



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DPTO. HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y  
FÍSICO-QUÍMICAS DEL CHORIZO DE CANTIMPALOS EN  
RELACIÓN CON SU PROCESO DE ELABORACIÓN Y  
MADURACIÓN**

Memoria presentada por  
**José Javier Sanz Gómez**  
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria

---



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**COMISIÓN DE DOCTORADO**

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN**

**Los Drs. Dña. M<sup>a</sup> Luisa García López y D. Andrés Otero Carballeira como Directores de la Tesis Doctoral: ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS DEL CHORIZO DE GANTIMPALOS EN RELACIÓN CON SU PROCESO DE ELABORACIÓN Y MADURACIÓN, realizada en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos por el Doctorando D. José Javier Sanz Gómez, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.**

**En León, a      de marzo del 2000**

Los Directores de la Tesis

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Luisa García López

Dr. Andrés Otero Carballeira



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

COMISIÓN DE DOCTORADO

**CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO**

**El Departamento de:** Higiene y Tecnología de los Alimentos.

**En su reunión del día**        **de marzo del 2000, ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de la lectura de la Tesis Doctoral titulada: ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS DEL CHORIZO DE CANTIMPALOS EN RELACIÓN CON SU PROCESO DE ELABORACIÓN Y MADURACIÓN, dirigida por los Doctores Dña. M<sup>a</sup> Luisa García López y D. Andrés Otero Carballeira y presentada por D. José Javier Sanz Gómez, ante este Departamento.**

**En León, a**        **de marzo del 2000**

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

EL SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: Dr Andrés Otero Carballeira

Dra. Teresa M<sup>a</sup> López Díaz

---

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, el autor fue beneficiario de una Beca de Investigación de la Junta de Castilla y León en materia de Agricultura y Ganadería, desde julio de 1989 a diciembre de 1992.

Parte de las investigaciones de esta memoria han sido financiadas por la CICYT, Proyectos ALI91-0515, ALI95-0132, y la Consejería de Cultura y Turismo de la Junta de Castilla y León.

---

---

*Somos una roca en la que el devenir de cada día deja su huella de escultor, en unas ocasiones la roca se siente orgullosa por el escultor que la esculpe, pero en otras la amargura llega a desgarrarla.*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento,

A la Dra., M<sup>a</sup> Luisa García López, y al Dr. Andrés Otero Carballeira por su labor de dirección de la presente Tesis, por su ayuda en la redacción de la misma, por la confianza puesta en mí para el desarrollo de este trabajo. Pero sobre todo por vuestra Amistad y apoyo, gracias.

A los Doctores Alonso Calleja, González Fandos, Prieto Maradona y Sierra Castrillo, que me introdujeron y ayudaron en el inquietante mundo del laboratorio y la Investigación. A la Dra. Rosario García Armesto por despertar en mí el interés por *Bacillus*, por su colaboración en la identificación de las cepas y por haber llevado a cabo los ensayos de patogenicidad en el Hanna Research Institute (Scotland, U.K).

A todos y cada uno de mis compañeros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, profesores, PAS y “Precarios” que en estos once años en los que he desarrollado mi actividad investigadora en esta Unidad, he tenido la oportunidad de contar con su apoyo y confianza, e hicieron más llevadero mi trabajo.

A los que esgrimieron sus “trabas” o “sus sacrificios” en determinados momentos, porque de esas situaciones difíciles e incómodas también se aprende, con amargura, pero se “aprende”.

A la Dra. Beatriz Andériz Morlanes, pues sin su apoyo en las primeras fases del desarrollo de esta Tesis, no la habría llevado a cabo.

A los industriales que amablemente nos recibieron y siempre estuvieron dispuesto a colaborar durante la fase de recogida de datos y muestras de esta Tesis.

A aquellas personas que día a día me demuestran su confianza, amistad y afecto y que desgraciadamente no puedo compartir con ellas nada más que algunos ratos.

A Nieves González Rodríguez por su amistad, apoyo y paciencia. A Victor M. Fernández Barata, que en las últimas etapas de la redacción de esta Memoria me ha brindado su inestimable, amistad, colaboración y ayuda en otros aspectos.

A la Dra. Concepción Román Blanco, Concha, por tu Amistad y apoyo tanto personal como profesionalmente.

A Roberto Rodríguez Pérez, por su ayuda en la preparación de esta memoria, sus enseñanzas de informática, su paciencia y sobre todo por su Amistad, gracias.

A mi madre, por su trabajo, sus sacrificios, su comprensión, apoyo, confianza, amor, preocupación sin los cuales no podría haber tenido esta formación académica, y a mis hermanos por estar siempre ahí, gracias.

A Ana, que es mi Vida, gracias.

---

---

A ANA,  
A MI FAMILIA

---

---

## **ÍNDICE**

**CAPÍTULO 1.** Introducción

**CAPÍTULO 2.** Normalización del chorizo de Cantimpalos.  
Materias primas, procesos y producto final.

**CAPÍTULO 3.** Bacterias acidolácticas

**CAPÍTULO 4.** *Micrococcaceae*

**CAPÍTULO 5.** Levaduras

**CAPÍTULO 6.** *Enterococcus*

**CAPÍTULO 7.** *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* y *Yersinia*

**CAPÍTULO 8.** Psicrotrofos, *Aeromonas* y *Listeria*

**CAPÍTULO 9.** Bacilos aerobios esporulados

**CAPÍTULO 10.** Conclusiones

**BIBLIOGRAFÍA**

---

#### UN POCO DE HISTORIA

"El destino de las naciones depende de su alimentación", (Anthelme Briant-Saravin, *Fisiología del gusto*).

"Bendito sea el Señor que nos da el bien más grande de nuestro cuerpo: el hambre santísima", (Benito Pérez Galdós, *Misericordia*).

#### DIVERSIDAD DE EMBUTIDOS

#### MICROBIOLOGÍA DE LOS EMBUTIDOS

#### ASPECTOS ECONOMICOS

#### OBJETIVOS

## CAPÍTULO 1.

# INTRODUCCIÓN



## UN POCO DE HISTORIA

Los procesos de salazonado y secado son las formas más antiguas de conservación de los alimentos. Inicialmente, grandes piezas de carne eran secadas bien en zonas frescas o incluso a pleno sol. Posteriormente, se comprobó como el uso de la sal sumada a la deshidratación aumentaba la vida útil de los despieces cárnicos e incluso mejoraba el aroma de aquéllos. Más adelante, se constató que trocear la carne en piezas más pequeñas, salazarlas e introducirlas en los intestinos de los animales aumentaba su conservabilidad y se mejoraban notablemente sus características organolépticas. Este parece ser el origen de los actuales embutidos (la palabra embutido deriva del término latín *salsus*, que significa sal y que era consumido por los antiguos babilonios, griegos y romanos, Pederson, 1971).

El conocimiento de este tipo de productos cárnicos es muy antiguo, y parece ser que ya en China hace unos 2500 años se elaboraba un tipo de embutido denominado “Lup Cheong”, si bien este producto no era fermentado y sólo se consumía cocido (Leistner y Dressel, 1986).

En la Odisea de Homero (900 a.C.) se cita por primera vez la cocción de carnes en tripas naturales. El salami se menciona casual y frecuentemente por escritores griegos. Parece ser que el origen de este embutido es griego.

Los antiguos romanos eran muy aficionados a los embutidos elaborados a base de carne fresca de cerdo sazonada con comino, laurel y pimienta. Este tipo de embutidos se identificó con festivales anuales orgiásticos, lupercales y florales, y arrastró una condena de la primitiva iglesia cristiana a causa de su asociación con corrupciones públicas, llegándose a prohibir su consumo en festejos por Constantino el Grande. Este fue otro tabú como el correspondiente a la carne de cerdo para los judíos, las vacas para los hindúes o la carne de caballo para los europeos.

En la Edad Media, la elaboración de embutidos llegó a ser un arte. Algunos de los primitivos elaborados llegaron a ser muy famosos como los *frankfurter* de Frankfurt. Es en esta época cuando se comienza a utilizar la sal común y los nitratos.

Varios de los embutidos más conocidos actualmente se desarrollaron en determinadas localidades europeas a causa de las condiciones climáticas locales, como ocurrió con las localidades de Candelario y Guijuelo (Salamanca) para el porcino y

Villarramiel (Palencia) para el equino. En el siglo XV existía un comercio regulado para los productos de charcutería en Barcelona y Sevilla.

En Italia, hace aproximadamente 270 años, parece ser que se “inventaron” los embutidos crudos-curados y posteriormente en Alemania. Un chacinero alemán, Butleh, comenzó la producción industrial de salami hace 220 años; y se estima que hace unos 125 años los charcuteros italianos iniciaron la producción industrial de salami Húngaro en Budapest.

La producción de embutidos crudos curados implica, aún hoy día, una tecnología imprecisa. Ello supuso y supone el mantenimiento y aparición de gran número de variedades nacionales, regionales y locales de este tipo de productos.

La tecnología se introdujo en Hungría en 1851 y se extendió a Estados Unidos con los inmigrantes de la Europa Central. Sin embargo, al contrario que en la industria quesera, el conocimiento de los principios de la fermentación de la carne se desarrolló lentamente y no fue hasta los años cuarenta (siglo XX) cuando se hicieron los primeros intentos para establecer las bases científicas del proceso de fermentación, siguiendo el desarrollo de los cultivos iniciadores. En los años 20 (siglo XX) unos pocos científicos sugirieron el uso de la inoculación de la carne con microorganismos nitrato-reductores y levaduras (Kurki, 1921). Hacia 1930 se observó que se producían en los embutidos fenómenos similares a los que se desarrollaban en el queso. Las primeras publicaciones científicas sobre la conveniencia de inocular la carne con cultivos iniciadores data de la década de los 50 (siglo XX): Niven (1961); Deibel y Niven (1958) y Niven *et al.* (1958); si bien, su uso no se extendió hasta 1970. Niven *et al.* (1958) propusieron el uso de *Pediococcus cerevisiae* y Niinivara (1955) el de *Micrococcus* M-53 para la fabricación de embutidos madurados. Desde entonces, una gran variedad de cepas pertenecientes a diferentes géneros de bacterias, levaduras y mohos se han ensayado con tal fin (Liepe, 1983).

#### LA DIVERSIDAD DE EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS.

Los embutidos crudos curados consisten en una mezcla de carne y grasa picadas, las cuales son mezcladas con sal, especias y algunos aditivos, introducidas en tripa natural o artificial, y colocadas durante un tiempo suficiente a temperatura y humedad adecuadas para conseguir su fermentación y secado. El producto final obtenido

generalmente es estable en ausencia de refrigeración y se consume sin tratamiento térmico previo.

Los embutidos fermentados se elaboran con una gran variedad de carnes. Así en Francia, Hungría e Italia (Leistner, 1992) se elaboran exclusivamente a partir de carne de cerdo, en Alemania las formulaciones clásicas eran a base de carne de cerdo y vaca y grasa de cerdo. En España, dependiendo del área geográfica se elaboran con carne de cerdo, vaca y cerdo, cabra y grasa de cerdo, jabalí, ciervo, corzo, etc. En los países de religión musulmana, por razones religiosas, como Turquía se elabora el “*soudjouk*”, un embutido a base de carne de vaca y grasa de cola (*fat-tailed*) de oveja, lo que le confiere un aroma característico. La grasa utilizada debe ser fresca y firme para evitar la aparición de olores a rancio, sobre todo en los productos de largo proceso de elaboración como puede ser el salami o los chorizos culares de Salamanca. En África, en diversas regiones los embutidos se elaboran a base de carne de cabra y vaca fundamentalmente, y grasa de oveja.

El uso de diferentes especias, además de contribuir al control de ciertos grupos microbianos, confiere al producto unas características organolépticas determinadas. Es habitual el uso de pimienta, pimentón, oregano, ajo, cardamón y macis entre otras. En el chorizo, cabe destacar la presencia en cantidades importantes (superiores al 2%) de pimentón.

Las condiciones de maduración (humedad relativa, temperatura) son importantes ya que van a dirigir el proceso de fermentación y por tanto determinar las características organolépticas, nutricionales, físico-químicas y microbiológicas del producto final. De manera que los parámetros humedad relativa (HR) y temperatura ( $T^a$ ) determinan la estacionalidad de los mismos en la elaboración artesanal. Así, se producen embutidos secos y completamente madurados en invierno y semisecos con elevada acidez y vida útil corta en los meses más cálidos. Pero con los avances tecnológicos y la utilización de cámaras de maduración con HR y  $T^a$  controladas permiten la elaboración de diferentes tipos de embutidos en cualquier época del año. Así se han desarrollado sistemas de control de procesos basados en la monitorización de la  $a_w$  en la superficie del embutido por medida de la temperatura exacta inmediatamente debajo de la superficie del embutido (Stiebing y Rödel, 1991).

Considerando la variedad de materias primas utilizadas, la variación geográfica y las condiciones climatológicas cabe esperar que la clasificación de estos productos sea complicada y difícil. Así, diversos autores han establecido distintas clasificaciones, si bien es problemático encuadrar en ellas algunos de los productos descritos en la bibliografía. Rocca e Incze (1989) consideran el criterio “duración del proceso de maduración-contenido de agua final- $a_w$  final”, estableciendo tres grupos: 1) embutidos para extender (*teewurst, frische mettwurst*), 2) embutidos loncheables de procesado corto (*summer sausage, thuringer*), y 3) embutidos loncheables de proceso largo (salami, *genoa*, chorizo, salchichón).

Otra clasificación (Varnam y Sutherland, 1998) los divide en secos y semisecos (y estos a su vez en extensibles y loncheables); esta división tiene su implicación en salud pública ya que *Trichinella* spp. es capaz de sobrevivir en embutidos semisecos, pero no en los secos.

En España existe una Norma de Calidad para embutidos crudos curados (Anónimo, 1980), que incluye variedades de chorizo y salchichón y un producto cárnico embutido de carne no picada (lomo embuchado). Esta Norma define al chorizo, en sentido genérico, como “*la mezcla de carnes picadas o troceadas de cerdo o de cerdo y vacuno y tocino y/o grasa de cerdo, adicionada de sal, pimentón y otras especias, condimentos y aditivos autorizados, amasada y embutida en tripas naturales o artificiales, en su caso, que han sufrido un proceso de maduración-desección, con o sin ahumado, que se caracteriza por su coloración roja (con excepción de los denominados chorizos blancos) y por su olor y sabor característico*”. Además de establecerse unos mínimos de composición para su comercialización, la categorización del chorizo (extra, primera, segunda y tercera) se lleva a cabo en base a parámetros composicionales (humedad, proteínas cárnicas y de otro origen, hidroxiprolina, grasa e hidratos de carbono).

## LA MICROBIOLOGÍA DE LOS EMBUTIDOS.

Desde el punto de vista microbiológico el estudio de los embutidos fermentados debe contemplar tres vertientes: 1) su seguridad en relación con la posibilidad de crecimiento y/o producción de metabolitos tóxicos por parte de microorganismos patógenos, 2) la presencia de microorganismos alterantes, y 3) la presencia y caracterización de microorganismos de interés tecnológico. Este último grupo es de gran

interés. A partir de los años 40-50 con la introducción de los cultivos iniciadores, fundamentalmente de origen lácteo, en la elaboración de embutidos se comprobaba que los productos finales no presentaban las características organolépticas esperadas. Ello también supuso el desplazamiento e incluso la eliminación de las floras autóctonas. Por ello se hace necesario el estudio de la flora autóctona de los distintos tipos de embutidos y sus variedades (incluidas las de presentación del producto). En el conjunto de las floras de interés tecnológico, destacan por su importancia las bacterias acidolácticas (BAL) consideradas como probióticos (Incze, 1998) y como bioconservadores (Hugas, 1998).

Los microorganismos patógenos frecuentemente aislados de embutidos son: *Salmonella*, que se ha asociado con intoxicación alimentaria después del consumo de salami en Austria e Italia, y más recientemente en el Reino Unido por el consumo de salami para aperitivo (Cowden *et al.*, 1989); *Listeria monocytogenes*, que se ha aislado de diferentes tipos de embutidos, incluido el chorizo (Encinas, 1993) y se ha identificado al salami como factor de riesgo en Estados Unidos. El aislamiento de este microorganismo ha llevado a especular sobre la presencia de otros microorganismos patógenos como *Campylobacter*. *Escherichia coli* productor de verocitotoxina – principalmente el serotipo O157:H7- (Anónimo, 1995a, Tilden *et al.*, 1996) se ha asociado con el consumo de salami en Estados Unidos y con el *mettwursten* en Australia (Anónimo, 1995b). *Staphylococcus aureus* se considera desde el punto de vista de la producción de enterotoxina; si bien, un control adecuado de la fermentación, con una reducción adecuada del pH, a una velocidad suficiente, evita la multiplicación y producción de enterotoxinas; se recomienda para su control, siempre que sea posible, evaluar el contenido de *S. aureus* inmediatamente después de la fase de la fermentación y sus niveles deben ser inferiores a  $4 \log_{10}$  ufc/g (Varnam y Sutherland, 1998).

#### LOS EMBUTIDOS, LA NUTRICIÓN Y LA TOXICIDAD.

La garantía de calidad en las carnes procesadas implica un adecuado control de los cambios que se producen en la carne y productos cárnicos durante su maduración y almacenamiento. Buena parte de estos cambios están asociados con la actividad de enzimas tisulares o de origen microbiano. Estos cambios son importantes para el desarrollo de las características deseables, pero pueden contribuir también a la

formación de compuestos que pueden generar enfermedades en el consumidor, al mismo tiempo que tener consecuencias nutritivas.

En embutidos crudos fermentados la pérdida de agua durante el proceso de maduración-secado está asociada con un incremento en el contenido en grasa y proteína, y por tanto un incremento en el contenido en nutrientes. Durante un almacenamiento prolongado (algunos meses) se observa una reducción notable del contenido en vitaminas del complejo B. Durante el almacenamiento se produce una hidrólisis de las proteínas que puede conducir a la formación de compuestos con influencia directa sobre el metabolismo humano. Así, se sabe que se produce un aumento de aminas biógenas y el subsiguiente riesgo de formación de nitrosaminas. Las aminas biógenas tienen influencia sobre el metabolismo humano: vasoactivas hipertensivas (tiramina, feniletilamina), vasoactivas hipotensivas (histamina) y sustancias físico-activas (dopamina, serotonina) (Bauer *et al.*, 1994). Estos compuestos se detectaron en embutidos y otros derivados cárnicos elaborados a partir de carnes de mala calidad higiénica (microbiológica). En embutidos fermentados se han detectado niveles de nitrosaminas entre 0,1 y 6 µg/kg del extracto seco (Stratton *et al.*, 1991). Para reducir el contenido en estos compuestos de alto riesgo para la salud del consumidor se recomienda reducir el contenido en nitratos y nitritos en los embutidos (tasas de 50 ppm de nitritos son suficientes para controlar *Clostridium botulinum*) y partir de carne fresca de buena calidad microbiológica, asociada con el uso de sustancias que previenen la formación de nitrosaminas: ácido ascórbico y tocoferoles (Cassens, 1990).

## IMPORTANCIA ECONÓMICA

### LA INDUSTRIA

La industria cárnica española es la primera en producción del conjunto de la industria agroalimentaria en nuestro país (Anónimo, 1997), con un 22%. El 12% del total de productos alimentarios transformados que se exportan proceden del sector cárnico, lo que sitúa a este sector en cuarto lugar tras el de bebidas (19%), aceites y grasa (17%) y conservas vegetales (15%). Además, el cárnico es el sector alimentario que más ha aumentado su producción en los últimos años, con un incremento del índice de producción del 1,8% (Anónimo, 1997).

Por otra parte, España es el tercer país productor de carne de porcino después de Alemania y Francia, le sigue en importancia Finlandia (Anónimo, 1997).

#### EL CONSUMO

El consumo medio de carne y transformados ha experimentado una reducción importante, desde 69,3 kg/persona/año en 1992 a 61,23 kg en 1995 (Anónimo, 1997). Esta reducción puede tener explicación por la campaña negativa desde el punto de vista nutricional, los elevados precios de las carnes rojas, la declaración de enfermedades asociadas con el consumo de carnes, y la presencia de residuos hormonales, antibióticos y de otro tipo. En España, la media de consumo de carne en 1995 fue del 61,23% del total producido, correspondiendo a transformados el 15,69% (4,32% para productos curados). En la Comunidad Autónoma de Castilla y León la media anual fue del 63,17% y el de transformados el 14,83%. El consumo medio de carne y transformados (1995) a nivel nacional fue de 7,2 kg/habitante y en Castilla y León 8,83 kg/habitante (Anónimo, 1997).

Si bien es cierto que el consumo medio de carne y derivados en nuestro país ha experimentado una notable reducción en estos últimos años, hemos de tener en cuenta que la imagen nutritiva de determinadas carnes, como la de cerdo y sus derivados, ha mejorado al considerarse su riqueza en ácidos grasos insaturados, especialmente en ácido oléico. Por otra parte, los embutidos han sido definidos por algunos autores como alimentos “insanos” dado su elevado contenido en grasa, sal y nitritos. Sin embargo, se ha comprobado que la proteólisis que se desarrolla durante el proceso de fermentación y maduración de los embutidos aumenta la digestibilidad proteica neta. Otros autores han esgrimido argumentos en relación con el valor terapéutico de los embutidos fermentados similar al manifestado por las bacterias acidolácticas en los derivados lácteos (*probióticos*).

