cured hams produced from previously frozen green hams. *J. Food Sci.*, 43, 860.

Kemp, J.D., Langlois, B.E. y Johnson, A.E. (1982). Effects of pre-cured freezing and thawing on the microflora, Fact characteristics and palatability of dry-cured ham. *J. Food Prot.*, 45, 244.

Kitchell, A.G. (1962). Micrococci and coagulase negative staphylococci in cured meats and meat products. *J. Appl. Bacteriol.*, 25, 416.

Kloos, W.E. (1980). Natural population of genus *Staphylococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34, 559.

- Kloos, W.E. y Musselwhite, M.S.** (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.*, 30, 381-395.
- Kloos, W.E. y Schleifer, K.H.** (1975b). Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1, 82.
- Kloos, W.E. y Wollsholl, J.F.** (1982). Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH IDENT system. *J. Clin. Microbiol.*, 16, 509.
- Kloos, W.E., Tornabene, G., Schleifer, K.H.** (1974). Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* y *Micrococcus kristinae*. *Int. Syst. Bact.*, 24, 79.
- Kloos, W.E., Zimmerman, R.J. y Smith, R.F.** (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 53.
- Kocur, H., y Mortensen, N.** (1967). Comparison of methods for stimation of anaerobic production of acid from glucose and mannitol in staphylococci and micrococci. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 71, 145.
- Kocur, H., Bergan, T. y Mortensen, N.** (1971). DNA base composition of Gram-positive cocci. *J. Gral. Microbiol.*, 69, 167.
- Kocur, M., Schleifer, K.H. y Kloos, W.E.** (1975). Taxonomic status of *Micrococcus nishinomiyaensis* Oda 1935. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25, 290.
- Kotzekidou, P.** (1992). Identification of staphylococci and micrococci isolated from a intermediate moisture meat product. *J. Food Sci.*, 57, 249.
- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C. y Hoeprieh, C.** (1971a). Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21, 585.
- Lachica, R.V.F., Hoeprieh, P.D. y Genigeorgis, C.** (1971b). Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other coagulase-positive cocci. *Appl. Microbiol.*, 21, 823.
- Langlois, B.E. y Kemp, J.D.** (1974). Microflora of fresh and dry-cured ham. *J. Animal Sci.*, 38, 525.
- Larpen-Gourgau, M., Micaux, O., Leterme, F., Boissonnet, B., Sirami, J. y Bonnin, P.** (1994). Selection des staphylocoques es des lactobaciles responsables de la fermentation du saucisson sec. *Viandes Prod. Carnés*, 15, 13.

- Leistner, L. (1958).** Bakterielle Vorgänge bei der Pökelfleischherstellung von Fleisch. II. Günstige Beeinflussung von Farbe, Aromen und Konservierung der Pökelfleische durch Mikroorganismen. *Fleischwirtsch.*, 4, 226.
- Leistner, L. (1959).** Die Keimarten und Keimzahlen von Pökellaken. *Die fleischwirtschaft*, 11, 726.
- Leistner, L. y Rodel, W. (1975).** The significance of water activity for microorganisms in meats. En "Water Relations of Foods". (R.B. Duckworth, Ed.), Academic Press, New York.
- Leistner, L., Rodel, W. y Krispien, K. (1981).** Microbiology of meat products in high and intermediate moisture ranges. En "Water Activity: Influences on Food Quality". (L.B. Rockland y G.F. Stewart, Eds.). Academic Press, New York.
- Lillard, D.A. y Ayres, J.C. (1969).** Flavor compounds in country cured hams. *Food Technol.*, 23, 117.
- Lücke, F.K. (1985).** Fermented sausages. En "Microbiology of Fermented Foods", Vol. II. (Brian J.B. Wood, Ed.). Elsevier Applied Science, London, England.
- Mac Donald, B., Gray, J.I. y Gibbins, L.N. (1980).** Role of nitrite in cured meat flavour: Antioxidant role of nitrite. *J. Food Sci.*, 45, 893.
- Marín, M.E., Carrascosa, V. y Cornejo, Y. (1993).** Microflora saprofita y patógena en la elaboración de jamón serrano. *Alimentaria*, 93, 31.
- Marrie, T.J., Kwan, C., Noble, M.A., West, A. y Duffield, J. (1982).** *Staphylococcus saprophyticus* as cause of urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.*, 16, 427.
- Massacra, G. (1964).** Ricerche sulla composizione chimica delle salamoie delle bresaole. *Arch. Vet. Ital.*, 15, 101.
- Mercier, G.P., Schmitt, R.E. y Schmidt-Lorenz, W. (1989).** Untersuchungen über die Reifung von Bündnerfleisch. *Fleischwirtsch.*, 69, 1593.
- Mescle, J.F. y Zucca, J. (1982).** Origen de los microorganismos en los Alimentos. En "Microbiología Alimentaria". (Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. y Zucca, J. Coord.) Ed. Acribia. Zaragoza.
- Molina, I. y Toldrá, F. (1992).** Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *J. Food Sci.*, 57, 1308.

- Molina, I., Silla, H., Flores, J. y Monzo, J.L.** (1989). Study of the microbial flora in dry-cured ham. II. Micrococcaceae. *Fleischwirtsch.*, 69, 1433.
- Molina, I., Nieto, P., Flores, J., Silla, H. y Bermell, S.** (1991). Study of the microbial flora in dry-cured ham. 5. Lipolytic activity. *Fleischwirtsch.*, 71, 906.
- Montel, M.CH., Talon, R., Cantonnet, M y Fournaud, J.** (1992). Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 73.
- Mossell, D.A.A.** (1971). Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with foods. *J. Appl. Bacteriol.* 34, 95.
- Mossell, D.A.A.** (1983). Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. En "Food Microbiology advances and prospects". (T.A. Roberts y Skinner, F.A. Eds.) Academic Press. London.
- Morrisey, P.A. y Tichivangana, J.Z.** (1985). The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats. *Meat Sci.*, 14, 175.
- Mortensen, N. y Kocur, M.** (1967). Correlation of DNA base composition and acid formation from glucose of staphylococci and micrococci. *Act. pathol. Microbiol. Scand.*, 69, 455.
- Mottram, D.S., Croft, S.E. y Patterson, R.L.S.** (1984). Volatile components of cured and uncured pork: The role of nitrite and the formation of nitrogen compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 233.
- Mourey, A.** (1978). Données sur la quantité et la qualité des bactéries lipolytiques dans des produits à base de viande. *Ann. Nutr. Alim.*, 32, 843.
- Müller, W.D.** (1991). Curing and smoking. Are their healthier processes today than they used to be?. *Fleischwirtsch.*, 71, 61.
- Nottingham, P.M.** (1982). Microbiology of carcass meats. En "Meat Microbiology". (M.H. Brown Ed.). Appl. Sci. Publish. London.
- Nychas, G.J.E. y Archoudelos, J.S.** (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol. Symp., Suppl.*, 167S-188S.
- Ockerman, H.W., Blumer, T.N. y Craig, H.B.** (1964). Volatile chemical compounds in dry-cured ham. *J. Food Sci.*, 29, 123.
- Olson, D.G. y Rust, R.E.** (1973). Oxidative rancidity in dry-cured hams: Effect of low pro-oxidant and antioxidant salt formulations. *J. Food Sci.*, 38, 251.