#### EL CHORIZO DE CANTIMPALOS.

El chorizo de Cantimpalos es un embutido crudo curado elaborado en distintos municipios de la provincia de Segovia, con un mercado importante en todo el territorio nacional, y también con un mercado exterior en algunos países del resto de Europa y en Sudamérica desde los años treinta (Yagüe, 1991). Aparece citado en el Catálogo de

embutidos en su edición de 1983 (Anónimo, 1983). Se le considera un producto de "calidad superior" por el tipo de carne que emplea (Sainz, 1974) y está muy bien considerado por los jurados de catadores y así mismo presenta una buena aceptabilidad en los diferentes certámenes gastronómicos y ferias agroalimentarias en las que participa.

Este embutido, al igual que otros chorizos que se elaboran en nuestro país, se caracteriza por presentar variaciones locales, que en muchas ocasiones conducen a un desmerecimiento del producto. Ello también se refleja en las recopilaciones que se realizan sobre estos productos, en las cuales pueden encontrarse variaciones en la formulación, características del proceso de maduración-secado e incluso en su presentación (Sainz, 1974; Anónimo, 1983; Marcos Aguilar, 1991). Tratando de paliar este hecho se creó una Comisión Gestora para la Denominación Específica del Chorizo de Cantimpalos que engloba a un total de 21 industriales, los cuales representan un porcentaje importante de la producción y que han aunado sus esfuerzos para ofrecer una imagen uniforme y de calidad contrastada del producto.

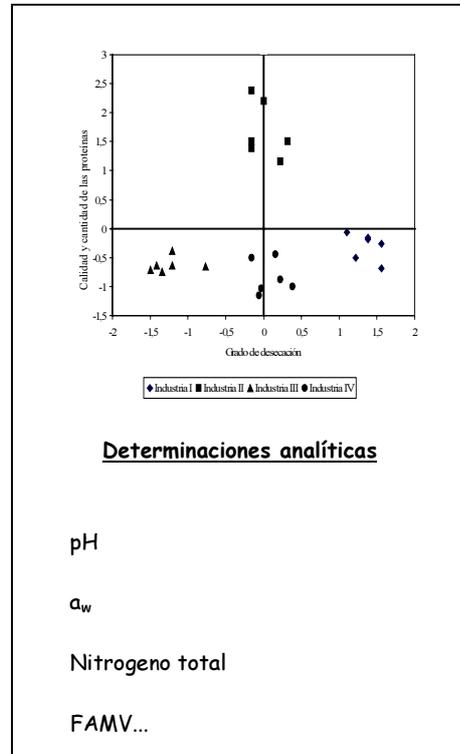
#### OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

Considerando lo expuesto anteriormente el **objetivo general** de esta Tesis ha sido estudiar las características microbiológicas, físico-químicas, organolépticas y de presentación del chorizo de Cantimpalos con ánimo de contribuir a su normalización.

Los **objetivos concretos** han sido:

1. Conocer el procedimiento de elaboración y las características químicas, físico-químicas y microbiológicas del producto final listo para el consumo.
2. Establecer la utilidad de los parámetros químicos y físico-químicos tanto para la caracterización del chorizo de Cantimpalos como para la diferenciación de los distintos procedimientos de elaboración.
3. Investigar la evolución cuantitativa y cualitativa de ciertos grupos microbianos de previsible importancia tecnológica (bacterias acidolácticas (BAL), micrococáceas, levaduras, enterococos, enterobacterias, bacilos esporulados y psicrotrofos) así como establecer su posible papel en los procesos de elaboración y maduración del producto.

4. Conocer la incidencia de ciertas bacterias patógenas de previsible trascendencia sanitaria en relación con los embutidos crudos-curados: *Aeromonas*, *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*.



## CAPÍTULO 2.

# NORMALIZACIÓN DEL CHORIZO DE CANTIMPALOS



## **INTRODUCCION**

Uno de los factores que condicionarán el éxito de los productos cárnicos en el mercado único europeo es aquél relacionado con el mantenimiento de unas características diferenciadoras y peculiares (que respondan a las exigencias de los consumidores) a lo largo del tiempo.

En este sentido, la diversidad de productos cárnicos elaborados en nuestro país (con variaciones en las materias primas, el modo de elaboración, incluso la forma de preparación, Anónimo, 1983) constituye un valor comercial de primera magnitud. Sin embargo, la diversificación no debe ser sinónimo de variabilidad, pues el consumidor espera una razonable uniformización una vez que ha conseguido identificar un producto.

A fin de favorecer la comercialización de los productos, la adecuada caracterización y normalización de materias primas, procesos y productos constituye una de las tareas básicas. En este sentido y para proteger las peculiaridades de formas tradicionales de elaborar y presentar productos alimenticios (que presentan características muy apreciadas por los consumidores), tanto a nivel nacional como a nivel de la actual Unión Europea se han tomado diversas iniciativas de ordenación. En España cabe señalar el régimen de Denominaciones de Origen (y figuras relacionadas), iniciada con el vino (Ley 25/1970, de 2 de diciembre, del Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes; Real Decreto 1573/1985, de 1 de agosto, por el que se regulan las denominaciones genéricas y específicas de productos alimentarios) y extendida a muchos otros productos alimenticios (Real Decreto 728/1988, de 8 de julio, por el que se establece la normativa a que deben ajustarse las denominaciones de origen, específicas y genéricas de productos agroalimentarios no vínicos) y en la Unión Europea hay que destacar los Reglamentos (CEE) del Consejo números 2081/92 y 2082/92, de 14 de julio de 1992, relativos a la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen, y a la certificación de las características específicas de los productos agrícolas y alimenticios, respectivamente.

Ahora bien, buena parte de los productos alimenticios están sujetos a normas de calidad que obligan a satisfacer una serie de características de elaboración y presentación previas a aquellas asociadas con su peculiaridad.

En primer lugar, los productos no han de transmitir agentes de infecciones e intoxicaciones alimentarias. Los principales riesgos sanitarios asociados con el consumo de embutidos crudos curados se relacionan con la presencia de *Salmonella*, *Listeria*, *Aeromonas*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter* (Lücke, 1985; Palumbo, 1986), *Escherichia coli* O157:H7 (Anónimo 1995a; Tilden *et al.*, 1996). No puede olvidarse la presencia de enterotoxinas estafilocócicas, micotoxinas (Lücke, 1985) y/o aminas biógenas (Santos-Buelga *et al.*, 1986). En algún caso, determinaciones microbiológicas sencillas han sido propuestas como indicadores del estado higiénico-sanitario de los productos alimenticios (así, p.ej., los recuentos de enterobacterias y de enterococos, han sido sugeridos para algunos productos alimenticios que han sufrido un proceso de desecación, ICMSF, 1980; Mossel y Moreno, 1985).

Además, los embutidos crudos-curados comercializados en nuestro país han de cumplir unas especificaciones en cuanto a algunos de sus componentes mayoritarios (contenido en humedad, grasa, proteínas cárnicas, hidroxiprolina, hidratos de carbono, etc.) que aparecen establecidos en la Norma de calidad para los productos cárnicos crudos-curados (Anónimo, 1980). En relación con los mismos se establecen unos valores mínimos (o máximos) para identificar adecuadamente el producto, y unos rangos de valores que permiten su categorización (extra, primera, segunda y tercera para el chorizo).

Aunque la utilización de estos parámetros directos de composición ha sido objeto de diversas críticas (en tanto en cuanto a su dificultad para informar tanto de la cantidad y calidad de las materias primas empleadas –principalmente carne y grasa-, como del alcance de determinados procesos –p. ej., grado de desecación-), y se propugna el empleo de parámetros indirectos de composición (Flores, 1977, 1980, 1994) la evaluación de la utilidad de estos parámetros, con vistas a la caracterización de las peculiaridades de algunos productos, es una de las primeras tareas a abordar.

Con ser importantes las características del producto final, las peculiaridades de los productos alimenticios se relacionan también con sus materias primas, la combinación de las mismas, su origen, y los modos de elaboración y transformación. En este sentido, los correspondientes reglamentos técnicos definidores de las Denominaciones de Origen (y figuras similares) incluyen diversas prescripciones normalizadoras de todos estos aspectos.

Los objetivos de este trabajo han sido: 1) evaluar la variabilidad en cuanto a materias primas y procesos de elaboración y sensaciones organolépticas del chorizo de Cantimpalos elaborado por los industriales aspirantes a una figura legal de protección de las peculiaridades de este producto, 2) estimar la uniformidad del chorizo de Cantimpalos en cuanto a los parámetros de composición incluidos en la norma de calidad para el chorizo, así como en las relaciones entre dichos parámetros, y 3) evaluar la calidad microbiológica del chorizo de Cantimpalos, mediante la investigación de aquellos microorganismos patógenos de mayor importancia en este tipo de productos, así como de otros parámetros microbiológicos de habitual interés higiénico-sanitario.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MATERIAS PRIMAS Y PROCESO DE PRODUCCIÓN**

Con el fin de recabar datos relativos a la zona de elaboración del chorizo de Cantimpalos, así como acerca de las materias primas utilizadas, los procesos de elaboración empleados y los tipos comerciales de productos elaborados, se mantuvieron diversas entrevistas con la Comisión Gestora para la Denominación Específica del Chorizo de Cantimpalos. Asimismo, se encuestaron las 21 industrias agrupadas en la Comisión. Las principales etapas del proceso de elaboración se siguieron en un total de cuatro industrias mediante visitas (previamente concertadas) a las instalaciones.

### **CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL**

#### **ANÁLISIS SENSORIAL**

Se examinaron un total de 36 ejemplares de chorizo procedentes de tres industrias (12 ejemplares correspondientes al mismo lote por cada industria) representativas de tres procedimientos diferentes de elaboración del chorizo de Cantimpalos. Se trataba de valorar organolépticamente embutidos que respondieran a una buena calidad desde el punto de vista de los productores. En consecuencia, los embutidos se seleccionaron por las industrias elaboradoras y se remitieron por los canales habituales de

comercialización al laboratorio de “Nutrición y Bromatología” de la Universidad de León, donde se realizaron las pruebas sensoriales.

El panel de catadores estaba constituido por doce panelistas, consumidores habituales de chorizo y previamente entrenados en la realización de pruebas descriptivas sencillas que conllevan el empleo de escalas. Para la valoración de cada uno de los parámetros sensoriales que se señalan a continuación se emplearon escalas estructuradas de nueve puntos. Los parámetros sensoriales evaluados (y los extremos de las escalas correspondientes) fueron: aspecto general (1, muy poco característico; 9, muy característico), presencia de mohos (1, ausencia; 9, totalmente cubierto), dureza por presión (1, muy tierno; 9, muy duro), intensidad (1, muy poco; 9, mucho) y calidad (1, muy desagradable; 9, muy agradable) del aroma externo, valoración global de la percepción externa del embutido (1, muy poco típica; 9, muy típica), aspecto al corte (1, muy deficiente; 9, óptimo), abundancia de grasa (1, excesiva; 9, muy poca), facilidad de separación de la tripa (1, muy difícil; 9, muy fácil), intensidad (1, muy poco; 9, mucho) y calidad (1, muy desagradable; 9, muy agradable) del aroma interno, color (1, poco intenso; 9, rojo intenso), valoración global de la percepción al corte (1, muy poco típica; 9, muy típica), intensidad (1, muy poco; 9, mucho) y calidad (1, muy desagradable; 9, muy agradable) del sabor, dureza-curación a la masticación (1, muy deficiente; 9, óptimo) y grado de jugosidad (1, muy poco jugoso; 9, muy jugoso), valoración global de la percepción a la masticación (1, muy poco típica; 9, muy típica) y aceptabilidad general (1, muy poco típica; 9, muy típica).

## ANÁLISIS QUÍMICO, FÍSICO-QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO.

### MUESTRAS ANALIZADAS

Se analizaron un total de 48 muestras de chorizo de Cantimpalos listos para el consumo procedentes de cuatro industrias: una de ellas por la tecnología empleada y mano de obra se clasificó como industrial (en adelante denominada industria I) y las otras tres de características semiartesanales (denominadas II, III y IV). Nótese que los estudios de seguimiento de las poblaciones microbianas (capítulos 3 a 9 de la presente Tesis) se realizaron únicamente en las industrias III y IV (denominadas, respectivamente A y B en dichos capítulos).

Las muestras fueron remitidas por las propias industrias al laboratorio de “Nutrición y Bromatología” de la Universidad de León, siguiendo las mismas manipulaciones de embalaje y distribución que los embutidos destinados al mercado.

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio, inmediatamente se procedió a su preparación para los análisis físico-químicos y microbiológicos correspondientes. Parte de la muestra (alrededor de 500 g) convenientemente etiquetada y envasada se congeló a -30°C.

Sobre la muestra en fresco se determinaron los siguientes parámetros: pH,  $a_w$ , humedad, extracto seco, almidón, azúcares reductores totales y lactosa, cloruros, nitratos, nitritos, fosfatos, proteína total, grasa e hidroxiprolina, así como los parámetros microbiológicos. El resto de las determinaciones se llevaron a cabo a partir de las alícuotas congeladas.

De cada una de las industrias seleccionadas se analizaron dos lotes de fabricación y de cada uno de ellos 6 muestras. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado en cada una de las muestras.

El periodo de maduración de los embutidos analizados oscilaba entre los 18 y 25 días.

#### PARÁMETROS QUÍMICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS

**$a_w$ .**- La actividad de agua ( $a_w$ ) se determinó por el método de interpolación gráfica siguiendo la técnica propuesta por Proctor (1951), con las modificaciones de Leistner y Rödel (1975). Como patrones, se emplearon soluciones salinas saturadas de  $BaCl_2$ ,  $KNO_3$  y  $K_2SO_4$ , así como una solución acuosa de NaCl 36% (p/v). Las determinaciones para cada una de las soluciones se realizó por duplicado, haciéndose lecturas a las 24 horas a 25°C.

**pH.**- El pH se determinó como el valor medio de tres determinaciones realizadas por punción directa sobre la masa del embutido correspondiente, con un pHmetro CRISON modelo 506, equipado con un electrodo combinado y de punción.

**Contenido en humedad (H).**- Se realizó por desecación hasta peso constante a 102°C±2°C, siguiendo el método oficial de análisis para carne y productos cárnicos de nuestro país (Anónimo, 1979).

**Contenido en extracto seco (ES).**- Se estimó de forma indirecta a partir del contenido en humedad, empleando la fórmula:

$$\%ES = 100 - \%H$$

**Contenido en grasa (G).**- El contenido en grasa del chorizo se determinó por extracción con éter de petróleo sobre muestra deshidratada, evaporación del solvente, desecación y pesada, siguiendo el método oficial empleado en España para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979).

**Contenido en proteína (P).**- El contenido en proteína total se determinó a partir del contenido en nitrógeno total, que se multiplicó por 6,25. El contenido en nitrógeno total se estimó por el método Kjeldhal, siguiendo el protocolo descrito en el método oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979).

**Contenido en hidroxiprolina y colágeno (Cg).**- El contenido en hidroxiprolina se determinó por cuantificación colorimétrica del derivado coloreado formado por el *p*-dimetilaminobenzaldehído con el aminoácido hidroxiprolina, característico del colágeno (Anónimo, 1979). El contenido en colágeno (Cg) se determinó como el producto del porcentaje en hidroxiprolina por 8.

**Contenido en cenizas (C).**- El contenido en cenizas se determinó por incineración de la muestra en estufa mufla a  $504 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , empleando acetato de magnesio para favorecer la mineralización. Se siguió el protocolo del método oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979).

**Contenido en fósforo.**- Sobre la muestra mineralizada y oxidada (empleando ácido sulfúrico, selenio y peróxido de hidrógeno) el contenido en fósforo se determinó espectrofotométricamente con el reactivo molibdato-vanadato, siguiendo la metodología oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979). Los resultados se expresan en porcentaje de pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

**Contenido en nitratos.**- Para la determinación del contenido residual en nitratos se empleó una reacción colorimétrica con la brucina, siguiendo el protocolo descrito en el método oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979).

**Contenido en nitritos.**- El contenido residual en nitritos se estimó colorimétricamente, tras reacción con ácido sulfanílico y  $\alpha$ -naftilamina, según el protocolo descrito en el método oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979).

**Contenido en cloruros.-** Se determinó por la técnica volumétrica de Carpentier-Vohlard (valoración con tiocianato del exceso de los iones de plata), según el protocolo descrito en el método oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979). Los resultados se expresan en porcentaje de cloruro sódico.

**Contenido en azúcares totales, reductores y lactosa.-** Se determinaron por disolución de los azúcares en alcohol etílico diluido y después de la eliminación del alcohol se valoraron por el método de Luff-Schoorl, antes y después de la inversión, así como sobre una tercera alícuota hidrolizada con *Saccharomyces cerevisiae*, siguiendo el método oficial para el análisis de carne y productos cárnicos (Anónimo, 1979).

**Contenido en almidón.-** Se realizó la determinación cualitativa del mismo manteniendo en ebullición 10 g de la muestra y 40 ml de agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron unas gotas de solución yodo-yodurada a una alícuota fría del líquido de ebullición. En alícuotas de las muestras que presentaron reacción positiva (aparición de una coloración azul intensa) se procedió a la cuantificación del almidón mediante el reactivo de la antrona-ácido sulfúrico (en extractos libres de azúcares sencillos) siguiendo el protocolo descrito en la metodología oficial española (Anónimo, 1979).

**Contenido en ácido L-láctico.-** Se valoró mediante análisis enzimático según Noll (1974), empleando un *kit* enzimático de la firma Boehringer (Número de catálogo 139084, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania). Se basa en la cuantificación fotométrica (334, 340 o 365 nm, dependiendo de la concentración de ácido láctico presente) del NADH formado en la reacción de oxidación del ácido L-láctico por una L-lactato deshidrogenasa (y transformando el piruvato formado al mismo tiempo mediante el empleo de una glutamato-piruvato transaminasa).

**Relación entre parámetros químicos de composición.-** Se calcularon los que se señalan a continuación mediante las fórmulas que se citan:

**Humedad del Producto Desengrasado (HPD)**

$$HPD = [\%H / (100 - \%G)] \times 100$$

**Proteína del Producto Desengrasado (PPD)**

$$PPD = [\%P / (100 - \%G)] \times 100$$

**Contenido en Materia Orgánica No Grasa (CMONG)**

$$CMONG = 100 - [\%H + \%G + \%C]$$

**Relación humedad/proteína (H/P)**

$$H/P = \%H/\%P$$

**Relación grasa/proteína (G/P)**

$$G/P = \%G/\%P$$

**Relación grasa/extracto seco (G/ES)**

$$G/ES = \%G/\%ES$$

**Relación colágeno/proteína total (Cg/P)**

$$Cg/P = \%Cg/\%P$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS.

La significatividad de las diferencias en los parámetros químicos y físico-químicos entre los embutidos de las diferentes industrias, se realizó mediante un análisis de medias: prueba de la *t* de Student, realizada con el programa Statistica for Windows versión 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Las relaciones entre las variables (parámetros directos e indirectos) se estimaron mediante análisis de la varianza, que se realizó con el programa estadístico BMDP (Statistical Software Inc., Los Angeles, CA, USA) versión revisada para PC (Mayo 1984). En concreto, se llevó a cabo un análisis factorial (empleando un análisis de componentes principales para la extracción de los factores, y el método *varimax* para la rotación de éstos).

PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

**Toma de muestras.-** La superficie externa del embutido se limpió con un algodón impregnado en alcohol etílico al 70%. Una vez seca, se procedió a la retirada de la tripa en condiciones de esterilidad. A continuación, se tomaron 50 g de muestra que se mezclaron con 450 ml de Agua de Peptona (Unipath) al 0,1% adicionada de Tween-80 (Panreac) al 1%. La homogeneización se llevó a cabo en un homogeneizador *Stomacher LAB-BLENDER 400* (Seward Medical, London) durante dos minutos. Posteriormente se filtró a través de una gasa estéril. A partir de este filtrado general se realizaron las diluciones (1/10) necesarias en Agua de Peptona (Unipath) al 0,1%, y se procedió a la determinación de los siguientes grupos de microorganismos: flora aerobia mesófila

viable (FAMV), *Enterobacteriaceae*, enterococos, mohos y levaduras, y *Staphylococcus aureus*.

**Flora Aerobia Mesófila Viable.-** El recuento de la flora aerobia mesófila viable se llevó a cabo utilizando el medio Agar para Recuento en Placa (Unipath). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (Mossel y Moreno, 1985).

**Enterobacterias.-** El recuento de este grupo microbiano se realizó mediante siembra en profundidad en el medio agar Glucosa, Rojo Neutro, Cristal Violeta, Bilis (VRBGA, Unipath), con adición de sobrecapa del mismo medio. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas (ICMSF, 1983).

**Enterococos.-** Su recuento se realizó por siembra en profundidad en el medio agar Kanamicina, Azida Sódica, Esculina (Unipath). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas (Reuter, 1985). Se contaron las colonias grisáceas oscuras.

**Mohos y levaduras.-** El recuento y aislamiento de los mismos se llevó a cabo por siembra en superficie en el medio Oxitetraciclina, Glucosa, Extracto de levadura Agar (OGYEA, Unipath). Las placas se incubaron a 25°C durante 5 días (Mossel, *et al.*, 1970; Baird-Parker, 1979).

***Staphylococcus aureus*.-** Se realizó en el medio agar de Baird-Parker (Unipath), por siembra en superficie y las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas (Baird Parker, 1970, Anónimo, 1987). Para la cuantificación de los miembros de la familia *Micrococcaceae*, diez colonias por placa se sometieron a las pruebas preliminares de identificación siguientes: tinción de Gram, catalasa, coagulasa, crecimiento en anaerobiosis, resistencia a la novobiocina y actividad hemolítica (cuyo protocolo de realización se detalla en el capítulo 4). La adscripción a especie se llevó a cabo empleando la metodología que se señala en el capítulo 4.