- Ortíz de Apodaca, M.J., Selgas, M.D. y Ordóñez, J.A.** (1993). Efecto de la temperatura de incubación en el crecimiento de diferentes cepas de micrococcos aisladas de queso. *Rev. Esp. Tecnol. Aliment.*, 33, 657.
- Papa, F.y Grazia, L.** (1991). Studi e caratterizzazione di stafilococchi da "saline" dei prosciutti cotti. *Ind. Aliment.*, XXX, 834.
- Pearse, A.S., Humm, H.J. y Wharton, G.W.** (1942). Ecology of sand beaches at Beaufort, N.C. *Ecological Monographs*, 12, 137.
- Pirone, G. y Mangaelli, J.S.** (1990). Caratterizzazione di Micrococcaceae isolate da salami tipo Napoli. *Ind. Conserve*, 65, 220.
- Pohja, M.S.** (1960). Micrococci in fermented meat products. Classification and description of 171 different strains. *Acta Agralia Fennica*. 96, 1.
- Presidencia de Gobierno** (1981) Métodos químicos de análisis de carnes. Determinación de cenizas. B.O.E. (14-10-81).
- Presidencia de Gobierno** (1983). Decreto 404/1976, de 5 de marzo. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la sal y salmueras comestibles. B.O.E. (1-6-1983) 130.
- Price, L.G. y Greene, B.E.** (1978). Factors affecting panelists perceptions of cured meat flavour. *J. Food Sci.*, 43, 319.
- Prieto, M.** (1990). Asociaciones bacterianas que participan en la alteración de canales de ovino refrigeradas: Taxonomía, evolución e influencia de diversos factores. "Tesis Doctoral". Universidad de León, León. España.
- Prior, B.A., Kenyon, C.P., van der Veen, M. y Mildenhall, J.P.** (1987). Water relations of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 119.
- Raczynski, R.G., Spotti, E. y Tagliavini, A.** (1978). "Indagini sull prosciutto tipico di Parma influenza della fase di salagione sull'evoluzione dei parametri chimici-fisici e della popolazione batterica. Nota II". *Ind. Conserve*, 53, 11.
- Ramarathnam, N., Rubin, L.J. y Diosady, L.L.** (1991). Studies on meat flavor. 1. A quantitative and qualitative differences in uncured and cured pork. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 344.
- Rather, P.N., Davis, A.P. y Wilkinson, B.J.** (1986). Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase negative staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 858.

- Rheinbaben, K.E.V. y Hadlok, R.M.** (1979). Gattungsdifferenzierung von mikroorganismen der Familie Micrococcaceae aus Rohwürsten. *Fleischwirtsch.*, 59, 1321.
- Rheinbaben, K.E.V. y Hadlok, R.M.** (1981). Rapid distiction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. *Antonie van Leewenhoek*. 47, 41.
- Rheinbaben, K.E.v. y Seipp, H.** (1986). Studies in the microflora of raw ham with special reference to Micrococcaceae. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 9, 152.
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Sanabria, C., Bermúdez, E. y Asensio, M.A.** (1994). Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 329.
- Rodríguez, M.M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A.** (1995). Actividad proteolítica de micrococáceas aisladas de jamón ibérico. XV Congreso Nacional de Microbiología. S.E.M. Madrid.
- Rosypal, S., Rosypalova, A. y Horejs, J.** (1966). The classification of micrococci ans staphylococci based on their DNA base composition and Adansonian analysis. *J. Gen. Microbiol.*, 44, 281.
- Rosa de la M.C., Mohino, M.R., Mohino, M. y Mosso, M.A.** (1990). Characteristics of micrococci and staphylococci isolated from semi-preserved meat products. *Food Microbiol.*, 7, 207.
- Schleifer, K.H.** (1986). Family I Micrococcaceae. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2". (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharp y J.G. Holds, Eds.) 1003-1035. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Schleifer, K.H. y Kandler, O.** (1972). Peptidoglican types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 36, 407.
- Schleifer, K.H. y Kloos, W.E.** (1975a). A simple test for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1,337.
- Schleifer, K.H. y Kloos, W.E.** (1975b). Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three news species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25, 50.
- Schleifer, K.H. y Kloos, W.E.** (1976). Separation of staphylococci from micrococci. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Suppl.*, 5, 3.

- Schleifer, K.H. y Kocur, W.F.** (1973). Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. *Arch. Microbiol.*, 93, 65.
- Schleifer, K.H. y Krämer, E.** (1980). Selective medium for isolating staphylococci. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, Originale*, C1, 270-280.
- Schleifer, K.H. y Kroppenstedt, R.M.** (1990). Chemical and molecular classification of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 9S-24S.
- Schleifer, K.H., Meyer, S.A. y Rupprecht, M.** (1979). Relatedness among coagulase-negative staphylococci: deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. *Arch. Microbiol.*, 122, 93.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R. y Devriese, L.A.** (1984). *Staphylococcus arlettae* sp. nov.: three new coagulase-negative staphylococci from animals. *Syst. Appl. Microbiol.*, 5, 501.
- Schleifer, K.H., Geyer, U., Kilpper-Bälz, R. y Devriese, L.A.** (1983). Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos *et al.*) comb. to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos *et al.*) comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 5, 501.
- Schillinger, V. y Lücke, F.K.** (1989). Potentially useful microorganisms in used curing from raw ham manufacture. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kumlbach*, 103, 34.
- Schmidt, G.R., Mawson, R.F. y Siegel, D.G.** (1981). Functionality of protein matrix in comminuted meat products. *Food Technol.*, 35, 235.
- Schumacher-Perdreau, F., Pulverer, G. y Schleifer, K.H.** (1978). The phage adsorption test: A simple method for the differentiation between staphylococci and micrococci. *J. Infect. Dis.*, 138, 1219.
- Seager, M.S., Banks J.G., Blackburn, C. de W. y Board, R.G.** (1986). A taxonomic study of *Staphylococcus* spp. isolated from fermented sausages. *J. Food Sci.*, 51, 295.
- Seild, P.H. y Schleifer, K.H.** (1978). Rapid test for the serological separation of staphylococci from micrococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 479.
- Selgas, M.D.** (1985). Aptitud tecnológica del género *Micrococcus*: Selección de cepas iniciadoras."Tesis Doctoral". Facultad de Veterinaria Universidad Complutense. Madrid, España.
- Selgas, M.D., Sanz, B. y Ordóñez, J.A.** (1988). Selected characteristics of micrococci isolated from Spanish dry fermented sausage production. *Food Microbiol.*, 5, 185.

- Sesma, B. y Rodríguez-Burgos, A.** (1976). Estudio de la flora microbiana durante la maduración de embutidos. Y. Características de las especies de la familia Micrococcaceae aisladas de salchichón de Pamplona. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment., 16, 107.
- Shahidi, F., Rubin, L.J. y Wood, D.F.** (1988). Stabilization of meat lipids with nitrite free curing mixtures. Meat Sci., 22, 73
- Shewan,** (1951). Citado por Dempster, J.F. En Curing Meat Products. Proc. Biochem., 1973, 25.
- Sikes, A. y Maxcy, R.B.** (1980). Postmortem invasion of muscle food by a proteolytic bacterium. J. Food Sci., 45, 293.
- Silvestri, L.G. y Hill, L.R.** (1965). Agreement between deoxyribonucleic acid base composition and taxometric classification of Gram + cocci. J. Bacteriol., 90, 136.
- Silla, M.H., Innerarity, A. y Flores, J.** (1985). Characteristics of raw cured hams (Spanish ham) showing tyrosine crystals. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment., 25, 95.
- Silla, M.H., Molina, I., Flores, J. y Silvestre, D.** (1989). A study of the microbial flora of dry-cured ham. I Isolation and growth. Fleischwirtsch., 69, 1128.
- Silverman, G.J., Munsey, D.T., Lee, C. y Ebert, E.** (1983). Interrelationship between water activity, temperature and 5.5 percent oxygen on growth and enterotoxin A secretion by *Staphylococcus aureus* in precooked bacon. J. Food Sci., 48, 1783.
- Simonetti, P. y Cantoni, C.** (1983). Stafilococchi coagulasi negativi e maturazione degli insaccati crudi stagionati. Ind. Alimentari., 23, 262.
- Sloan, G.L., Robinson, J.M. y Kloos, W.E.** (1982). Identification of *Staphylococcus staphylolyticus*. NRRL 8-2628 as a biovar of *Staphylococcus simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol., 32, 170.
- Sofos, J.N.** (1983a). Effects of reduced salt (NaCl) levels on the stability of frankfurters. J. Food Sci., 48, 1684.
- Sofos, J.N.** (1983b). Effects of reduced salt (NaCl) levels on sensory and instrumental evaluation of frankfurters. J. Food Sci., 48, 1692.
- Solé, A.** (1978) "Estudio monográfico. El jamón serrano". A. Solé Ribas. Barcelona.
- Somavilla, J., Iñigo, B. y Arroyo, V.** (1973). Citado por Sesma y Rodríguez Burgos en Estudio de la flora microbiana durante la maduración de embutidos. I. Características

de las especies de la familia Micrococcaceae aisladas de salchichón de Pamplona. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment., 13, 307.