**Detección de *Listeria monocytogenes*.-** Se siguieron dos métodos paralelos:

a. Siembra directa, a partir del homogeneizado señalado en el apartado de toma de muestras, en la superficie del medio de *Oxford (Listeria selective medium Oxford formulation*, Unipath) incubándose las placas a 32°C durante 48 horas.

b. Enriquecimiento y aislamiento en medio sólido. Para proceder a la recuperación de las listerias presuntamente “lesionadas”, 25 g de muestra se homogeneizaron con 225 ml de caldo Ramnosa de Enriquecimiento (ISO-GRID®,

Anónimo, 1989), incubándose una noche a 35°C. Posteriormente, 0,1 ml de este caldo se inocularon en 10 ml de caldo Ramnosa Selectivo (ISO-GRID®, Anónimo, 1989), incubándose 6 horas a 35°C. Transcurrido este periodo se siembra un asa de cultivo en el medio de *Oxford* (Unipath), incubándose a 32°C durante 48 horas.

Para la caracterización de las colonias, se empleó la metodología señalada en el capítulo 8.

**Detección de *Aeromonas*.**- La investigación de *Aeromonas* se realizó por siembra en superficie en el medio agar selectivo para *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Agar con glutamato, almidón y penicilina, agar GSP, Merck), incubándose a 28°C durante 48 horas. Asimismo se realizó un enriquecimiento selectivo en agua de peptona alcalina (50g de muestra se homogeneizaron con 450 ml de agua de peptona alcalina), manteniéndose a 7°C durante 15 días. Posteriormente se sembraron 0,1 ml del medio de enriquecimiento en placas de agar GSP (Kielwein *et al.*, 1969). La adscripción a género de las cepas de presuntas *Aeromonas* se llevó a cabo del modo descrito en el capítulo 8.

**Detección de *Salmonella*.**- Para la investigación de *Salmonella* en el chorizo de Cantimpalos se utilizó el método de filtración de la membrana hidrofóbica (ISO-GRID®; Anónimo, 1989), realizando las etapas siguientes:

1.- Homogeneización de 25g de muestra con 225 ml de caldo de preenriquecimiento (agua de peptona alcalina 0,1%). El homogeneizado se tamponó a pH 6,9 con NaOH 0,1N.

2.- Incubación de dicho caldo tamponado a 35-37°C durante 18 horas.

3.- Adición de 1 ml del caldo de preenriquecimiento a 9 ml de caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis (Unipath), incubándose a 37°C durante 8-9 horas.

4.- Filtración de 0,1 ml del caldo Rappaport-Vassiliadis a través de un filtro ISO-GRID® que, a continuación, se coloca asépticamente sobre una placa con medio sólido selectivo EF-18 (ISO-GRID®, Anónimo, 1989). Las placas se incuban a 42°C durante 24 horas.

5.- Las colonias verdeazuladas o verdes formadas en el filtro se estima que corresponden a cepas de presuntas *Salmonella*.

Para la confirmación de la pertenencia de las cepas a dicho género, se empleó la metodología descrita en el capítulo 7.

**Detección de *Yersinia enterocolitica*.**- El aislamiento de *Yersinia enterocolitica* se realizó con doble enriquecimiento, tratamiento alcalino y aislamiento en medios sólidos selectivos, MacConkey y CIN agar (cefsulodin, irgasan, novobiocina) (Unipath) (Walker y Gilmour, 1986). Para la caracterización de las cepas de presuntas *Yersinia* se siguieron los procedimientos señalados en el capítulo 7.

## **RESULTADOS**

La zona de elaboración del chorizo de Cantimpalos, las épocas de producción, las materias primas y procesos empleados, así como la descripción de la presentación y del aspecto externo e interno junto con las primeras percepciones sensoriales tal y como eran consideradas por la Comisión Gestora para la Denominación Específica del Chorizo de Cantimpalos y los distintos industriales asociados se presenta a continuación.

### ZONA DE ELABORACIÓN

La ubicación geográfica del chorizo de Cantimpalos corresponde a una zona que se extiende en una franja de 40 km al Norte de la Sierra de Guadarrama, desde Riaza a Villacastín, y desde el Puerto de Navacerrada hasta Carbonero el Mayor, comprendiendo varios pueblos de la provincia de Segovia incluido Cantimpalos.

La zona se halla situada a una altitud de unos 1000 m, que, se considera, constituye un medio excepcional para la curación del chorizo.

### ÉPOCA DE ELABORACIÓN

Tradicionalmente, la elaboración se concentraba en los meses de invierno, de Noviembre a Marzo, aprovechando las temperaturas bajas para la conservación de las carnes. Hoy día se elabora durante todo el año.

### MATERIAS PRIMAS

En la elaboración del chorizo de Cantimpalos se utiliza carne de cerdo blanco "cebón" y en ocasiones carne de cerdo Ibérico. Las partes de la canal del cerdo blanco utilizadas son la cabeza del lomo, falda, recortes de jamón y paleta y "lardeo" (panceta es el

término correspondiente al despiece oficial de porcino). Cuando se utiliza carne de cerdo Ibérico las partes de la canal que entran a formar parte de la formulación de este embutido son la cabeza de lomo, falda y lardeo escogidos. Es interesante destacar el hecho que no se utiliza tocino dorsal en su formulación y elaboración.

Otros ingredientes utilizados son: pimentón de la Vera y Murcia, sal, ajo fresco y orégano. Habitualmente se emplean también azúcares (preparados comerciales), agentes del curado (nitratos y nitritos), polifosfato sódico, caseinato sódico y ascorbato sódico en diferentes concentraciones en función de la industria y época del año en la que se elabora.

### PROCESO DE ELABORACIÓN

El proceso general de elaboración comprende las siguientes fases:

1. *Selección de las materias primas, picado y mezcla de las mismas.* Se procede a una selección de las carnes y lardeos, así como del resto de los ingredientes. Carnes y lardeos son picados en picadora con diámetro de placa de 16 mm.

2. *Amasado y reposo.* La mezcla es amasada (en algunas industrias se permite un cierto grado de "embarramiento") siempre con aplicación de vacío. En cuanto al reposo de la pasta, no es una práctica que se lleve a cabo por la totalidad de los fabricantes, y cuando se realiza, tampoco es uniforme ni en el tiempo ni en la temperatura empleada. Cuando se introduce la etapa de reposo, las principales alternativas de realización son: reposo corto de 18 a 24 horas en condiciones de refrigeración o prolongación de esta fase por un periodo de 72 horas.

3. *Embutido y estufaje.* La masa es embutida en tripa de ternera de 40 mm de diámetro y, habitualmente, se procede a su estufaje, aunque esta operación no siempre se lleva a cabo y, al igual que ocurre con la fase de reposo, tampoco es uniforme. De forma general, el proceso se realiza en condiciones de humedad relativa próximas al 100% y a temperaturas de alrededor de 15°C durante 18-24 horas.

Algunos industriales llevan a cabo un proceso que no es realmente un estufaje o fermentación, pues las características del mismo en cuanto a humedad relativa,

temperatura y tiempo no permiten esa definición (Campbelt-Platt, 1987); este proceso es denominado por los industriales *maduración fría*: los embutidos son mantenidos a 11°C con una humedad relativa del 60% durante 4 días. Este proceso trata de simular las condiciones de elaboración en su forma más antigua y artesanal.

4. *Maduración y secado*. Los embutidos una vez que salen de estufaje, o maduración fría en su caso, son trasladados a secaderos naturales o seminaturales donde permanecen un tiempo variable hasta alcanzar las características deseadas del producto.

#### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO FINAL: PRESENTACIÓN, ASPECTO EXTERNO Y PRIMERAS IMPRESIONES ORGANOLÉPTICAS

El chorizo de Cantimpalos se presenta tradicionalmente y en su forma más clásica en forma ahorizada, atados en porciones de 12 cm de longitud. También se comercializa en forma de vela y longaniza.

Externamente aparece recubierto de una flor superficial compuesta por mohos y levaduras que confieren al producto sus características definatorias.

Al corte, éste es limpio, liso y bien ligado, con distribución uniforme de grasa y magro; el color rojo vivo, el aroma y el sabor son característicos.

#### ANÁLISIS SENSORIAL

En la Tabla 1 se presentan los valores medios obtenidos por los embutidos de cada industria examinada para cada uno de los parámetros sensoriales evaluados en la prueba diseñada al efecto. Los parámetros que permitieron establecer alguna diferencia significativa entre las muestras procedentes de las distintas industrias estaban relacionados con la percepción al corte (aspecto, intensidad y calidad del aroma interno), junto con la dureza (tanto por presión externa del embutido como la percibida durante la masticación), la intensidad del aroma externo y la jugosidad a la masticación. No cabe hacer una valoración de la diferencia global entre las muestras de las distintas industrias por el reducido número de jueces que puntuaron los parámetros globales (Tabla 1).

**FOTO 1.** Chorizo de Cantimpalos. Aspecto externo

---

**FOTO 2.** Chorizo de Cantimpalos. Aspecto al corte

---

**TABLA 1.** Análisis sensorial de muestras de chorizo de Cantimpalos representativas de la “calidad-tipo” del producto y pertenecientes a tres industrias diferentes (realizada por un panel de 12 catadores empleando escalas estructuradas de nueve puntos)

Característica	Industria		
	I (industrial)	III (semiartesanal)	IV (semiartesanal)
Aspecto general	5,00±1,26*	5,33±2,06	5,83±1,34
Presencia de mohos	6,33±1,97	6,00±1,81	5,67±1,56
Dureza por presión	9,00±0,00a	3,00±2,09a	6,67±2,67a
Aroma externo:			
Intensidad	3,00±2,08a	5,33±2,67	5,33±2,06a
Calidad	4,67±2,06	5,67±2,87	5,00±1,71
PERCEPCION EXTERNA	5,00±2,00	5,40±1,67	4,33±1,15
Aspecto al corte	6,67±1,15a	4,60±2,07a	5,91±1,65
Distribución de grasa	4,33±1,56	4,00±1,81	5,33±2,06
Separación de la tripa	6,50±2,85	7,00±1,71	7,36±1,75
Aroma interno:			
Intensidad	4,67±2,67	5,50±2,28	5,00±1,21
Calidad	3,67±2,15a	6,00±2,34a	5,17±1,99
Color	8,50±0,90a	7,00±1,55ab	8,00±1,04b
PERCEPCIÓN AL CORTE	5,50±1,91	4,50±1,00	5,67±1,15
Sabor:			
Intensidad	4,67±2,23	4,83±1,59	5,50±1,73
Calidad	3,33±1,44	4,50±2,28	4,67±1,88
Dureza-curación	7,17±1,99a	3,33±1,16a	5,67±1,56a
Jugosidad	3,50±2,11a	5,36±1,75	5,50±2,11a
PERCEPCIÓN A LA MASTICACIÓN	4,33±1,63	3,50±1,00	5,40±0,89
ACEPTABILIDAD GENERAL	3,00±2,82	4,33±2,31	6,00±1,41

\* Valores medios±desviación estándar de las puntuaciones que los 12 jueces otorgaron a las muestras de cada industria (escala de nueve puntos). Las valoraciones globales (percepción externa, percepción al corte, percepción a la masticación y aceptabilidad general) únicamente fueron puntuadas por la tercera parte de los jueces.

La presencia de la misma letra en la misma columna es indicativa de una diferencia significativa (prueba de la *t* de Student, realizada con el programa Statística para Windows, versión 5.1), es decir, el valor de *p* es inferior a 0,05

En las Tabla 2 a 7 se recogen los estadísticos descriptivos principales (valores medios y desviación estándar, junto con información relativa a la significatividad de las diferencias entre medias) correspondientes a los parámetros químicos y físico-químicos analizados en el chorizo de Cantimpalos listo para el consumo.

En la Tabla 8 se presentan los datos correspondientes a los cuatro primeros (con un valor propio superior a 1) factores (ó componentes principales) obtenidos en el análisis factorial de los parámetros químicos y físico-químicos estudiados. Esas cuatro

componentes principales explican el 87,4% de la variabilidad. La representación gráfica de la distribución de las muestras estudiadas en el plano formado por las componentes primera y segunda (que explican el 61,6% de la variabilidad) se muestra en la Figura 1.

**TABLA 2.** Composición porcentual (p/p) del chorizo de Cantimpalos: humedad, extracto seco, contenidos en grasa y en proteína (sobre peso en fresco en ambos casos)

Ind. <sup>1</sup>	N	Humedad		Extracto seco		Grasa		Proteína	
		X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
I	12	39,72	2,43	60,28	2,43	32,71	4,18	23,02a	1,29
II	12	32,57a	3,48 <sup>a</sup>	67,51a	3,53	41,29a	5,60	16,69b	1,21
III	12	26,64	2,84	73,61	2,73	44,75a	3,81	18,59b	3,18
IV	12	32,58a	4,20 <sup>a</sup>	67,25a	4,29	43,87a	7,31	22,47a	1,41
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>32,88</b>	<b>5,67*</b>	<b>67,16</b>	<b>5,75*</b>	<b>40,58</b>	<b>7,09*</b>	<b>20,19</b>	<b>3,27*</b>

\* , desviación estándar para las 48 unidades de muestra.

<sup>1</sup> Ind., Industria; N, número de unidades de muestra examinadas; X, media aritmética (los valores que en una columna tienen la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí; es decir,  $p > 0,05$ ); DE, desviación estándar de la muestra (%)

**TABLA 3.** Parámetros físico-químicos y químicos en el chorizo de Cantimpalos:  $a_w$ , pH, contenido porcentual (p/p) en ácido L-láctico, cloruro sódico y en cenizas (sobre peso fresco en los tres casos)

Ind. <sup>1</sup>	N	$a_w$		pH		Ácido L-láctico		Cloruro sódico		Cenizas	
		X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
I	12	0,897	0,012	5,08a	0,20	0,47a	0,15	2,93	0,91	4,63	0,46
II	12	0,866a	0,026	5,03a	0,18	0,39b	0,10	3,04	0,34	4,82	0,47
III	12	0,745	0,024	5,14a	0,15	0,40ab	0,13	2,97	0,27	4,62	0,32
IV	12	0,867a	0,023	4,67	0,28	0,48a	0,04	2,90	0,08	4,82	0,45
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>0,843</b>	<b>0,063*</b>	<b>4,98</b>	<b>0,27*</b>	<b>0,43</b>	<b>0,11</b>	<b>2,96</b>	<b>0,49*</b>	<b>4,72</b>	<b>0,43*</b>

Símbolos: como Tabla 2

**TABLA 4.** Composición química del chorizo de Cantimpalos: contenido en fósforo y residual en nitratos y nitritos

Ind. <sup>1</sup>	N	Nitratos (ppm)		Nitritos (ppm)		Fósforo (% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> sobre peso fresco)	
		X	DE	X	DE	X	DE
I	12	207a	166	0,70	0,29	0,54	0,14
II	12	204a	101	1,26	0,28	0,50a	0,09
III	12	54	19	0,35a	0,08	0,59a	0,02
IV	12	195a	92	0,30a	0,03	0,38	0,36
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>163</b>	<b>122*</b>	<b>0,65</b>	<b>0,43*</b>	<b>0,50</b>	<b>0,21*</b>

Símbolos: como Tabla 2, con la excepción de la indicación relativa a la significatividad de las diferencias medias en el contenido en fósforo, en la cual los valores que presentan la misma letra **si** son diferentes significativamente (es decir,  $p < 0,05$ )

**TABLA 5.** Composición química del chorizo de Cantimpalos: contenido en hidroxiprolina y relación colágeno/proteína

Hidroxiprolina (% sobre peso fresco)		Relación colágeno/proteína	
X	DE	X	DE
0,26a	0,08	0,09a	0,03
0,85	0,59	0,41	0,15
0,16a	0,11	0,08a	0,01
0,16a	0,09	0,06a	0,03
0,36	0,41*	0,16	0,20

Símbolos: como Tabla 2

**TABLA 6.** Composición química del chorizo de Cantimpalos: Contenidos en materia orgánica no grasa (CMONG), proteína en el producto desengrasado (PPD), agua en el producto desengrasado (HPD) y relación humedad/proteína (H/P)

Ind. <sup>1</sup>	N	CMONG		PPD		H/P		HPD	
		X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
<b>I</b>	12	22,86	4,42	34,26	1,77	1,39a	0,38	67,36a	15,60
<b>II</b>	12	21,31	2,67	28,61	2,90	1,96	0,22	55,48b	2,40
<b>III</b>	12	24,47a	4,33	44,04a	8,31	1,48a	0,46	47,94	5,25
<b>IV</b>	12	19,16a	4,61	49,87a	6,52	1,23a	0,07	57,44ab	3,81
<b>Total</b>	48	22,01*	4,39	38,97*	9,87	1,51	0,42*	57,04	10,92*

Símbolos: como Tabla 2, con la excepción de la indicación relativa a la significatividad de las diferencias medias en el contenido en materia orgánica no grasa, en la que los valores que presentan la misma letra **sí** son diferentes significativamente (es decir,  $p < 0,05$ )

**TABLA 7.** Composición química del chorizo de Cantimpalos: relaciones grasa/extracto seco (G/ES) y grasa/proteína (G/P)

Ind. <sup>1</sup>	N	G/ES		G/P	
		X	DE	X	DE
<b>I</b>	12	0,54	0,07	1,44	0,24
<b>II</b>	12	0,61a	0,06	2,50a	0,45
<b>III</b>	12	0,61a	0,05	2,43a	0,53
<b>IV</b>	12	0,64a	0,08	1,95	0,26
<b>Total</b>	48	0,60	0,07*	2,08	0,58*

Símbolos: como Tabla 2

**TABLA 8.** Factores de mayor importancia resultantes del análisis factorial (análisis de componentes principales) de los parámetros químicos y físico-químicos del chorizo de Cantimpalos y su relación con dichos parámetros

Parámetro	Factor*				Comunalidad**
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	
Humedad	0,97519***				0,97511
ES	- 0,97028				0,96617
a <sub>w</sub>	0,87377				0,94347
Grasa	- 0,86355				0,96823
HPD	0,85658				0,74962
G/P	- 0,80743	0,53233			0,95314
Nitratos	0,78402				0,89011
H/P		0,94665			0,94100
Nitritos		0,90212			0,95417
Proteína	0,57271	- 0,77080			0,95387
Hidroxiprolina		0,76373			0,81709
PPD		- 0,72315			0,78805
CMONG			- 0,90642		0,82752
Fósforo			- 0,86453		0,83891
pH			- 0,81861		0,79955
G/ES	- 0,50738		0,79827		0,89877
Cenizas				0,89208	0,81615
NaCl				0,73126	0,64569
Valor propio <sup>1</sup>	6,47107	4,61579	3,13915	1,50061	
% Varianza <sup>2</sup>	36,0	25,6	17,4	8,3	
% Varianza (acu.) <sup>3</sup>	36,0	61,6	79,0	87,4	

\* Cada factor es una combinación lineal de las variables primarias (parámetros químicos y físico-químicos).

\*\* Comunalidad, proporción de la variabilidad (varianza) de la variable que es explicada por los cuatro factores.

\*\*\* Coeficiente de saturación factorial (medida del peso de cada variable en el factor). No se recogen los valores cuyo valor absoluto sea inferior a 0,5.

<sup>1</sup>, Valor propio de cada uno de los factores (índice de la varianza explicada por cada factor).

<sup>2</sup>, Porcentaje de la varianza total explicada por cada factor.

<sup>3</sup>, Porcentaje de la varianza total explicada por el factor de la columna y todos los anteriores.

En la Tabla 9 se muestran los valores medios de los recuentos microbianos obtenidos en las distintas muestras (agrupadas por lote e industria) de chorizo de Cantimpalos analizados. Para facilitar la interpretación, se recogen asimismo los valores medios de actividad de agua y pH correspondientes a dichas muestras. En ninguna de las muestras estudiadas se detectó *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia*

*enterocolitica*, ni *Listeria monocytogenes*. Únicamente en una de las muestras examinadas se detectó la presencia de *Aeromonas*.

**TABLA 9.** Calidad microbiológica y valores de pH y aw del Chorizo de Cantimpalos

Ind./Lot e. <sup>a</sup>	Parámetro						
	a <sub>w</sub>	pH	FAMV <sup>b</sup>	Enterob.	Enteroc.	Microc.	Moho-lev.
I-a	0,920	4,89	ND <sup>c</sup>	ND	ND	6,38 <sup>d</sup>	6,72 <sup>d</sup>
I-b	0,895	5,27	7,18 <sup>d</sup>	2,00 <sup>d</sup>	6,64 <sup>d</sup>	7,11	6,51
II-a	0,897	4,94	8,79	2,75	4,45	7,18	3,68
II-b	0,837	5,13	8,68	3,70	1,85	5,57	5,32
III-a	0,758	5,18	8,30	1,85	2,59	5,90	4,99
III-b	0,747	5,11	9,00	1,78	3,84	6,78	5,48
IV-a	0,856	4,94	9,48	2,30	2,04	4,41	5,02
IV-b	0,894	4,41	9,86	1,70	3,29	5,06	5,33

<sup>a</sup> Industria (I, II, III ó IV) y lote (a ó b).

<sup>b</sup>FAMV, flora aerobia mesófila viable; Enterob., enterobacteriáceas; Enteroc., enterococos; Microc., micrococáceas; Moho-lev., mohos y levaduras.

<sup>c</sup>ND, no determinado.

<sup>d</sup> log<sub>10</sub> ufc/g.

## DISCUSIÓN

En la Tabla 10 se recogen las categorías del chorizo de acuerdo con su composición analítica de acuerdo a la Norma de calidad para productos cárnicos embutidos crudos-curados (Anónimo, 1980).

La formulación del chorizo de Cantimpalos es muy similar a la del chorizo zamorano, de Villarcayo (Burgos) y de Soria, dentro de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Anónimo, 1983). Si bien presenta diferencias con el chorizo artesanal elaborado en la provincia de León, por ser éste un embutido ahumado y con un contenido en pimentón más elevado (Mateo, 1994). También presenta características comunes en su presentación y formulación a los chorizos de la Rioja y Aragón (Anónimo, 1983).

La práctica totalidad de las muestras de chorizo de Cantimpalos examinadas presentaron un contenido en **humedad** inferior al máximo establecido para el chorizo en

la norma de calidad para los embutidos crudos curados (Tabla 1). Únicamente una de las 48 muestras (correspondiente a la industria I) se situó en dicho límite. El contenido medio en humedad de los embutidos elaborados en cada industria se situaba claramente por debajo del límite establecido en la citada norma de calidad (Tabla 2), aunque se producían variaciones significativas entre diferentes industrias (más altos en la I que en todas las demás y más bajos en la III respecto de todas, Tabla 2). Curiosamente, los embutidos elaborados en la industria I eran los considerados más duros tanto en la percepción externa como a la masticación y los de la industria III los más tiernos (Tabla 1), si bien hay que señalar que las muestras examinadas sensorialmente y las analizadas para su composición correspondían a lotes distintos.

**TABLA 1** □. Categorías comerciales del chorizo en base a su composición analítica (Norma de calidad para productos cárnicos crudos-curados, (Anónimo, 1980)

Determinaciones	Categorías			
	Extra (%)	Primera (%)	Segunda (%)	Tercera (%)
Humedad, máx.	45,0	45,0	45,0	40,0
Proteínas cárnicas, mín. (1)	30,0	26,0	24,0	20,0
Otras proteínas, máx. (1)	1,0	1,0	2,0	3,0
Grasa, máx. (1)	57,0	60,0	65,0	70,0
Hidroxiprolina, máx. (1)	0,6	0,7	0,8	0,9
Hidratos de carbono, totales, expresados en glucosa, máx. (1)	8,0	9,0	9,0	9,0
Hidratos de carbono insolubles en agua expresados en glucosa, máx. (1)	1,5	2,0	2,0	2,0

(1) sobre sustancia seca.

En la categoría extra las tripas serán naturales de animales de abasto o de material biológico procedente de animales de abasto

La mayor parte de las muestras del chorizo de Cantimpalos, en el momento de su comercialización, se encuentran ligeramente por debajo del 35%, valor sugerido por Campbell-Platt y Cook (1995) para la diferenciación entre los embutidos secos y semisecos. Sin embargo, la **relación humedad/proteína** es propia de los embutidos secos (según la consideración del American Meat Institute, Bacus, 1984), es decir, inferior a 2,3 (valor únicamente superado por dos de las 48 muestras examinadas, correspondientes a las industrias II y III).

Considerando el parámetro **contenido en humedad del producto desengrasado (HPD)**, empleado habitualmente como un indicador del grado de desecación sufrido por el embutido, las muestras de chorizo de Cantimpalos por nosotros examinadas se sitúan en rangos similares a los chorizos curados (elaborados a partir de magro de cerdo blanco y/o ibérico, Flores y Alvarruiz, 1986) comercializados en España. Únicamente los embutidos comercializados por la industria I (que se situaban entre los de mayor contenido proteico, Tabla 2) presentaban habitualmente valores propios de los embutidos frescos (Flores y Alvarruiz, 1986).

En relación con el contenido en **grasa**, cuatro de las muestras (dos correspondientes a la industria IV) superaron el máximo de 70% (sobre extracto seco) que se establece en la norma de calidad para los embutidos de la categoría tercera. La industria I presentaba un contenido en grasa significativamente inferior a las otras tres (Tablas 2 y 7) y de las doce muestras procedentes de dicha industria, 10 se encuadraban en la categoría extra, una en la primera y otra en la tercera. La relación grasa/proteína, permitió, asimismo, detectar diferencias significativas entre las industrias I y IV (Tabla 6).

Comparativamente con otros embutidos cárnicos crudos-curados elaborados en España (Flores y Alvarruiz, 1985; Marquina *et al.*, 1993; Domínguez *et al.*, 1988), el chorizo de Cantimpalos se sitúa entre los de mayor contenido en grasa (aunque similar al que presenta el chorizo artesanal elaborado en la provincia de León, Domínguez *et al.*, 1988). La utilización de animales adultos (con mayor contenido en grasa en sus músculos) y el empleo, en ocasiones, de carne de cerdo ibérico justifica en parte este mayor contenido en grasa. Por otra parte, el tipo de grasa de estos animales adultos asegura una mayor estabilidad del embutido, un mejor desarrollo del color y una mayor firmeza (Sánchez-Villarraso y León-Crespo, 1989). Se considera que la grasa de los embutidos tiene gran importancia en relación con la jugosidad de los mismos durante la masticación. Las muestras de la industria IV (que en el análisis químico presentaban el mayor contenido en grasa sobre extracto seco, Tabla 7) alcanzaron la mayor puntuación en este parámetro sensorial (Tabla 1).

Asumiendo que no se empleaban **proteínas** de origen no cárnico en la elaboración de los productos (no se declaraban en las correspondientes etiquetas) y que el contenido en nitrógeno no proteico era similar en todas las muestras y no superaba el 1%, se puede considerar que únicamente dos de las muestras (correspondientes a las industrias II y III) se situaron por debajo el mínimo establecido en la norma de calidad para la categoría tercera (20% sobre extracto seco, Tabla 1). Todas las muestras de las industrias I y IV (que presentaban un contenido proteico significativamente superior al de las otras dos, Tabla 2), se encuadraban en la categoría extra. El contenido proteico del chorizo de Cantimpalos se sitúa en los valores medios de los embutidos del mismo tipo elaborados en España.

En relación con la calidad de las proteínas, todas las muestras de las industrias III y IV (y 10 de la industria I) presentaban un contenido en **hidroxiprolina** (sobre extracto seco) propio de la categoría extra (Tabla 1). La mitad de las muestras examinadas de la industria B (que globalmente presentó un contenido en hidroxiprolina sobre peso fresco significativamente superior a las otras tres industrias, Tabla 5) superaban el máximo de contenido en hidroxiprolina establecido para la categoría tercera. En relación con la proporción colágeno/proteína, que puede ser empleado como indicador de la calidad de las proteínas, la mayor parte (37) de las muestras examinadas presentaban un valor inferior a 0,16 (el considerado propio de los chorizos de calidad extra, Rodríguez-Rebollo, 1998), aunque la tercera parte de las muestras procedentes de la industria II presentaban un valor superior a 0,45, que es el máximo establecido para los embutidos secos curados a los fines de su exportación con restitución en el seno de la Unión Europea (Rodríguez-Rebollo, 1998).

Con la excepción de las elaboradas por la industria II, el resto de las muestras de chorizo de Cantimpalos se sitúan en la gama media-baja en cuanto a los valores de hidroxiprolina sobre los chorizos elaborados en nuestro país (Flores y Alvarruiz, 1986; Domínguez *et al.*, 1988).

Tanto el contenido en **cenizas** como el contenido en **cloruro sódico** (Tabla 3) se situaron en niveles similares a los encontrados en otros embutidos crudos curados

laborados en nuestro país (Serrano-Moreno, 1979; Barranco, 1984; Domínguez *et al.*, 1988; Puig *et al.*, 1989; Marquina *et al.*, 1993).

El contenido en **nitratos** de 9 de las 48 muestras superaba el nivel de 300 ppm (máximo de incorporación según la normativa española tanto la de aplicación en el momento de elaboración de los embutidos –Anónimo (1986)- como la actualmente en vigor –Anónimo (1997)-), situándose los valores en dichas muestras entre 301 y 406 ppm. El nivel residual de 250 ppm de nitratos que establece la vigente normativa de aditivos (Anónimo, 1997) fue superado por la tercera parte de las muestras examinadas. El aporte de nitratos por las especias (Lois *et al.*, 1987) y la posible síntesis a partir de los nitritos (Sarasibar *et al.*, 1989) sugieren que, previsiblemente, la incorporación de nitratos a la masa no superara los límites establecidos en la legislación. En algunos otros estudios sobre chorizos comercializados en nuestro país se han señalado niveles de nitratos superiores a los permitidos (Flores y Alvarruiz 1985), aunque muchos otros estudios han señalado niveles bastante inferiores a los límites legales tanto en chorizo (Flores y Alvarruiz, 1986) como en otros embutidos similares (Gorospe *et al.*, 1989; Cid *et al.*, 1989; Marquina *et al.*, 1993).

La incorporación de **nitritos** en la elaboración de embutidos y otros productos curados se justifica tanto desde el punto microbiológico (sobre todo, control de *Clostridium botulinum*), como sensorial (participación en el desarrollo del color característico del curado, en el sabor, efecto antioxidante) -Bacus, 1986; Mateo y Zumalacárregui, 1996-. La cantidad de nitrito detectada en las muestras de chorizo de Cantimpalos era muy escasa (rango de valores: 0,23-1,52 ppm), tal y como ha sido señalado por otros investigadores en muestras de chorizo elaborado en España (Gorospe *et al.*, 1989; Santamaría *et al.*, 1992). Sin embargo, además de la adición de nitrato, los industriales declaraban la incorporación de nitritos (el límite legal estaba establecido en 150 ppm, sin superar las 300 ppm entre nitratos y nitritos, Anónimo, 1986). Es previsible, por tanto, una importante reducción bioquímica del nitrito incorporado y/o generado a partir de los nitratos. En este sentido, hay que señalar que las puntuaciones de color fueron las más altas en el análisis sensorial (Tabla 1).

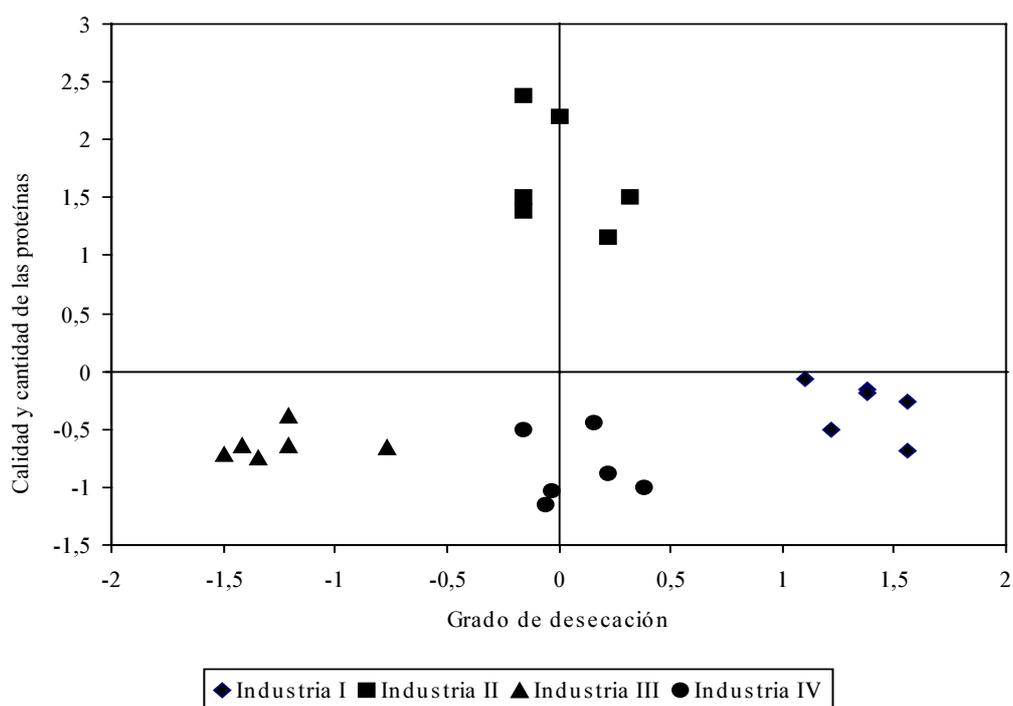
Los valores de **pH** y **a<sub>w</sub>**, parámetros de gran importancia en relación con la seguridad y estabilidad microbiana de este tipo de productos crudos-curados, son los propios de este tipo de embutidos crudos-curados de estilo europeo (Serrano-Moreno, 1979; Lücke, 1985; Sanz *et al.*, 1988), y se encuentran en el rango de los valores más adecuados desde el punto de vista del control de los riesgos sanitarios de origen microbiano (Gaya y Otero, 1999), aunque la velocidad de acidificación (no evaluada en este estudio) tiene asimismo gran importancia con dicha finalidad. Aún apreciándose diferencias significativas entre las industrias para estos parámetros (Tabla 3), los valores de pH y de a<sub>w</sub> oscilaban en estrechos márgenes (coeficientes de variación entre el 5 y el 8%), lo que podría ser de gran interés con vistas a la tipificación del producto.

El contenido en **ácido L-láctico** manifestó unos valores similares a los indicados por otros autores en embutidos crudos-curados elaborados sin la adición de azúcares fermentables y cultivos iniciadores (Encinas, 1993). Hay que señalar, sin embargo, que en las muestras analizadas no fuimos capaces de detectar hidratos de carbono, a pesar de que se añadían a la masa inicial y que también se ha señalado que las especias pueden aportar cantidades significativas de carbohidratos (Lois *et al.*, 1987).

El estudio conjunto de todos los parámetros analizados, excepto el contenido en ácido láctico, mediante un **análisis multivariable factorial** proporcionó cuatro factores con valores propios (*eigenvalues*) superiores a la unidad y que conjuntamente explican el 87,4% de la varianza (Tabla 8). El factor 1 (que explica el 36,0% de la varianza, Tabla 8) presenta su mayor relación con el contenido en humedad (y la a<sub>w</sub>), por lo que podría ser indicativo del *grado de desecación del embutido*. El factor 2 (que explica el 25,6% de la varianza, Tabla 8), en función de su dependencia fundamental de los parámetros relacionados con las proteínas puede entenderse como un indicador de la *cantidad y calidad de las proteínas*. El factor 3 (17,4% de la variabilidad, Tabla 8) se relaciona sobre todo con el contenido en materia orgánica no grasa y puede, en principio, ser considerado como indicador del *contenido en carne de embutido*. Finalmente, el factor 4 (8,3% de la variabilidad, Tabla 8) se relaciona con el contenido en cenizas y en cloruros y puede ser un indicador de la *cantidad de sal incorporada a la masa del embutido*.

En la Figura 1 se presenta la distribución de las muestras de chorizo de Cantimpalos en el plano bidimensional de las componentes principales primera (grado de desecación) y segunda (cantidad y calidad de las proteínas). Salvo para una de las muestras (de la industria III), se aprecia un agrupamiento muy claro de las muestras en función de la industria elaboradora

**FIGURA 1.** Distribución de las muestras de chorizo de Cantimpalos en el plano formado por las componentes principales primera (grado de desecación) y segunda (cantidad y calidad de las proteínas) originadas en el análisis multivariable factorial de los parámetros químicos y fisico-químicos. La identificación de las industrias (I a IV) es la misma del apartado material y métodos



### CALIDAD MICROBIOLÓGICA

En ninguna de las muestras de chorizo de Cantimpalos listos para el consumo examinadas se detectaron cepas pertenecientes a los microorganismos patógenos de mayor interés en relación con este tipo de productos.

En relación con *Salmonella*, hay que señalar que es el agente responsable del mayor número de brotes de infecciones alimentarias *sensu lato* en nuestro país y que los productos cárnicos (de diversos orígenes) han sido involucrados en algunos de dichos brotes. Por otra parte, alrededor del 10% de las cepas de *Salmonella* que se aíslan en nuestro país y son estudiadas por el Centro Nacional de Referencia de *Salmonella* se aíslan de fiambre y embutidos (según datos publicados en varios años en el Boletín Epidemiológico Semanal y que abarcan el período 1993-1997). Además, algunos brotes de Salmonelosis se han relacionado con el consumo de embutidos cárnicos fermentados (1981, Australia, *Salmonella newport*, Taplin, 1982; 1988, varios países de Europa y salami elaborado en Baviera, *Salmonella typhimurium*, Cowden *et al.*, 1989; 1995, USA y leganon bologna –embutido semiseco-, *Salmonella typhimurium*, Ellajosuylla *et al.*, 1998). Asimismo, en 1994 se señaló el aislamiento de una cepa de *Salmonella typhimurium* DT104 (con idéntico perfil plasmídico) de un ciudadano británico paciente de salmonelosis y del salami que había consumido (Wall *et al.*, 1994)

La incidencia de *Salmonella* en las materias primas empleadas en la elaboración de embutidos crudos-curados es variable, aunque se han señalado cifras tan elevadas como 2-11% (Wall *et al.*, 1994) y 12-29% (Johnston *et al.*, 1982). Sin embargo, el aislamiento de cepas de *Salmonella* en embutidos cárnicos crudos-curados listos para el consumo es infrecuente tanto nuestro país (1 de 33 muestras –Martínez-Solís *et al.*, 1982; 0 de 91 muestras –Encinas, 1993-) como en otros de nuestro entorno (2 de 2304 muestras en el Reino Unido –Little *et al.*, 1998-). En general, con los niveles de contaminación que cabe esperar en las masas iniciales, los procesos de acidificación y desecación habituales de los embutidos crudos-curados españoles son suficientes para controlar este riesgo sanitario (Gaya y Otero, 1999). Además, algunos serovares de *Salmonella* son sensibles al ajo (El-Khateib y Ab-El-Rahman, 1993). Sin embargo, contaminaciones iniciales elevadas, junto con acidificación escasa (pH superior a 5,3) y consumo de los productos en estado muy fresco, aumentan en gran medida el riesgo de esta infección alimentaria.

El cerdo (particularmente su lengua y tonsilas) es considerado uno de los reservorios más importantes de *Yersinia enterocolitica* y cepas de esta especie son detectadas en hasta un 80% de las masas iniciales destinadas a la elaboración de

embutidos cárnicos crudos-curados (Nesbakken, 1988). Por otra parte, en Hungría se ha asociado un brote de infección alimentaria al consumo de un embutido crudo contaminado con el serovar O3 de *Y. enterocolitica* (Tauxe *et al.*, 1987). Sin embargo, tanto el reposo de la masa previa a su embutido como los procesos de fermentación y/o maduración de los embutidos aseguran la inactivación de las yersinias presentes inicialmente en la masa (Encinas, 1993). Tanto la escasa capacidad de competencia de *Yersinia enterocolitica* con la flora psicrotrofa de la carne, como su sensibilidad al NaCl, los nitritos (Encinas, 1993) y el pH (Rodríguez *et al.*, 1994), entre otros, justifican esta inactivación.

En relación con *Listeria monocytogenes*, diversos productos cárnicos (entre ellos embutidos crudos, contaminados con el serotipo 4b), se han visto involucrados en brotes de listeriosis alimentaria (Gaya y Otero, 1999). Por otra parte, la incidencia de *Listeria* en carnes frescas y en masa destinada a la elaboración de embutidos puede ser importante en determinadas industrias (11 de 21 lotes, con recuentos entre  $10^1$  y  $10^3$  ufc/g, Encinas, 1993), aunque la de *Listeria monocytogenes* es bastante inferior (2 de 21 lotes pertenecientes a cinco industrias distintas, Encinas, 1993). En los embutidos crudos-curados listos para el consumo no es infrecuente encontrar un porcentaje del 1-2% de los mismos contaminados con *L. monocytogenes* (Encinas *et al.*, 1999; Gómez-Campillo *et al.*, 1999). Factores importantes en relación con el control de la listeriosis alimentaria asociada con embutidos crudos-curados son: (1) la eficacia de las medidas de limpieza y desinfección para prevenir la colonización de *L. monocytogenes* en la industria; (2) la acidificación (bien mediante la incorporación de azúcares y cultivos iniciadores o por vía directa) a niveles inferiores a pH 4,9 (que habitualmente consiguen una reducción de la población de 1-2D) combinada con desecación (que permite una reducción adicional del orden de 1-2D). Sin embargo, las cepas de *Listeria monocytogenes* suelen ser bastante resistentes a las sales del curado y la acidificación incorrecta puede permitir la multiplicación de *L. monocytogenes* hasta niveles que apenas son reducidos (no más de 0,5D) por la desecación posterior (Encinas *et al.*, 1999). Otros factores que ejercen un efecto antilisteria durante la elaboración de los embutidos crudos-curados son el ahumado (Messina *et al.*, 1988), el pimentón (Encinas, 1993) y, especialmente, ciertas cepas bacteriogénicas que, en fabricaciones

experimentales han supuesto reducciones de la población de listerias del orden de 1-3D (Luchansky *et al.*, 1992; Hugas *et al.*, 1995).

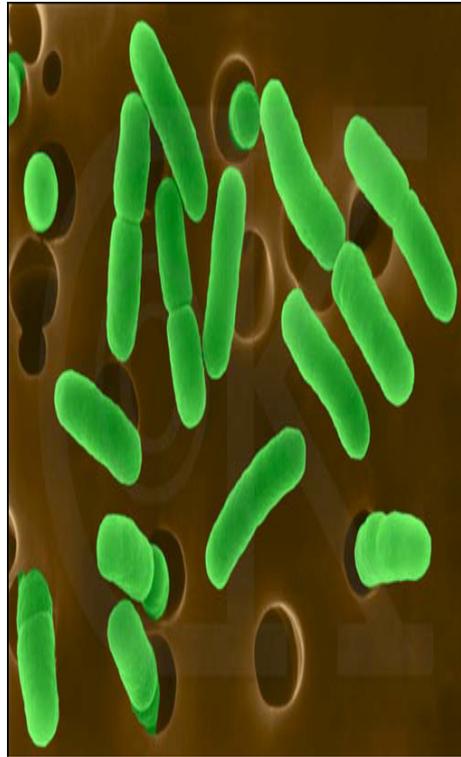
La **intoxicación estafilocócica** se viene considerando como la más frecuente de las infecciones alimentarias *sensu lato* vinculadas epidemiológicamente al consumo de embutidos fermentados (Varnam y Evans, 1991). Sin embargo, se asocia fundamentalmente con embutidos americanos, sometidos a fermentación rápida y a temperaturas elevadas (Lücke, 1985). Las condiciones habituales de elaboración de los embutidos de estilo europeo muy difícilmente permiten la multiplicación de las posibles cepas toxigénicas de *S. aureus* que pudieran estar presentes en las materias primas hasta niveles relacionados con la síntesis de enterotoxinas (González-Fandos *et al.*, 1999). Por otra parte, la rápida inactivación de *S. aureus* como consecuencia de los bajos valores de pH y actividad de agua durante los procesos de desecación de los embutidos es bien conocida (González-Fandos, 1992). Sin embargo, la posible presencia de cepas toxigénicas de *S. aureus* en las materias primas (véase capítulo 4), sugiere no descuidar tanto el control de la temperatura de fermentación como, en su caso, la velocidad de acidificación del embutido.