Souci, S.W., Fachmann, W. y Kraut, H. (1974). Die zusammensetzung der lebensmittel; Nährwert Tabellen. Wissenschaftliche verlagsgesellschaft mb H, stuttgart. Citado por: Sinell, H.J. y Hentschel, S. (1977). Fleischwirstsch., 57, 1317.

Soncini, G., Bianchi, M.A., Paleari, C., Traldi, C., y Cantoni, C. (1982). "Criteri per la scelta degli starters per insaccati crudi". Technol. Aliment., 9, 10.

Sperber, W.H. (1983). Influence of A_w on food borne bacteria, a review. J. Food Protect., 46, 142.

Stahnke, L.H. (1994). Aroma compounds from dried sausages fermented with *S. xylosus*. Meat Sci., 38, 39.

Stengel, G. (1990). Staphylococci. Fleischwirtsch., 70, 307.

Streby-Andrews, M.E. y Kloos, W.E. (1971). Amino acid auxotrophy in natural strains of *Micrococcus luteus*. Bacteriological Proceedings, 27.

Strong, D.H., Foster, E.M. y Duncan, C.L. (1970). Influence of A_w on the growth of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol., 19, 980.

Torriani, S., Di Bucchianico, R., Pattarini, F., Zabeo, G. y Dellaglio, F. (1994). Presenza e caratterizzazione biotecnologica di batteri lattici e Micrococcaceae negli insaccati abruzesi. Ind. Conserve, 69, 3.

Troller, J.A. y Stinton, J.V. (1975). Influence of water activity on growth and enterotoxin formation by *Staphylococcus aureus* in foods. J. Food Sci., 40, 802.

Troller, J.A. y Christian, J.H.B. (1978). En "Water activity and Food". Academic Press, New York.

Vaamonde, G., Chirife, J. y Scorza, O.C. (1982). An examination of the minimal water activity for *Staphylococcus aureus* aTCC 6538 P growth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. J. Food Sci., 47, 1259.

Varaldo, P.E., Kilpper-Balz, R., Biavasco, F., Satta, G. y Schleifer, K.H. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. Int. J. Syst. Bacteriol., 38, 436.

Varnam, A.H. y Grainger, J.M. (1973). Methods for the general microbiological examination of Wiltshire bacon curing brines. En "Sampling- Microbiological

Monitoring of Environments". (Board R.G. y Lovelock D. Eds.). Academic Press, London.

Venugopal, R.J., Ingham, S.C. y McCurdy, A.R. (1994). Identification of psychrotrophic Micrococcaceae spp. isolated from fresh beef stored under carbon dioxide or vacuum. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 167.

Vignolo, G.M., Pesce de Ruíz Holgado, A. y Oliver, G. (1988). Some physiological, biochemical and technological characteristics of Gram positive cocci isolated from cured meat products. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 6, 323.

Vösgen, W. (1992). Curing. Are nitrite and nitrate necessary or superfluous as curing substances?. *Fleischwirtsch.*, 72, 1675.

Wadström, T. y Rozdgonyi, F. (1986). Virulence determinants of coagulase-negative staphylococci. (Mardh, P.-A. y Schleifer, K.H Eds.). Stockholm: Alqvist y Wiksell.

Watts, J.L. y Nickerson, S.C. (1986). A comparison of the STAPH-IDENT and STAPH-TRAC systems to conventional methods in the identification of Staphylococci isolated from bovine udders. *Vet. Microbiol.*, 12, 179.

Wirth, F. (1989). Salting and curing of Kochwurst and cooked cured products. *Fleischwirtsch.*, 69, 1568.

ZoBell, C.E. y Upham, C. (1944). A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bulletin of Scripps Institute of Oceanography. University of California.* 5, 239.