La ausencia de *Aeromonas* en la práctica totalidad de las muestras examinadas era esperable, si consideramos su fácil inactivación durante el proceso de elaboración de los embutidos crudos-curados (Encinas, 1993). Aunque una de las industrias estudiadas incluía una etapa de reposo prolongado de la masa en condiciones de refrigeración, la presencia de *Aeromonas* en la muestra de chorizo listo para el consumo muy previsiblemente se relacione con una contaminación posterior al proceso de fermentación-desecación del producto.

Los recuentos de **enterobacteriáceas** en el chorizo de Cantimpalos listo para el consumo se situaron en niveles similares a los encontrados en otros estudios similares sobre embutidos crudos-curados elaborados en nuestro país (Martínez-Solis *et al.*, 1982; Encinas, 1993). Por otra parte, tal y como se señala más adelante (véase capítulo 7), ninguna de las cepas aisladas se adscribió a especies patógenas. Diversos factores como la velocidad y el grado de acidificación, el ahumado, el calibre del embutido y otros

condicionan la evolución de las poblaciones de enterobacteriáceas durante la elaboración de chorizo (Encinas, 1993). Por otra parte, a la luz de estos resultados, la utilidad del recuento de enterobacteriáceas como microorganismo marcador parece tener escaso interés en los embutidos crudos-curados.

Los recuentos de **enterococos** se situaron en los valores encontrados por otros autores en chorizos elaborados en España (Martínez-Solis *et al.*, 1982; Encinas, 1993). Al igual que en el caso anterior, su utilidad como microorganismos marcadores en chorizo de Cantimpalos parece reducida. Su posible utilidad como microorganismos de interés tecnológico se discute con más detalle en el capítulo 6.



## **CAPÍTULO 3.**

# BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS



## INTRODUCCIÓN

Los grupos microbianos que participan en la obtención de los embutidos fermentados son cuatro: bacterias acidolácticas (BAL), cocos Gram-positivos productores de catalasa, levaduras y mohos.

Las BAL presentes en la carne y productos cárnicos pertenecen mayoritariamente a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weisella* (todos ellos bacilos), *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (cocos), siendo menor la incidencia de *Aerococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (Holzapfel, 1998). En la elaboración de embutidos fermentados, algunas especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* desempeñan un papel determinante (Lücke, 1985; Jessen, 1995).

El género *Lactobacillus* incluye más de 50 especies (Stiles y Holzapfel, 1997) que se subdividen en tres grupos: homofermentativas obligadas (“*Thermobacterium*”), heterofermentativas facultativas (“*Streptobacterium*”) y heterofermentativas obligadas (“*Betabacterium*”). Dos de las especies del segundo grupo (*L. curvatus* y *L. sakei*), previamente denominadas “estreptobacterias atípicas”, son de gran interés en productos cárnicos fermentados por sus “propiedades tecnológicas” decisivas en la obtención de los mismos aunque también se asocian con alteración. Otros *Lactobacillus* como “*L. bavaricus*” (sinónimo de *L. sakei*), *L. farciminis*, *L. casei*, *L. alimentarius*, y *L. plantarum* se aíslan de embutidos aunque menos frecuentemente y en menor número (Pirone *et al.*, 1990; Hugas *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994a, 1994b).

Los pediococos no constituyen una fracción importante de la flora presente habitualmente en embutidos fermentados de forma “natural”; sin embargo, por su capacidad de sobrevivir a la liofilización se utilizan frecuentemente como cultivos iniciadores, especialmente en los Estados Unidos de América (Hammes *et al.*, 1990). Las especies de *Pediococcus* asociadas con la fermentación de productos cárnicos son *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* (Lücke, 1985; Jessen, 1995).

Finalmente, *Leuconostoc-Weisella* parecen constituir una parte significativa de las BAL presentes en ciertas variedades (griegas) de embutidos (Samelis *et al.*, 1994a). El papel de otros géneros como *Carnobacterium* y *Enterococcus* no se considera importante (Holzapfel, 1998).

La acidificación de la masa por parte de las bacterias mencionadas es clave en el proceso de fabricación, ya que contribuye al desarrollo de las propiedades organolépticas del producto y al control de las bacterias patógenas y alterantes presentes. Sin embargo, en la calidad del producto final influye también su capacidad para producir otros metabolitos como diversos ácidos (acético, butírico y propiónico), compuestos que participan en el aroma y sabor (p. ej. diacetilo, acetaldehído y etanol), etc.; así como su actividad antimicrobiana asociada no sólo a la producción de ácidos, sino también a la de otros factores antimicrobianos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o las bacteriocinas (Stiles y Hastings, 1991; Kröckel, 1995).

Entre los aspectos negativos debemos citar la acción alterante mencionada anteriormente y su papel en la producción de aminas biógenas asociado a la capacidad decarboxilante de algunas especies (Santos-Buelga *et al.*, 1986; Stratton *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1996; Roig-Sagues *et al.*, 1996). La implicación de ciertas BAL en procesos patológicos humanos ha sido también señalada (Aguirre y Collins, 1993).

El uso de cultivos iniciadores en las industrias cárnicas es una práctica más reciente y menos desarrollada que en las industrias lácteas (Rickey y Keeton, 1997). Las ventajas específicas de su empleo son evidentes (acidificación más uniforme, mejor control de patógenos y alterantes, menor incidencia de defectos, etc.). Sin embargo, la mayoría de los cultivos iniciadores disponibles (generalmente comercializados por multinacionales y desarrollados para la obtención de productos distintos a los propios de nuestro país) no proporcionan, a embutidos como el chorizo, las propiedades organolépticas que les caracteriza debido, entre otras causas, a la inhibición de la flora acidoláctica propia y de otras bacterias que elaboran metabolitos deseables.

Los objetivos de este capítulo han sido: 1) estudiar la evolución cuantitativa y cualitativa de las bacterias acidolácticas durante la elaboración y maduración del chorizo de Cantimpalos, 2) caracterizar e identificar las BAL presentes en este embutido, y 3) investigar ciertas propiedades deseables (aptitud tecnológica y capacidad inhibidora) que sean de interés con vistas a la posible selección de un cultivo iniciador.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MUESTRAS Y RECuentOS

Se siguieron dos fabricaciones de la industria A y dos de la industria B. En el primer caso, se analizaron muestras tomadas en los días 1, 2, 9 y 16, y, en el segundo, muestras que correspondían a los días 1, 3, 6, 15 y 21. Los homogeneizados y diluciones se llevaron a cabo del modo descrito en el capítulo anterior. Para los recuentos (siembra en profundidad y con sobrecapa) se empleó agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Unipath) cuyo pH se ajustó a 5,5 con ácido acético glacial (Panreac). La incubación se realizó a 30°C durante 48-72 horas.

### CEPAS

De placas correspondientes a cada día de muestreo se seleccionaron al azar (Harrigan y McCance, 1976) un total de 199 cepas que tras una caracterización inicial (tinción de Gram -Gram positivas- y prueba de la catalasa -catalasa negativas-) quedaron reducidas a 158. Esta población se sometió a pases alternativos en caldo y agar MRS y, una vez purificadas, se conservaron en medio de carne cocida preparada en el laboratorio (Harrigan y McCance, 1976).

### CARACTERIZACIÓN

Se llevaron a cabo las pruebas siguientes: tinción de Gram y examen de la morfología celular, producción de catalasa en agar MRS conteniendo un 2% de glucosa, actividad oxidasa, oxidación-fermentación de la glucosa, producción de CO<sub>2</sub> a partir de la glucosa en el medio semisólido de Abd-el-Malek y en caldo MRS (Harrigan y McCance, 1976; Samelis *et al.*, 1994a), crecimiento en caldo MRS a diferentes temperaturas (7 y 15°C durante 15 días y 30, 37, 42 y 45°C durante 5 días), crecimiento a pH 4,4 y 9,6 (Samelis *et al.*, 1994a), hidrólisis de la arginina en caldo de Abd-el-Malek y Gibson (Harrigan y McCance, 1976), crecimiento en caldo MRS conteniendo diversas concentraciones de NaCl (4, 6,5, 8, 10 y 18%), producción de acetoína a partir de glucosa, crecimiento en

agar acetato (Rogosa *et al.*, 1951) de pH 5,6 (Shaw y Harding, 1984), producción de dextrano a partir de sacarosa en placas de agar MSE (Bioser) conteniendo 10% del azúcar y en agar sacarosa (Garvie, 1960) incubados a 22°C durante 7 días, hidrólisis de la esculina (Cowan, 1974), capacidad de sobrevivir a tratamientos de 60°C durante 15 y 30 minutos, y fermentación de los siguientes hidratos de carbono: almidón, L-arabinosa, celobiosa, galactosa, glicerol, inulina, *mio*-inositol, lactosa, D-manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, salicina, sorbitol, sorbosa, trealosa y D-xilosa. Para realizar esta última prueba se utilizó como medio base agar MRS (sin glucosa y sin extracto de carne) al que se añadió el sustrato (1% p/v) y púrpura de bromocresol al 0,017%. El método utilizado (empleando placas de microtítulo) fue el de Jayne-Williams (1976). En todos los casos, salvo que se indique otra temperatura, la incubación se realizó a 30°C. La configuración y cantidad de ácido láctico producido se determinó utilizando D-lactato y L-lactato deshidrogenasa siguiendo el método enzimático señalado en el capítulo 1 y empleando *kits* de la firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania, núm de catálogo 1112821 (Anónimo, 1984b).

### IDENTIFICACIÓN

La adscripción a género de las cepas se realizó utilizando el esquema propuesto por Axelsson (1993). Para la identificación a nivel de especie se utilizó un sistema asistido por ordenador (Prieto, 1994) construido con los datos publicados en la última edición de *The Prokaryotes* (Hammes *et al.*, 1992) y en el trabajo de Stiles y Holzapfel (1997).

### CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS

#### PREPARACIÓN DEL SOBRENADANTE

Todas las cepas BAL se sembraron en caldo MRS (Unipath), incubándose a 30°C durante 48h. Los cultivos libres de células se prepararon centrifugando (5000 rpm/20 min) y filtrando el sobrenadante (filtros Millipore de 0,22µm de diámetro de poro). Para descartar la actividad inhibidora del ácido producido, se ajustó (antes de filtrar) el pH de una alícuota del sobrenadante a 6,5. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente se eliminó añadiendo catalasa (0,5

mg/ml) (Schillinger y Lücke, 1989; Vignolo *et al.*, 1993).

#### DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA

Se ensayó frente a las cepas siguientes: *Staphylococcus aureus* ATCC 23925, *Listeria monocytogenes* (cepa patógena donada por el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Majadahonda, Madrid) y *Aeromonas hydrophila* (cepas G5.4 y G5, que presentaban caracteres asociados a la virulencia y que se habían aislado de chorizo de Cantimpalos).

Para detectar la actividad inhibidora se siguió, en esencia, la técnica de Schillinger y Lücke (1989). Inicialmente, una gota de cultivo se depositó en la superficie de placas de agar MRS-0,2 (caldo MRS + 0,2% de glucosa + 1,2% agar) -cinco cepas por placa- y, tras incubar en condiciones de anaerobiosis durante 24h a 30°C, se cubrió la superficie con agar MRS-0,2 (semisólido) inoculado con  $10^5$ - $10^6$  células/ml de la cepa patógena a ensayar. Las placas se incubaron de nuevo en anaerobiosis (24h, 30°C) y se consideró que existía antagonismo cuando se detectaba una zona de inhibición alrededor de las colonias de tamaño  $\geq 0,5$  mm. Las cepas de BAL que mostraron actividad inhibidora se ensayaron de nuevo utilizando una técnica de difusión en agar, realizada como describen Vignolo *et al.* (1993). Básicamente, consiste en inocular placas de MRS-0,2 con 75  $\mu$ l de un cultivo en caldo de la cepa patógena y, posteriormente, hacer pocitos (5 mm de diámetro) en el medio. Los sobrenadantes de las BAL se depositan en los pocitos y las placas se incuban (anaerobiosis) 24 horas a 30°C. Finalizada la incubación, las placas se examinan para detectar las zonas de inhibición.

### RESULTADOS

La evolución cuantitativa de las BAL durante la fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos fabricado en las industrias A y B se presenta en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

La población estudiada se adscribió a los géneros: *Lactobacillus* (135 cepas), *Carnobacterium* (11 cepas) y *Pediococcus* (12 cepas). Las especies halladas fueron: *L. curvatus* subsp. *curvatus* (98 cepas); *L. sakei* subsp. *carnosus* (19 cepas), “*L. Bavaricus*” (sinónimo *L. sakei*) (16 cepas), *C. piscicola* (11 cepas), *P. damnosus* (6

cepas), *P. parvulus* (4 cepas), *P. inopinatus* (2 cepas), *L. casei* subsp. *tolerans* (1 cepa) y *L. alimentarius* (1 cepa).

La incidencia de las especies entre la población aislada de los embutidos elaborados en cada una de las fábricas se recoge en la Figura 3.

La sucesión de especies halladas durante el proceso de obtención del chorizo de Cantimpalos se da en la Tabla 1; mientras que los datos relativos a las propiedades de posible interés tecnológico que presentaban nuestras cepas aparecen en la Tabla 2. Finalmente, los datos sobre la actividad inhibidora de las cepas frente a las bacterias patógenas incluidas en este estudio se muestran en la Tabla 3.

## **DISCUSIÓN**

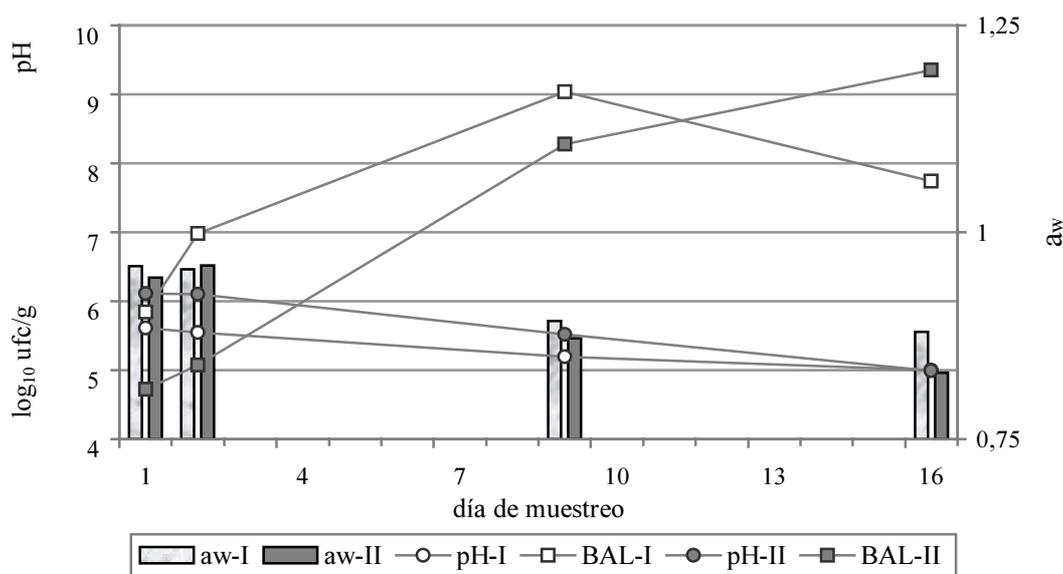
La Figura 1 pone de manifiesto que, en la industria A, la flora acidoláctica (en su mayoría *Lactobacillus*) estaba presente en la masa de los lotes I y II a niveles de 5,83 y 4,72  $\log_{10}$  ufc/g, respectivamente. En ambos se apreció un notable incremento (3,20 y 3,46 unidades logarítmicas/g) hasta el día 9 y un comportamiento distinto en el siguiente muestreo (producto final): así, en el lote I siguieron multiplicándose mientras que en el lote II se produjo un descenso.

En la industria B, sorprende el elevado número de BAL presentes inicialmente en la masa en el lote II ( $> 8 \log_{10}$  ufc/g); teniendo en cuenta que no se adicionaban cultivos lácticos, la explicación podría estar relacionada con la manipulación previa de la carne antes del picado. Aunque el nivel inicial en el lote I fue considerablemente inferior (5,94  $\log_{10}$  ufc/g), el comportamiento de estas bacterias en los dos lotes fue semejante, caracterizándose por un descenso durante la fase de reposo de la masa (más importante en el lote II) seguido de una multiplicación acusada hasta el día 6 y menor hasta el día 15 (aunque notable en el lote I). En el último muestreo, los niveles de BAL descendieron ligeramente en el lote II y bruscamente (2,93 unidades logarítmicas/g) en el lote I.

El desarrollo de las BAL, del pH y de la  $a_w$  de los lotes fabricados en la industria A corresponden, en general, al patrón de comportamiento de estos parámetros en embutidos fermentados elaborados sin cultivo iniciador (Lücke, 1985). Por el contrario,

las características de fabricación de la industria B (reposo de la masa a bajas temperaturas) incidió en un descenso de las BAL durante este período acompañado

Figura 1. Evolución de las BAL durante la elaboración y maduración de chorizo de Cantimpalos (Industria A)



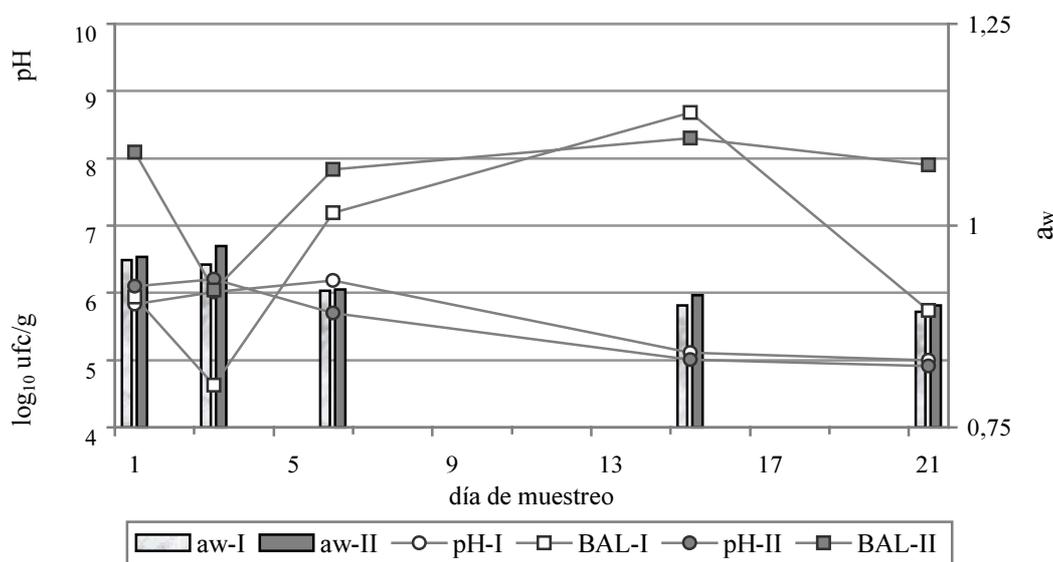
de un incremento del pH. Teniendo en cuenta que no es infrecuente que el pH inicial de la masa sea superior a 6, sería posible que esta práctica permitiera la multiplicación de bacterias patógenas tolerantes al frío en esta primera fase, si bien el descenso del pH en fases subsiguientes sería eficaz para controlar a aquéllas que son inactivadas por valores bajos de pH.

Considerando los recuentos de BAL en las muestras listas para el consumo, apreciamos, que salvo en el lote I de la industria B, éstos se encontraban en el rango considerado habitual para embutidos fermentados ( $10^8$ - $10^9$  ufc/g) (Kröckel, 1995) y similar al hallado por otros autores en chorizo (Seco-Alvarez, 1987), aunque niveles inferiores ( $10^5$ - $10^7$  ufc/g) han sido obtenidos en otros embutidos españoles como fuet y salchichón (Martínez-Solis *et al.*, 1982; Armengol *et al.*, 1994) y en variedades elaboradas en distintos países (Vignolo *et al.*, 1988, 1989; Chen y Guo, 1992, Lücke, 1992).

El hecho de que la mayoría de nuestras cepas (88,48%) pertenecieran al género *Lactobacillus* y el que las especies dominantes fueran *L. curvatus* (62%) y *L. sakei*—*L.*

*bavaricus*” (25,15%) era esperable ya que ambas especies suelen predominar entre las BAL presentes en embutidos fermentados elaborados sin o con cultivos iniciadores y madurados a temperaturas inferiores a 25°C (Hammes *et al.*, 1992; Collins y Holzapfel, 1997; Ricke y Keeton, 1997, Santos *et al.*, 1998). Diversos estudios (Lücke, 1985; Bantleon, 1987; Schillinger y Lücke, 1987; Gehlen, 1989) han puesto de manifiesto que tanto *L. curvatus* como *L. sakei* poseen oxidasas flavin-dependientes capaces de formar peróxidos de hidrógeno y/u otros peróxidos no inactivados por catalasas (Talon *et al.*, 1980). Este carácter, la producción importante de ácido láctico, su tolerancia a este compuesto y otras propiedades (p.ej., crecimiento a bajas temperaturas) explican su capacidad para competir con éxito con el resto de la flora presente en los embutidos. La producción de peróxido de hidrógeno, si bien resulta favorable desde el punto de vista de la inhibición de otros microorganismos, puede dar lugar a defectos en los embutidos debido a su acción indeseable sobre los lípidos (oxidación de ácidos grasos insaturados y/o de los compuestos *hemo* de la mioglobina).

Figura 2. Evolución de las BAL durante la elaboración y maduración de chorizo de Cantimpalos (Industria B)



El número de trabajos en los que se identifican BAL que participan en la obtención de embutidos fermentados españoles es limitado. Hugas *et al.* (1993)

encontraron que las BAL aisladas de embutidos fermentados de forma natural (no especifican las variedades) pertenecían a las especies *L. sakei* (55%), *L. curvatus* (26%), “*L. bavaricus*” (11%) y *L. plantarum* (8%). En embutidos fermentados griegos (también elaborados sin cultivo iniciador), Samelis *et al.* (1994b) señalan que la mayoría de las cepas de BAL estudiadas (169 de 348) pertenecían a *L. curvatus* y *L. sakei* (casi en la misma proporción, siendo algo mayor la incidencia de la primera). Estos últimos autores también aislaron un número considerable (120) de cepas de *Weisella*. Este nuevo género fue propuesto por Collins *et al.* (1993) para incluir varias especies del grupo paramesenteroides (*Leuconostoc paramesenteroides* -*W. paramesenteroides*-, *Lactobacillus confusus* -*W. confusa*-, *L. halotolerans* -*W. halotolerans*-, *L. kandleri* -*W. kandleri*-, *L. minor* -*W. minor*-, *L. viridescens* -*W. viridescens*- y *W. hellenica* sp. nov.) (Stiles y Holzapfel, 1997).

La presencia ocasional en embutidos fermentados de otras especies de *Lactobacillus*, como *L. casei* subsp. *tolerans* y *L. alimentarius*, fue observada también por Comi *et al.* (1993) en salami fabricado artesanalmente. En ese mismo trabajo se describe la notable incidencia (19,5%) de “*L. carnis*” (*Carnobacterium piscicola*) que fue superior a la de *L. curvatus* (15,3%) aunque inferior a la de *L. sakeii* (29,7%). *Carnobacterium* spp. y más concretamente *C. piscicola* (“*L. piscicola*”, “*L. carnis*” y “*L. maltaromicus*”) constituye un porcentaje substancial de la flora acidoláctica asociada a la carne envasada a vacío (Hitchener *et al.*, 1982), aislándose tanto de la carne de animales de abasto como de la de aves (Dainty y MacKey, 1992). Se desconoce el hábitat original de las cepas de *Carnobacterium* presentes en los alimentos, habiéndose señalado que filogenéticamente están relacionadas con los géneros *Enterococcus* y *Vagococcus* (Hiu *et al.*, 1984; Wallbanks *et al.*, 1990). En nuestro estudio, sólo el 6,96% de las cepas de BAL se adscribieron a este género

La incidencia de *Pediococcus* spp. entre la población estudiada fue, asimismo, baja (7,59%), aunque superior a la encontrada por otros autores (Hugas *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994b), siendo tres las especies detectadas: *P. damnosus*, *P. parvulus* y *P. inopinatus*. El hecho de que los pediococos constituyan un porcentaje mínimo de la flora acidoláctica presente en los embutidos europeos elaborados sin cultivos iniciadores está bien documentado (Lücke, 1985). Cepas de *Pediococcus* como *P. acidilactici* (antes “*P. cerevisiae*”) y *P. pentosaceus* se utilizan con éxito como cultivos iniciadores en la

elaboración de productos cárnicos fermentados a temperaturas elevadas (>30°C). Los pediococos utilizados en la industria cárnica poseen una serie de propiedades deseables (tolerancia a los nitritos, supervivencia en un rango amplio de valores de pH, etc.); sin embargo, a temperaturas de 20°C o inferiores son incapaces de competir con las “estreptobacterias” (Lücke, 1985; Jessen, 1995).

**TABLA 1.** Distribución de las especies de BAL según día de muestreo, industria y lote

		<b>Industria A</b>				
		<b>Días de elaboración</b>				
	<b>Especie</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>15</b>	
<b>Lote I</b>	<i>L. sakei</i>	0	3	4	3	
	<i>subsp. carnosus</i> /" <i>L. bavaricus</i> "					
	<i>L. curvatus subsp. curvatus</i>	11	2	3	6	
	<i>P. damnosus</i>	0	3	2	0	
	<i>P. parvulus</i>	0	2	1	0	
	<i>P. inopinatus</i>	1	0	0	0	
	<i>C. piscicola</i>	1	0	0	0	
<b>Lote II</b>	<i>L. sakei subsp. carnosus</i> /" <i>L. bavaricus</i> "	1	4	1	6	
	<i>L. curvatus subsp. curvatus</i>	6	4	6	3	
	<i>P. parvulus</i>	1	0	0	0	
	<i>C. piscicola</i>	0	1	0	0	
	<i>L. casei subsp. tolerans</i>	0	0	0	1	
		<b>Industria B</b>				
		<b>Días de elaboración</b>				
	<b>Especie</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>21</b>
<b>Lote I</b>	<i>L. sakei subsp. carnosus</i> /" <i>L. bavaricus</i> "	0	0	1	1	1
	<i>L. curvatus subsp. curvatus</i>	3	9	3	5	7
	<i>P. inopinatus</i>	1	0	0	0	0
	<i>C. piscicola</i>	0	4	3	0	0
<b>Lote II</b>	<i>L. sakei subsp. carnosus</i> /" <i>L. bavaricus</i> "	0	0	1	1	1
	<i>L. curvatus subsp. curvatus</i>	6	4	8	6	6
	<i>P. damnosus</i>	0	1	0	0	0
	<i>C. piscicola</i>	0	0	1	1	0
	<i>L. alimentarius</i>	0	0	0	0	1

*Lactobacillus plantarum* también se emplea como cultivo iniciador en productos cárnicos curados (Bacus, 1981), encontrándose, asimismo, en embutidos fermentados de forma natural cuando el proceso tiene lugar a temperaturas superiores a 25°C (Kröckel, 1995). Las bajas temperaturas utilizadas en la elaboración del chorizo de Cantimpalos podrían explicar que no se detectaran en los lotes estudiados. En otros embutidos

Europeos, su incidencia es de *ca.* el 10% de la población total de BAL (Hugas *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994b).

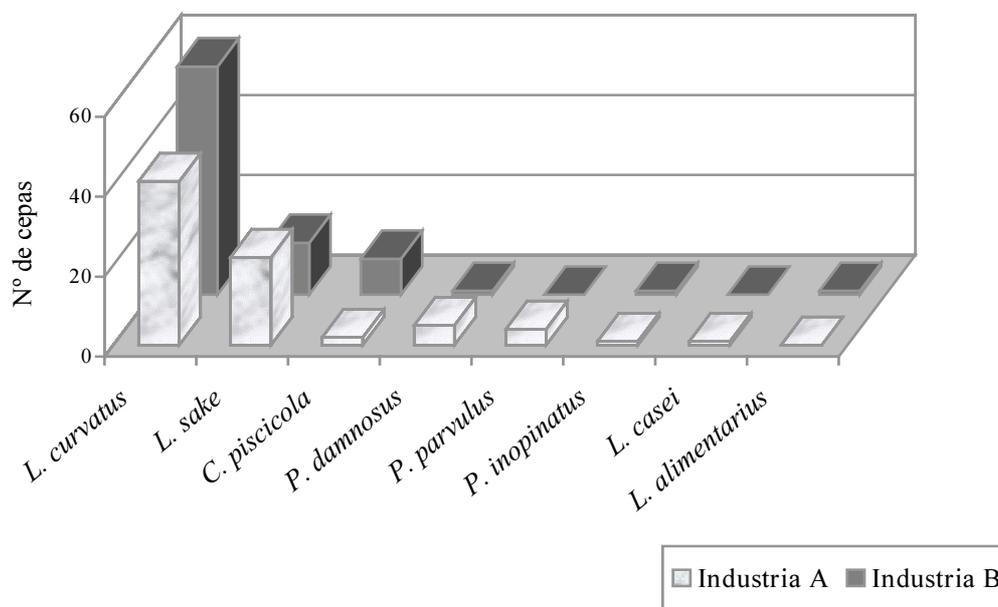
Ni *Leuconostoc* spp. ni otros lactobacilos (heterofermentativos obligados) que pueden llegar a constituir el 10% de la flora acidoláctica de los embutidos (Kröckel, 1995), incluido el chorizo (Seco-Alvarez, 1987) fueron aislados en nuestro estudio. La presencia de este grupo de microorganismos no es deseable por su capacidad de producir gas a partir de hidratos de carbono, peróxidos y limosidad, que ocasionan diversos defectos en estos productos cárnicos.

En cuanto a la identificación de la población de lactobacilos estudiada por nosotros, cabe destacar la homogeneidad de los patrones presentados por la mayoría de las cepas. Así, las identificadas como *L. curvatus* subsp. *curvatus* se caracterizaban por producir ácido de celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, ribosa y trealosa, no fermentando arabinosa, *mio*-inositol, lactosa, manitol, melecitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sorbitol y xilosa. Además, ninguna producía amoníaco a partir de la arginina. El perfil corresponde a la descripción de este microorganismo (Torriani *et al.*, 1995), sin embargo, al contrario de lo señalado para esta subespecie de *L. curvatus*, la mayoría eran capaces de crecer en presencia del 10% NaCl.

Todas las cepas que se adscribieron a *L. sakei* subsp. *carneus* producían amoníaco a partir de la arginina y crecían en medios de cultivo conteniendo 10% NaCl. En cuanto a la actividad fermentadora, mostraban actividad frente a galactosa, glucosa, manosa, melibiosa, ribosa, salicina, sacarosa y trealosa, careciendo de ella frente a celobiosa, lactosa, maltosa, manitol, melecitosa, rafinosa, ramnosa, sorbitol y xilosa.

El examen de la Tabla 1 pone de manifiesto que, en la industria A, la incidencia de *L. curvatus* subsp. *curvatus* era importante en la masa, disminuía a los dos días y aumentaba a los nueve, mientras que su presencia en el producto final (16 días) variaba con la evolución cuantitativa de las BAL; así en el lote I (las BAL seguían multiplicándose) aumentaba, y en el lote II (el número de BAL decrecía) disminuía de nuevo. En esta misma industria, *L. sakei* subsp. *carneus*/ "*L. bavaricus*" apenas se detectaba en la masa (sólo una cepa en el lote II) pero su incidencia aumentaba durante el proceso aunque, en el lote II, a los 9 días su presencia era mínima. Los pediococos se encontraron en las fases iniciales y/o intermedias pero no en el producto final y *C.*

Figura 3. Incidencia de las especies de bacterias acidolácticas en chorizo de Cantimpalos (Industrias A y B)



*piscicola* se detectaba sólo en la masa o en el segundo muestreo (2 días).

En la industria B también *L. curvatus* subsp. *curvatus* estaba presente en la masa aunque su incidencia era menor, detectándose en número variable durante toda la fabricación, pero en el producto final aumentaban (lote I) o se mantenían (lote II). *L. sakeii* subsp. *carneus*/ "*L. bavaricus*" se detectaba al avanzar la fabricación (lote I) o de forma estable durante todo el proceso (lote II). Como en el caso anterior, los pediococos y *C. piscicola* no aparecían en el producto final aunque la mayoría de las cepas de la última especie se detectaron en esta empresa y más concretamente en el lote I.

En resumen, *L. curvatus* subsp. *curvatus* siempre está presente en la masa, donde parece ser la especie dominante entre las BAL (26 cepas de 33), aunque su

comportamiento durante la fabricación del chorizo de Cantimpalos parece depender del sistema utilizado. Así, en el conjunto de los lotes de la fábrica A, descienden durante el proceso y, aunque al final aumentan, su incidencia en el producto listo para consumir es considerablemente inferior a la hallada en la masa. Sin embargo, en la industria B, tienden a multiplicarse durante los primeros días, siendo su número en el producto final igual (lote II) o mayor (lote I) al encontrado en la masa. *L. sakei* subsp *carneus*/ "*L. bavaricus*" no es frecuente en la masa (3 cepas de 33) pero muestra una tendencia a aparecer con mayor frecuencia en fases subsiguientes, siendo -casi siempre- mayor su aislamiento en el producto final. Los otros dos géneros hallados, *Pediococcus* y *Carnobacterium*, se detectaron generalmente en las fases iniciales y/o en las intermedias.

**TABLA 2.** Propiedades de posible interés tecnológico de la población de BAL estudiada

Prueba	nº cepas	%
Acetoína	41	25,94
Crecimiento a 7°C	158	100
Crecimiento en presencia de sal:		
8%	156	98,73
10%	152	96,20
Resistencia al calor:		
60°C/15min	150	94,93
60°C/30 min	146	92,40
Hidrólisis temprana del almidón	15	9,49
Hidrólisis tardía del almidón	72	45,56
Utilización de la maltosa	81	51,26
Utilización de la lactosa	88	55,69

La acción antibacteriana de las BAL frente a la flora presente en los alimentos fermentados se debe a la producción de ciertos compuestos entre los que destacan: ciertos ácidos orgánicos (láctico y acético), CO<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno, metabolitos primarios de bajo peso molecular (diacetilo, reuterina, 3-OH-propionaldehído), ácidos grasos y bacteriocinas (Holzapfel, 1998). En este trabajo (Tabla 3), 17 cepas de *L. curvatus* mostraron actividad antimicrobiana frente a alguna de las bacterias patógenas ensayadas (7 frente a *Staphylococcus aureus*, 10 frente a *Listeria monocytogenes* y 2 frente a *Aeromonas hydrophila*). También dos cepas de *L. sakei* y otras tantas de "*L. bavaricus*" presentaban este carácter, siendo las primeras inhibidoras

de *L. monocytogenes* o de *A. hydrophila* y las segundas de *S. aureus*. Este último patógeno era también inhibido por tres cepas de pediococos. En conjunto, el 16,45% de la población de BAL estudiada mostraba antagonismo frente a alguno de los patógenos estudiados. La actividad antibacteriana de cepas de BAL aisladas de carne y productos cárnicos ha sido observada por un número considerable de investigadores (Schillinger y Lücke, 1989; Lewus *et al.*, 1991; Sobrino *et al.*, 1991; Fernández y Díez, 1992; Sobrino *et al.*, 1992; Vignolo *et al.*, 1993) aunque las especies inhibidoras y el espectro antimicrobiano varían considerablemente. Entre las especies de *Lactobacillus* más importantes en embutidos parece que *L. sakei* "L. bavaricus" y *L. plantarum* son las más activas. Como en nuestro caso, cepas de *L. sakei* "L. bavaricus" de origen cárnico inhiben tanto a bacterias patógenas Gram-positivas -concretamente a *S. aureus* y *L. monocytogenes*- como a Gram-negativas, *A. hydrophila* (Lewus *et al.*, 1991; Klaenhammer, 1993). Aunque en este trabajo no se han llevado a cabo todas las pruebas habitualmente empleadas para demostrar que la actividad antibacteriana de las BAL es debida a la producción de bacteriocinas (Muriana y Luchausky, 1993), es evidente que la inhibición mostrada por los sobrenadantes de nuestras 26 cepas no era debida ni al ácido producido ni al peróxido de hidrógeno. Por ello, es probable que su efecto estuviera relacionado con la producción de compuestos similares a aquellas. Esto resulta interesante porque, habitualmente, las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas no suelen actuar frente a bacterias gram-negativas. También merece destacarse la actividad de *L. curvatus* frente a las bacterias patógenas estudiadas ya que el efecto inhibidor de las cepas de esta especie aparece raramente en la bibliografía. Así, Schillinger y Lücke (1989) señalan, que entre 75 cepas de *L. curvatus* aisladas de carne y productos cárnicos, sólo una inhibía a los microorganismos ensayados.

Los pediococos producen también bacteriocinas (pediocinas) pero la gran mayoría de los trabajos publicados (Ray y Hoover, 1993) se refieren a *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*. En este estudio, las cepas que mostraban actividad inhibidora se habían adscrito a otras especies; sin embargo, como se ha demostrado que la síntesis de bacteriocinas por cepas de *Pediococcus* está, a menudo, asociada a la presencia de plásmidos (Ray y Hoover, 1993) no es extraño que cepas pertenecientes a otras especies muestren también esta propiedad. Cepas de otra bacteria acidoláctica hallada por nosotros -*C. piscicola*- producen, asimismo, bacteriocinas (Schillinger *et al.*, 1993) pero

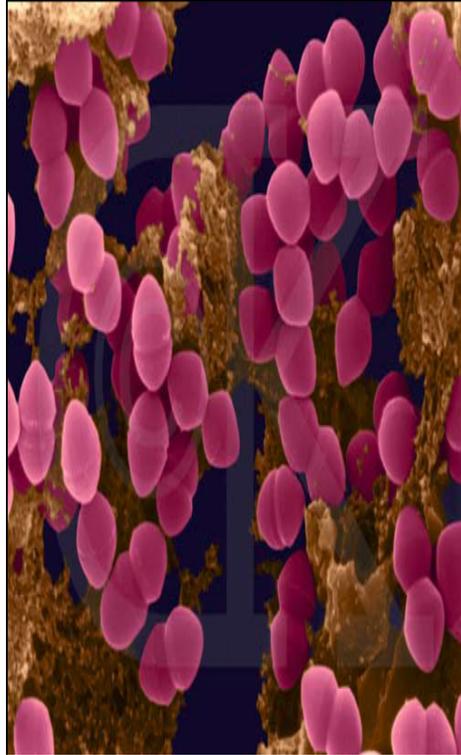
se considera que éstas no son de gran utilidad en la industria cárnica. Entre las cepas de *C. piscicola* obtenidas de chorizo de Cantimpalos, ninguna mostró actividad inhibidora frente a las bacterias ensayadas.

**TABLA 3.** Número de cepas de cada especie de BAL con acción inhibidora frente a distintas bacterias patógenas

BAL	Patógenos		
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>A. hydrophila</i>
<i>L. curvatus</i>	7	10	2
<i>L. sakei</i>		1	1
<i>L. bavaricus</i>	2		
<i>P. parvulus</i>	1		
<i>P. inopinatus</i>	1		
<i>P. damnosus</i>	1		

Nuestros datos y los obtenidos por otros investigadores sugieren que el empleo de BAL con propiedades tecnológicamente “interesantes” y capaces de inhibir a la flora indeseable (bacterias patógenas y/o alterantes) es un objetivo importante si se desea elaborar embutidos “seguros” y sin defectos. Aunque obtener un cultivo iniciador para la fabricación del chorizo de Cantimpalos no es el fin último de esta Tesis, parece razonable considerar que teniendo en cuenta las propiedades presentes en la Tabla 2 y la actividad antimicrobiana de las cepas de BAL estudiadas, existen posibilidades razonables de poder seleccionar cepas que garanticen la obtención de productos de excelente calidad organoléptica y exentos de riesgos desde el punto de vista sanitario.





## **CAPÍTULO 4.**

### *MICROCOCCACEAE*



## **INTRODUCCIÓN**

Desde que se publicaron los trabajos iniciales de Pohja (1960), Niinivaara y Pohja (1957), hace ya más de 40 años, quedó bien establecido y demostrado que miembros de la familia *Micrococcaceae* (*Micrococcus* y *Staphylococcus*) participaban en la obtención de embutidos fermentados, utilizándose cepas seleccionadas de ciertas especies como cultivos iniciadores. El efecto beneficioso de estos microorganismos está relacionado con su participación en la formación y estabilidad del color y en el desarrollo de un aroma y sabor deseables, lo que a su vez depende de la capacidad para producir ciertas enzimas como catalasa y nitrato-reductasa, sin olvidar otras actividades metabólicas de interés (Nychas y Arkoudelos, 1990; Kröckel, 1995; Hammes y Hertel, 1998).

Hasta no hace mucho tiempo (Nychas y Arkoudelos, 1990) se prestaba poca atención a la taxonomía de las micrococáceas presentes en los productos cárnicos fermentados, citándose como “micrococos” o “*Micrococcaceae*”. Posteriormente, se puso de manifiesto que la mayoría de las cepas de interés tecnológico se adscribían a especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativos (p. ej. *S. caseolyticus*, *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, etc.) y a algunas de *Micrococcus* (p.ej., *M. varians*). Sin embargo, los profundos cambios que ha sufrido la clasificación y nomenclatura de los miembros de esta familia sugieren que muchas de estas cepas podrían pertenecer a otras especies y subespecies e incluso a nuevos géneros; así *S. carnosus* se ha subdividido en dos subespecies, *S. carnosus* subsp. *carnosus* y *S. carnosus* subsp. *utilis*; *S. caseolyticus* y *Micrococcus varians* se han incluido en dos nuevos géneros recientemente propuestos, denominándose *Macrococcus caseolyticus* y *Kocuria varians*, respectivamente, y cepas próximas a *S. carnosus* se han diferenciado en una nueva especie *S. condimenti* (Stackebrandt *et al.*, 1995; Probst *et al.*, 1998; Kloos *et al.*, 1998a, 1998b).

Entre los posibles riesgos sanitarios asociados a la presencia de micrococáceas en embutidos, destaca la intoxicación estafilocócica debida a la multiplicación de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus*. Si la fermentación no se controla adecuadamente, esta bacteria que es ubicua, resistente a la sal y a los nitratos y capaz de crecer en

anaerobiosis, puede alcanzar niveles elevados ( $\geq 10^6$  ufc/g) y sintetizar enterotoxinas. Éstas, que son muy resistentes, permanecen estables en el producto aunque las células se inactiven durante la maduración.

El trabajo recogido en este capítulo se ha realizado para determinar el comportamiento de las micrococáceas (número y especies) durante la elaboración del chorizo de Cantimpalos. La potencial aptitud tecnológica de las cepas aisladas y el posible riesgo derivado de la presencia de *S. aureus* han sido también investigados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MUESTRAS Y RECUENTOS**

Las fabricaciones estudiadas, los días en los que se realizaron los muestreos y el procedimiento utilizado para llevar a cabo el homogeneizado y las diluciones se describen en los capítulos precedentes. Para los recuentos, se utilizó el método de siembra por extensión en superficie de placas de agar Sal Manitol (Unipath). Tras la incubación (48h a 30°C), de placas correspondientes a cada fase de muestreo, se seleccionaron al azar (Harrigan y McCance, 1976) 10 colonias que se sometieron a las pruebas de tinción por el método de Gram y producción de catalasa.

### **CEPAS**

Entre la población seleccionada, 77 cepas correspondían a cocos Gram-positivos, catalasa positivos que presentaban distintas formas de agrupamiento (racimos, tétradas, etc.). Éstas y otras 12 obtenidas del producto final (véase capítulo 2) se sometieron a las pruebas de caracterización que se señalan a continuación.

### **CARACTERIZACIÓN**

Se investigaron las propiedades siguientes: movilidad, producción de oxidasa, prueba de Voges-Proskauer, utilización del citrato, producción de ureasa y de arginina dihidrolasa, hidrólisis de la esculina, prueba de oxidación-fermentación de la glucosa y del manitol, crecimiento y características de las colonias en los medios *Staphylococcus medium* 110 (Difco) y agar de Baird-Parker (Unipath), crecimiento en medio semisólido con

tioglicolato, tolerancia a la sal (5, 7,5, 10 y 15% de NaCl), capacidad de multiplicación a distintas temperaturas (10, 15, 30, 37 y 45°C), producción de ácido a partir del glicerol en presencia de eritromicina, características del crecimiento en agar P (Kloos *et al.*, 1974), forma, tamaño, opacidad, superficie, aspecto del borde y pigmentos, características del crecimiento en medio líquido (densidad, formación de película superficial, aspecto de la turbidez y presencia de precipitado), sensibilidad a la lisostafina (200µg/ml), a la lisozima (50µg/ml) y a la furazolidona (von Rheinbaben y Hadlok, 1981), actividad hemolítica sobre eritrocitos de oveja, producción de coagulasa, producción de DNAsa y termonucleasa, resistencia a la novobiocina, actividad nitrato-reductasa, hidrólisis de la gelatina y la caseína, actividad lipolítica (Tween 20, Tween 80, yema de huevo y tributirina), prueba del rojo de metilo, producción de β-galactosidasa, crecimiento a 45°C en presencia de NaCl (10 y 15%), producción de fosfatasa y producción de ácido a partir de los siguientes hidratos de carbono: L-arabinosa, celobiosa, dulcitol, fructosa, galactosa, gluconato, glucosa, *mio*-inositol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melecitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, salicina, sacarosa, sorbitol, sorbosa, trealosa, xilitol y D-xilosa. Para la realización de estas pruebas se siguieron los métodos descritos por Cowan (1974), Lànyi (1987), Kloos *et al.* (1992) y Prieto *et al.* (1993).

#### DETECCIÓN DE LA CAPACIDAD ENTEROTOXIGÉNICA

Se investigó en las cepas que mostraban actividad coagulasa y/o termonucleasa utilizando un método ELISA sandwich (Fey *et al.*, 1984) y reactivos suministrados por el laboratorio del Dr. Bommeli (Suiza).

#### INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE ENTEROTOXINAS EN CHORIZO

En aquellas muestras de las que se aislaron cepas enterotoxigénicas, se investigó la presencia de enterotoxinas empleando los métodos de extracción, detección y cuantificación descritos por González-Fandos (1992).

#### IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante un sistema asistido por ordenador utilizando la matriz diseñada inicialmente por Prieto *et al.* (1993) y

modificada para incorporar todos los nuevos géneros y especies descritos hasta agosto de 1998.

## **RESULTADOS**

La evolución cuantitativa de la población de micrococáceas durante la elaboración del chorizo de Cantimpalos se muestra en la Tabla 1. Las doce cepas obtenidas del producto final (capítulo 2) se adscribieron a los géneros *Kocuria* (6 cepas), *Staphylococcus* (5 cepas) y *Planococcus* (1 cepa). Las cepas aisladas durante la fabricación de los 4 lotes incluidos en este estudio se identificaron como: *Staphylococcus* (56 cepas), *Kocuria* (12 cepas), *Macrococcus* (5 cepas), *Kytococcus* (2 cepas), *Nesterenkonia* (1 cepa) y *Planococcus* (1 cepa). Las especies a las que pertenecía el conjunto de las cepas se dan en la Tabla 2; mientras que en la Tabla 3 se presentan distribuidas según el día de muestreo, el lote y la industria. Finalmente, en las Tablas 4 y 5 se recogen los resultados obtenidos al investigar en las cepas ciertas propiedades de posible interés tecnológico.

Tres de las 19 cepas, que mostraron actividad coagulasa o termonucleasa y que correspondían a *S. aureus* (2 cepas) y a *S. intermedius* (1 cepa) eran enterotoxigénicas. Dos de ellas, procedentes de la misma muestra (15 días, lote I, industria B), aunque presentaban patrones fenotípicos diferentes sintetizaron enterotoxina B (12,34 y 14 ng/ml a las 18h de incubación en caldo BHI) y otra aislada de masa (lote I, industria B) producía enterotoxina A (1,45 ng/ml). En ninguna de las muestras de embutido de las que se obtuvieron estas cepas se detectó la presencia de las enterotoxinas producidas por las mismas.

## **DISCUSIÓN**

Entre otras propiedades, los miembros de la familia *Micrococcaceae* que participan en la obtención de embutidos fermentados se diferencian de las bacterias acidolácticas (BAL) por su capacidad de producir catalasa, su tolerancia a los valores

reducidos de  $a_w$  y su sensibilidad a los ácidos orgánicos. Debido a este último carácter, se considera que durante la fabricación de embutidos artesanales fermentados a bajas temperaturas las micrococáceas se pueden multiplicar en las fases iniciales del proceso, incrementando su número en 1-2 unidades logarítmicas/g, y que una vez alcanzados los niveles máximos ( $5-7 \log_{10}$  ufc/g), que coinciden con valores de pH de 5,40, tienden a disminuir hasta el final del proceso (Bacus, 1984; Lücke, 1985; Nychas y Arkoudelos, 1990; Kröckel, 1995). Este patrón de evolución es evidente que dependerá del número y actividad de las BAL, ya que poblaciones importantes de estas bacterias y/o la adición de compuestos fermentables tendrán un efecto inhibitor sobre las micrococáceas debido, principalmente, a la rápida producción de ácido láctico.

**TABLA 1.** Evolución cuantitativa de las micrococáceas así como del pH y la  $a_w$  durante la fabricación de chorizo de Cantimpalos

	<b>Industria A</b>				<b>Industria B</b>			
	<b>día</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>Mic.</b>	<b>día</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>Mic.</b>
<b>Lote I</b>	1	5,62	0,959	4,65 <sup>a</sup>	1	5,83	0,957	4,76
	2	5,55	0,955	3,95	3	6,02	0,952	4,41
	9	5,19	0,893	5,28	7	6,19	0,919	5,39
	16	5,00	0,880	6,01	15	5,12	0,901	5,71
					21	5,01	0,893	4,88
<b>Lote II</b>	1	6,11	0,945	6,92	1	6,10	0,961	6,83
	2	6,11	0,960	4,00	3	6,20	0,975	6,12
	9	5,52	0,872	6,01	7	5,70	0,921	7,85
	16	5,00	0,830	5,79	15	5,01	0,914	4,88
					21	4,91	0,901	6,15

<sup>a</sup>, log ufc/g

Como puede apreciarse en las Tablas 1 y 2, el comportamiento de las micrococáceas en este estudio difiere del patrón generalmente observado. Así, en todos los lotes, independientemente de la contaminación inicial y de la industria (diferente método de fabricación), se aprecia una disminución de la población en el segundo muestreo (2-3 días) y un incremento en el tercero (9-7 días). En las fases posteriores (16 días en la industria A y 15 y 21 días en la B), las poblaciones aumentaban, disminuían o mostraban oscilaciones. Resulta difícil explicar estos resultados en relación con las BAL y los valores de pH y, por supuesto, no coinciden ni con trabajos previos sobre chorizo realizados en nuestro laboratorio (Daporta, 1988; Encinas, 1993) ni con otros publicados

por autores españoles y que se refieren tanto a chorizo como a salchichón (Mendoza *et al.*, 1983; Selgas *et al.*, 1986; Garriga *et al.*, 1988; Selgas *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 1989; Ordóñez *et al.*, 1989; Selgas *et al.*, 1989). En cualquier caso, debe señalarse que una gran variedad de parámetros como el diámetro de la tripa, las condiciones de maduración, las especias, el ahumado, etc. también afectan significativamente a las micrococáceas durante la elaboración de embutidos fermentados (Encinas, 1993).

**TABLA 2.** Géneros y especies de *Micrococcaceae* presentes en el chorizo de Cantimpalos

<b>Cepas aisladas del producto final</b>		
<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Nº de cepas</b>
<i>Kocuria</i>	<i>K. varians</i>	5
	<i>K. kristinae</i>	1
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. gallinarum</i>	3
	<i>S. kloosii</i>	2
<i>Planococcus</i>	<i>P. kocurii</i>	1
<b>Cepas aisladas durante las fabricaciones</b>		
<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Nº de cepas</b>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	15
	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	2
	<i>S. kloosii</i>	13
	<i>S. xylosus</i>	8
	<i>S. epidermidis</i>	5
	<i>S. chromogenes</i>	3
	<i>S. intermedius</i>	2
	<i>S. hyicus</i>	2
	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	2
	<i>S. simulans</i>	2
<i>Kocuria</i>	<i>K. varians</i>	10
	<i>K. kristinae</i>	2
<i>Macrococcus</i>	<i>M. caseolyticus</i>	4
	<i>M. bovicus</i>	1
<i>Kytococcus</i>	<i>K. sedentarius</i>	2
<i>Nesterenkonia</i>	<i>N. halobia</i>	1
<i>Planococcus</i>	<i>P. kocurii</i>	1

**TABLA 3.** Géneros y especies de *Micrococcaceae* aisladas durante la fabricación y maduración de chorizo de Cantimpalos

Industria A					
Lote I			Lote I		
día	pH	Especie	día	pH	Especie
1	5,62		1	6,11	<i>K. varians</i> , <i>N. halobia</i> , <i>S. epidermidis</i> (2), <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (2), <i>S. kloosii</i>
2	5,55	<i>K. kristinae</i>	2	6,11	<i>S. kloosii</i> , <i>M. caseolyticus</i> , <i>K. varians</i>
9	5,19	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> , <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> , <i>S. xylosum</i> (2), <i>S. kloosii</i>	9	5,52	<i>P. kocurii</i>
16	5,00	<i>S. kloosii</i> (3), <i>K. kristinae</i>	16	5,00	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (3), <i>M. caseolyticus</i> , <i>M. bovicus</i>
Industria B					
Lote I			Lote II		
Día	pH	Especie	Día	pH	Especie
1	5,83	<i>S. kloosii</i> (2), <i>S. chromogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>K. sedentarius</i>	1	6,10	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. xylosum</i> (3), <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> , <i>K. varians</i> (2), <i>M. caseolyticus</i>
3	6,02	<i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i>	3	6,20	<i>M. caseolyticus</i>
7	6,19	<i>S. simulans</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. kloosii</i>	7	5,70	<i>S. chromogenes</i> , <i>S. kloosii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>K. varians</i> (3), <i>K. sedentarius</i>
15	5,12	<i>S. kloosii</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (5), <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> , <i>K. varians</i> (2)	15	5,01	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> , <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> , <i>S. xylosum</i>
21	5,01	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (2)	21	4,91	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>K. varians</i>

Aunque en las publicaciones antes mencionadas se obtienen recuentos variables de micrococáceas en la masa, los hallados por nosotros en los lotes II de las dos industrias estudiadas (*ca.*  $7 \log_{10}$  ufc/g) son considerablemente superiores a los habitualmente citados. En nuestra experiencia (Encinas, 1993), la calidad de las materias primas y su manipulación en las industrias influyen muy significativamente en la contaminación inicial por estos microorganismos.

Se ha señalado que los niveles de micrococáceas precisos para que, en los embutidos, tenga lugar una adecuada transformación de los nitratos en nitritos es de 6-7  $\log_{10}$  ufc/g, indicándose también que no es necesario que tenga lugar una multiplicación apreciable y ni siquiera que las células permanezcan viables para que se produzca el efecto deseado (Nurmi, 1966; Kröckel, 1995). En nuestro caso, salvo en el lote I de la industria B, siempre se detectaron en una o varias fases de las fabricaciones estas poblaciones. En la bibliografía existente sobre embutidos fermentados españoles, los recuentos máximos de estas bacterias oscilan entre 3 y 6  $\log_{10}$  ufc/g, valores que, como en este estudio, suelen alcanzarse a los 7-14 días de maduración (Martínez-Solís *et al.*, 1982; Mendoza *et al.*, 1983; Seco-Alvarez, 1987; Daporta, 1988; Garriga *et al.*, 1988).

En los embutidos fermentados franceses y alemanes, la mayoría de las micrococáceas que participan en la obtención de estos productos pertenecen a los géneros y especies siguientes: *Staphylococcus xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. warneri* y *Micrococcus varians* (ahora *Kocuria varians*) (Fischer y Schleifer, 1980; Delarras y Laban, 1981; Lücke, 1985; Seager *et al.*, 1986; Lücke, 1988; Nychas y Arkoudelos, 1990, Montel *et al.*, 1992). También en embutidos españoles y más concretamente en chorizo, las dos primeras parecen ser dominantes con una participación menor de otras especies tanto de micrococos (kocurias) como de estafilococos (Daporta, 1988; Encinas, 1993). Por lo que respecta a la inclusión en los cultivos iniciadores, las especies comúnmente empleadas son *S. xylosum*, *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. carnosus* subsp. *utilis*, *S. equorum*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* y *M. varians* (Montel *et al.*, 1992; Hammes y Hertel, 1998). Los datos recogidos en la Tabla 2 ponen de manifiesto que las cepas procedentes del capítulo 2 (producto final) se distribuían entre los géneros *Staphylococcus* y *Kocuria*, detectándose también una cepa de *Planococcus* (*P. kocurii*). Tanto *K. varians* como *K. kristinae* están habitualmente presentes en embutidos fermentados pero las especies de estafilococos halladas (*S.*

*gallinarum* y *S. kloosii*) son menos frecuentes. Ambas son de origen animal y resistentes a la novobiocina, diferenciándose fenotípicamente porque la primera reduce los nitratos y muestra una gran capacidad para producir ácido a partir de buen número de hidratos de carbono (Kloos *et al.*, 1992). El hábitat natural de *P. kocurii* es el pescado, detectándose también en soluciones de salmuera. Su presencia en los embutidos podría estar relacionada con la sal adicionada.

Al examinar los géneros (6) y especies y subespecies (18) de *Micrococcaceae* aislados durante la elaboración del chorizo de Cantimpalos (Tabla 2) y su evolución durante la fabricación (Tabla 3), se aprecia que, a pesar de la heterogeneidad inicial, el proceso sobre todo en la industria B, va seleccionando aquéllos que habitualmente se asocian con embutidos fermentados. La Tabla 3 muestra que la población presente en la masa incluía estafilococos y kocurias de interés en la obtención de estos productos, juntamente con estafilococos posiblemente de origen humano (*S. epidermidis* y *S. aureus* productor de enterotoxina A), o aportados por la materia prima (*S. chromogenes*). *Nesterenkonia halobia* (antes *Micrococcus halobius*), *Kytococcus sedentarius* (antes *Micrococcus sedentarius*) y *Macrococcus caseolyticus* (antes *Staphylococcus caseolyticus*) también se aislaron. El hábitat natural de *N. halobia* es la sal y los ambientes salinos y el de *K. sedentarius* la piel humana, mientras que *M. caseolyticus* no es infrecuente en embutidos (Nychas y Arkoudelos, 1990). A los tres días (lote I, industria B), destaca la presencia de una cepa de *S. aureus* productora de enterotoxina B, y de otra, cuyo fenotipo correspondía a *S. intermedius*, productora también de enterotoxina B. La última especie se aísla, principalmente, de carnívoros pero a partir de éstos puede fácilmente pasar a los manipuladores de alimentos (Kloos *et al.*, 1976). De origen animal, especialmente de ungulados domésticos, como el cerdo, son las cepas de *S. hyicus* y *S. chromogenes* que se detectaron en el tercer muestreo (lotes I y II, industria B), aislándose también en este momento (lote II, industria A) una cepa de *Planococcus kocurii*. *S. hominis* subsp. *hominis*, cuyo hábitat original es la piel humana se encontró a los 15 días de maduración en los lotes de la industria B. Al final de la maduración, las micrococáceas halladas en los embutidos fabricados en la industria A pertenecían mayoritariamente a las especies *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* y *S. kloosii* aunque *Kocuria kristinae*, *S. epidermidis*, *Macrococcus caseolyticus* y *Macrococcus bovicus* estaban también presentes. Esta última especie de

origen bovino ha sido descrita recientemente por Kloos *et al.* (1998). Las especies detectadas en el producto final de la industria B correspondían a las que mayoritariamente se aislan de embutidos fermentados: *S saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. xylosus* y *K. varians*.

**TABLA 4.** Características de posible interés tecnológico entre las 77 cepas obtenidas durante la fabricación de chorizo de Cantimpalos

Género	NaCl (%)		Proteolisis		Lipolisis				NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> -NaCl			
	10	15	Gel	Cas	T 20	T 80	Lec	Tri b		5	7,5	10	15
<i>Staph.</i> (56) <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	96,4	41,0	16,0	33,9	33,9	10,7	89,2	60,7	46,4	46,4	37,5	33,9
<i>Kocu.</i> (12)	100	75	41,6	8,33	33,3	33,3		75	75	66,6	58,3	33,3	25
<i>Macr.</i> (5)	100	100	20		40	40		100	80	60	60	60	60
<i>Kytoc.</i> (2)	100	100	50	50	100	100		100	100	100	100	100	100
<i>Neste.</i> (1)	100	100						100					
<i>Plano.</i> (1)	100							100	100			100	100
<b>Total (77)</b>	<b>100</b>	<b>92,2</b>	<b>38,9</b>	<b>14,2</b>	<b>35,0</b>	<b>35,0</b>	<b>7,79</b>	<b>89,6</b>	<b>64,9</b>	<b>51,9</b>	<b>49,3</b>	<b>40,2</b>	<b>36,3</b>

*Staph.*, *Staphylococcus*; *Kocu.*, *Kocuria*; *Macr.*, *Macroccoccus*; *Kytoc.*, *Kytococcus*; *Neste.*, *Nestereskonia*, *Plano.*, *Planococcus*, ()<sup>a</sup>, número de cepas adscritas a género; <sup>b</sup>, % de cepas sobre el número de cepas adscritas a género; Gel, gelatina Cas, caseína; T20, Tween 20; T 80, Tween 80; Lec, lecitina; Trib, tributirina; NO<sub>2</sub>, actividad nitrato-reductasa; NO<sub>2</sub>-NaCl %, actividad nitrato-reductasa en presencia de NaCl (%)

En resumen, posiblemente por el carácter artesanal de las industrias en las que se ha llevado a cabo el estudio, las micrococáceas presentes en las primeras fases de fabricación de chorizo de Cantimpalos pertenecían a diferentes géneros y especies. Un grupo correspondía a la flora normalmente asociada con estos productos cárnicos mientras que otro parecía derivar de los manipuladores, las materias primas (carne de cerdo y tejido adiposo) y los ingredientes (sal). Quizás debido al lento descenso del pH, este último grupo pudo sobrevivir durante cierto tiempo pero es el primero el que mayoritariamente estaba presente al final de la fabricación.

Aunque no se detectaron enterotoxinas en las muestras de chorizo contaminadas con cepas de estafilococos enterotoxigénicas, su presencia en un lote de la industria B y

las características del proceso de fabricación sugieren un posible riesgo sanitario.

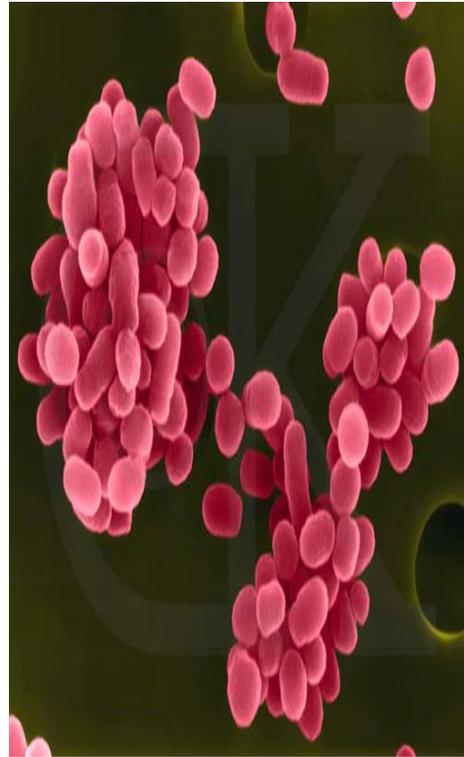
Como ya se señaló en la introducción de este capítulo, el papel tecnológico de las cepas de micrococáceas que participan en la obtención de embutidos fermentados se asocia, principalmente, con su capacidad para producir catalasa y nitrato-reductasa. Sin embargo, también se considera de interés su posible participación en el desarrollo de ciertas propiedades organolépticas deseables. Los datos de la Tabla 4 ponen de manifiesto que prácticamente toda la población estudiada era halotolerante, que el 65% de las cepas reducía los nitratos a nitritos y que una proporción considerable de estas últimas producía nitrato-reductasa en presencia de concentraciones elevadas de NaCl. La actividad proteolítica fue mayor frente a la gelatina que frente a la caseína (38,96 y 14,28%, respectivamente) y, en cuanto a la capacidad lipolítica, era importante (89,61%) cuando el substrato utilizado fue tributirina pero menor al emplear Tween 20 y Tween 80 (*ca.* 35%). Sólo seis cepas de estafilococos (coagulasa-positivos) producían lecitinasa. Los porcentajes de cepas de los distintos géneros que presentaban las propiedades citadas se dan, asimismo, en las Tablas 4 y 5. Como puede apreciarse, la incidencia de cepas positivas para estas pruebas entre los géneros mayoritarios (*Staphylococcus* y *Kocuria*) eran similares.

La influencia de la actividad proteolítica y lipolítica de las micrococáceas en el buqué de los embutidos fermentados ha recibido considerable atención en la última década (Selgas *et al.*, 1988; Montel *et al.*, 1993; Kröckel, 1995; Dainty y Blom, 1995; Montel *et al.*, 1996; Hammes y Hertel, 1998; Montel *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998). En la actualidad, se considera que su papel, especialmente en relación con la lipólisis, es inferior al que inicialmente se les atribuyó; así, aunque cepas especialmente lipolíticas de *Staphylococcus* contribuyen al incremento de ácidos grasos libres, no es necesario que estén presentes para que se desarrolle un aroma adecuado, pareciendo más importante la acción de las lipasas de la grasa y las fosfolipasas del músculo (Montel *et al.*, 1993; 1998). Por otra parte, ciertas especies de *Staphylococcus*, comúnmente asociadas con los productos cárnicos fermentados, pueden degradar aminoácidos libres (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina o metionina) produciendo alcoholes, aldehidos y ácidos que, aparentemente, son importantes en el buqué de los embutidos. Finalmente, al menos *in vitro*, los estafilococos pueden producir etil-ésteres que participan en el aroma (Montel *et al.*, 1996, 1998).

**TABLA 5.** Características de posible interés tecnológico de las 12 cepas obtenidas de chorizo de Cantimpalos (producto final en punto de venta)

Género	NaCl (%)		Proteolisis		Lipolisis				NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> -NaCl %			
	10	15	Gel	Cas	T 20	T 80	Lec	Tri		5	7,5	10	15
<i>Kocu.</i> (6) <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100	33,3	33,3	16,6	16,6	16,6	83,3	33,3	33,3	33,3	33,3	
<i>Staphy.</i> (5)	80	80	20					80	60	20	20	20	
<i>Planoc.</i> (1)			100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<b>Total (12)</b>	<b>83,3</b>	<b>83,3</b>	<b>33,3</b>	<b>25</b>	<b>16,6</b>	<b>16,6</b>	<b>16,6</b>	<b>83,3</b>	<b>50</b>	<b>33,3</b>	<b>33,3</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

*Kocu.*, *Kocuria*; *Staphy.*, *Staphylococcus*; *Planoc.*, *Planococcus*; ()<sup>a</sup>, número de cepas adscritas a género; <sup>b</sup>, % de cepas sobre el número de cepas adscritas a género, Gel, gelatina, Cas, caseína; T20, Tween 20; T 80, Tween 80; Lec, lecitina; Trib, tributirina, NO<sub>2</sub>, actividad nitrato-reductasa; NO<sub>2</sub>- NaCl %, actividad nitrato-reductasa en presencia de NaCl (%)



## **CAPÍTULO 5.**

### **LEVADURAS**



## **INTRODUCCIÓN**

Los primeros trabajos en los que se estudiaron levaduras presentes en los embutidos se remontan a la segunda década de este siglo (Kühl, 1910; Carry, 1916), publicándose posteriormente un número apreciable de artículos sobre su papel alterante en embutidos frescos, especialmente en aquéllos a los que se adicionaban sulfitos como conservadores (Dillon, 1998).

Al igual que los mohos, niveles bajos de levaduras están presentes en la carne donde, generalmente, son incapaces de competir con éxito con las bacterias psicrotrofas Gram-negativas (Dillon y Board, 1991). Sin embargo, en algunos productos cárnicos como embutidos fermentados o jamón, pueden llegar a constituir una parte significativa de la flora (Cook, 1995). La participación de ciertas levaduras en la obtención de embutidos es un hecho bien contrastado (Bacus, 1984) aunque los datos sobre el papel que desempeñan en el proceso son mucho más limitados que los relativos a la participación de otros grupos microbianos como las bacterias acidolácticas, las micrococáceas e incluso los mohos (Hammes y Hertel, 1998). En general, se considera que la multiplicación de cepas de géneros como *Candida* y *Debaryomyces* contribuye a la eliminación del oxígeno y a la reducción de las pérdidas de peso (humedad) durante el curado. Asimismo, por su capacidad para degradar peróxidos y por su actividad lipolítica y, en menor medida, proteolítica participan en el desarrollo del buqué. Finalmente, podrían proteger a los embutidos de los efectos indeseables de la luz (Cook, 1995). Por este motivo, cepas de *Debaryomyces hansenii* suelen utilizarse, solas o en combinación con cepas de *Penicillium*, como cultivos iniciadores fúngicos (Hammes y Hertel, 1998).

La bibliografía existente sobre la identidad de las levaduras presentes en carne y productos cárnicos es muy reducida, especialmente si se compara con el gran número de estudios en los que se identifican las bacterias presentes en estos hábitats. Las continuas modificaciones taxonómicas y las dificultades asociadas a su aislamiento e identificación han contribuido, sin duda, a este hecho.

Este trabajo se ha realizado con el fin de determinar la evolución cuantitativa y cualitativa de las levaduras durante la fabricación del chorizo de Cantimpalos. Asimismo, se han investigado ciertas propiedades de posible interés tecnológico en 127

cepas de levaduras aisladas de este hábitat, así como la utilidad para su identificación de un sistema comercial miniaturizado.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MUESTRAS Y RECUENTOS**

También en este caso se siguieron las dos fabricaciones de la industria A y las dos de la industria B. En la primera, se tomaron muestras los días 1, 2, 9 y 16 y, en la segunda, los días 1, 3, 6, 15 y 21. Los recuentos se llevaron a cabo en agar Oxitetraciclina, Glucosa, Extracto de Levadura (OGYE, Unipath). La incubación se realizó a 25°C durante 5 días.

### **CEPAS**

De placas correspondientes a cada día de muestreo se seleccionaron al azar (Harrigan y McCance, 1976) un total de 127 cepas, que se purificaron por pases alternativos en caldo y agar Extracto de Malta (Unipath) y, hasta su caracterización e identificación, se mantuvieron en viales de agar Extracto de Malta (Unipath) en condiciones de refrigeración.

### **CARACTERIZACIÓN**

La caracterización de las cepas se realizó por dos sistemas diferentes:

a. Sistema miniaturizado API ID32C (API System, Biomérieux, Vercieu, Francia), utilizando de forma complementaria pruebas morfológicas clásicas (91 cepas).

b. Caracterización e identificación utilizando exclusivamente pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas (36 cepas).

Un total de 13 cepas se caracterizaron e identificaron utilizando ambos sistemas.

Las pruebas de caracterización e identificación empleadas y la metodología utilizada en su realización fueron las siguientes:

#### **1. Pruebas morfológicas**

- 1.a. Reproducción vegetativa o asexual.
- 1.b. Formación de clamidosporas y balistosporas.
- 1.c. Reproducción sexual.
- 1.d. Formación de micelio y/o pseudomicelio.

## 2. Pruebas fisiológicas y bioquímicas

- 2.a. Crecimiento en medio líquido.
- 2.b. Crecimiento en medio sólido.
- 2.c. Asimilación del nitrato.
- 2.d. Hidrólisis de la urea.
- 2.e. Producción de ácido y gas de la glucosa.
- 2.f. Asimilación de ciertos hidratos de carbono.

## 3. Pruebas de interés tecnológico

- 3.a. Capacidad de reducción de los nitratos.
- 3.b. Crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (2, 4, 6, 7 y 10%).
- 3.c. Hidrólisis de la caseína.
- 3.d. Hidrólisis de la tributirina.
- 3.e. Crecimiento a diferentes temperaturas: 5, 10, 25, 30, 37 y 42°C.

**Reproducción vegetativa.** Para la observación de este tipo de reproducción, se utilizó una modificación del método de Dalmau (Kreger-van Rij, 1984).

**Formación de clamidosporas y balistosporas.** La observación de este tipo de esporas asexuales se llevó a cabo a partir de las placas utilizadas para la observación de la reproducción vegetativa.

**Reproducción sexual.** La formación de estructuras de reproducción sexual se investigó en dos medios de cultivo diferentes: el medio Gorodkova (van der Walt y Yarrow, 1984) y el de Adams (López-Díaz, 1993).

**Formación de micelio y pseudomicelio.** La observación de los mismos se realizó en placas de agar Harina de Maíz (Difco) siguiendo las indicaciones de Dalmau (Kreger van Rij, 1984).

**Crecimiento en medio líquido.** Las cepas se inocularon en caldo Extracto de Malta (Unipath) y se incubaron a 25°C durante 24-48h. Las características investigadas fueron formación de película, anillo, islotes, adherencia y sedimento.

**Crecimiento en medio sólido.** El medio utilizado fue el agar Dextrosa Saboureaud (Difco) incubado a 25°C durante 24-48 h. Las características consideradas fueron pigmentación, aspecto de la colonia y tamaño.

**Asimilación del nitrato.** La prueba se llevó a cabo en el medio *Yeast Carbon Base* (Difco) en la forma descrita por López-Díaz (1993).

**Hidrólisis de la urea.** La producción de ureasa se investigó en el medio agar Base para Urea de Christensen (Unipath) distribuido en tubos (pico de flauta) e incubados a 25°C durante 5 días.

**Producción de ácido y gas de la glucosa.** El medio base utilizado tenía la siguiente composición porcentual: 4,5 g de extracto de levadura (Unipath), 7,5 g de peptona (Unipath) y 100 ml de agua destilada a la que se añadió solución acuosa de azul de bromotimol (0,08% p/v) hasta alcanzar un color verde intenso. Volúmenes de 4 ml se distribuyeron en tubos de ensayo conteniendo campanas de Durham y, a continuación, se les añadió 1 ml de una solución de glucosa (Unipath) al 12% (p/v). La incubación se realizó a 25°C durante 7 días.

**Asimilación de hidratos de carbono.** El medio utilizado fue *Yeast Carbon Base* (Difco), preparando el medio con azúcar esterilizado por filtración (filtros Millipore, 0,22 µm de diámetro de poro). La siembra se llevó a cabo en placas de microtítulo empleando un multiinoculador Dynatech. En cada pocillo (conteniendo 150 µl de medio) se dispensaron 50 µl del inóculo preparado de la misma forma que para la realización del API ID32C. Es decir, las colonias tomadas de las placas de agar Saboureaud se suspendieron en agua destilada estéril (unos 2 ml) y se ajustó su turbidez al n° 2 de la escala de MacFarland.

Los hidratos de carbono ensayados fueron: L-arabinosa, celobiosa, eritritol, esculina, galactosa, glicerol, gluconato, D-glucosa, glucuronato, N-acetil-glucosamina,  $\alpha$ -metil-glucósido, *mio*-inositol, DL-lactato, lactosa, maltosa, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, sorbitol, sorbosa, trealosa y D-xilosa. Las placas se incubaron a 25°C, realizándose lecturas a las 24 y 48 horas y a los 5 días.

**Crecimiento en presencia de NaCl.** Para esta prueba se empleó caldo Extracto de Malta (Unipath) conteniendo NaCl (Panreac) hasta alcanzar una concentración final del 2, 4, 6, 7 ó 10%. Las condiciones de incubación fueron de 5 días a 25°C.

**Crecimiento a diferentes temperaturas.** El medio utilizado fue agar Dextrosa Saboureaud (Difco). Las placas se incubaron a 5, 25, 30, 37 y 42°C durante 5 días.

**Actividad proteolítica.** Esta actividad se investigó siguiendo el método descrito por El-Gendy y Marth (1980). Después de incubar las placas a 25°C durante 5 días, se midió el diámetro del halo de hidrólisis.

**Actividad lipolítica.** Se empleó el medio agar Tributirina (Unipath), incubándose a 22°C durante 5 días, y, como en la prueba anterior, se midió el diámetro de los halos de aclaramiento (Harrigan y McCance, 1976).

#### UTILIZACIÓN DEL SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN MINIATURIZADO API ID32C

El procedimiento seguido se ajustó a las recomendaciones del fabricante (API System, Biomérieux, Vercieu, Francia).

#### IDENTIFICACIÓN

La adscripción de las cepas a género y especie se realizó utilizando los esquemas propuestos por Barnett *et al.* (1985, 1990). Las cepas identificadas por el sistema API ID32C lo fueron de acuerdo con el catálogo de bionúmeros proporcionado por el fabricante (API System, Biomérieux, Vercieu, Francia).

#### RESULTADOS

La evolución cuantitativa de las levaduras durante la fabricación y maduración-secado del chorizo de Cantimpalos fabricado en las industrias A y B se presenta en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

La población estudiada se adscribió a los géneros *Candida* (78 cepas), *Debaryomyces* (22 cepas), *Kluyveromyces* (8 cepas), *Pichia* (5 cepas), *Yarrowia* (4 cepas) y *Geotrichum* (1 cepa). Las 9 cepas restantes no pudieron identificarse a nivel de género.

La incidencia y evolución de los géneros y especies aisladas de las muestras obtenidas en ambas industrias se dan en la Tabla 3. Las relaciones halladas al caracterizar e identificar 13 cepas por los dos procedimientos utilizados en este trabajo se recogen en la Tabla 4. Y las propiedades de posible interés tecnológico se presentan en la Tabla 5.

**DISCUSIÓN**

El nivel inicial de levaduras en los dos lotes de la industria A (Tabla 1) y en el lote I de la industria B (Tabla 2) fue similar: 4,81 y 4,63  $\log_{10}$  ufc/g, respectivamente. En el lote II de esta última la contaminación de la masa fue notablemente superior (6,41  $\log_{10}$  ufc/g). Por lo que respecta al comportamiento a lo largo del proceso de elaboración, era parecido en todas las fabricaciones, caracterizándose por una tendencia, más o menos acusada, a disminuir en las fases iniciales y a un incremento en los últimos muestreos.

**TABLA 1.** Evolución de la población de levaduras durante el proceso de elaboración y maduración del chorizo de Cantimpalos elaborado en la industria A

	Parámetro	Días de elaboración			
		1	2	9	16
Lote I	Población <sup>a</sup>	4,81	4,59	5,44	ND <sup>b</sup>
	pH	5,61	5,55	5,19	5,00
	a <sub>w</sub>	0,959	0,955	0,893	0,880
Lote II	Población	4,81	3,74	5,19	5,07
	pH	6,11	6,10	5,52	4,99
	a <sub>w</sub>	0,945	0,960	0,872	0,830

<sup>a</sup>,  $\log$  ufc/g; <sup>b</sup>, no determinado

En estudios parecidos, realizados en España sobre todo en chorizo y salchichón, el número de levaduras presentes en la masa oscila entre 3,93 y 5,69  $\log_{10}$  ufc/g (Martínez-Solís *et al.*, 1982; Seco-Alvarez, 1987; Daporta, 1988; Sarasibar *et al.*, 1989; Encinas, 1993); mientras que la evolución cuantitativa durante el proceso suele ser variable ya que, en unos casos, se observa la multiplicación de este grupo microbiano y, en otros, se aprecia su disminución. Factores tales como el tipo de fabricación (artesanal o industrial), el diámetro del embutido, el ahumado, etc. influyen significativamente en el comportamiento de las levaduras durante la obtención de estos productos cárnicos (Lücke y Hechelmann, 1988; Encinas, 1993). Aunque la información sobre embutidos fermentados fabricados en otros países no es muy abundante, en general, los datos

relativos a su presencia en la masa y a su evolución posterior coinciden con los señalados anteriormente (Samelis *et al.*, 1994b; Cook, 1995; Papa *et al.*, 1995).

La mayoría de las cepas aisladas por nosotros pertenecían a los géneros *Candida* (*C. zeylanoides*) y *Debaryomyces* (*D. hansenii*). Estos géneros y especies suelen constituir una parte importante de la flora fúngica aislada de diferentes variedades de embutidos fermentados (Jay, 1978; Banks y Board, 1987; Grazia *et al.*, 1989; McCarthy y Damaglou, 1993; Viljoen *et al.*, 1993; Buzzini y Haznedari, 1995; Cook, 1995). En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio Encinas (1993) también halló que *Candida* spp. y *D. hansenii* eran frecuentemente aisladas de chorizo y salchichón, pero la incidencia era inferior a la obtenida en este trabajo, destacando en aquel la importancia de *Trichosporon beigelii* y de *Yarrowia lipolytica*. El aislamiento de *Trichosporon* y de *Yarrowia* es, asimismo, habitual en productos cárnicos curados (Cook, 1995; Dillon, 1998).

**TABLA 2.** Evolución de la población de levaduras durante el proceso de elaboración y maduración del chorizo de Cantimpalos elaborado en la industria B

		Días de elaboración				
Parámetro		1	3	6	15	21
Lote I	Población <sup>a</sup>	4,63	4,60	4,87	ND <sup>b</sup>	5,84
	pH	5,83	6,01	6,18	5,11	5,00
	a <sub>w</sub>	0,957	0,952	0,919	0,901	0,893
Lote II	Población	6,41	5,39	4,17	6,76	7,00
	pH	6,10	6,20	5,70	5,01	4,91
	a <sub>w</sub>	0,961	0,975	0,921	0,914	0,901

<sup>a</sup>, log ufc/g; <sup>b</sup>, no determinado

En cuanto a la evolución de las especies halladas, la Tabla 3 pone de manifiesto que *C. zeylanoides* se obtuvo de todas las muestras analizadas, salvo en el lote II-B en el que dejó de detectarse a partir del tercer día. Esta especie, que fue descrita por primera vez en salchichón (Ramírez y González, 1972), es un contaminante importante de carne y productos cárnicos (Dillon y Board, 1991). Aunque *Candida* spp. en general y *C.*

*zeylanoides* en particular pueden llegar a constituir una fracción considerable de la flora alterante de la carne, en nuestro caso, su elevada incidencia nunca se asoció con defectos en los embutidos estudiados.

**TABLA 3.** Distribución de las especies de levaduras según el día de muestreo, la industria y el lote

		<b>Industria A</b>				
		<b>Días de elaboración</b>				
<b>Lote</b>	<b>Especie<sup>a</sup></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	
<b>I</b>	<i>C. zeylanoides</i>	8	7	7		
	<i>Candida</i> spp.		1	1		
<b>II</b>	<i>C. zeylanoides</i>	6	1	2	6	
	<i>C. catenulata</i>	1				
	<i>C. famata</i>		2			
	<i>C. lusitaniae<sup>b</sup></i>			1		
	<i>C. colliculosa<sup>c</sup></i>			1		
	<i>Candida</i> spp.	1	2		1	
	<i>Pichia</i> spp.				1	
NI	1	4	2	1		
		<b>Industria B</b>				
		<b>Días de elaboración</b>				
<b>Lote</b>	<b>Especie</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>21</b>
<b>I</b>	<i>C. zeylanoides</i>	9	9	6		3
	<i>D. hansenii</i>			3		4
	<i>K. marxianus</i>					2
	<i>P. guilliermondii</i>			1		
	NI	1				
<b>II</b>	<i>C. zeylanoides</i>	2	1			
	<i>D. hansenii</i>	4	5	2	3	1
	<i>K. marxianus</i>		1		5	
	<i>P. guilliermondii</i>		1	2		
	<i>Y. lipolytica</i>	3		1		
	<i>G. penicillatum</i>	1				

<sup>a</sup>, *C.*, *Candida*; *D.*, *Debaryomyces*; *K.*, *Kluyveromyces*; *P.*, *Pichia*; *Y.*, *Yarrowia*; *G.*, *Geotrichum*, género de levadura reclasificado como moho; NI, no identificada; <sup>b</sup>, anamorfa de *Torulasporea delbruekii*; <sup>c</sup>, anamorfa de *Clavispora lusitaniae*

Curiosamente, *D. hansenii*, que fue la segunda especie en importancia (17,7% de las cepas), sólo se detectó en los lotes fabricados en la industria B. Este hecho podría estar relacionado no sólo con las prácticas de elaboración propias de esta industria sino también con la materia prima empleada (carne de cerdo blanco de cebadero y de

animales del tronco ibérico). La micoflora presente en la carne depende, en gran medida, de la del animal vivo y ésta, a su vez, de la del medio ambiente.

**TABLA 4.** Coincidencia de pruebas e identificación de 13 cepas estudiadas por los sistemas tradicional y miniaturizado API ID32C

nº de cepa	Clásica	Correspondencia <sup>a</sup>	API ID32C
1	<i>C. zeylanoides</i> <sup>b</sup>	65,38	<i>C. zeylanoides</i>
10	<i>C. zeylanoides</i>	76,92	<i>C. zeylanoides</i>
12	<i>C. zeylanoides</i>	65,38	<i>C. zeylanoides</i>
23	<i>C. zeylanoides</i>	57,69	<i>C. zeylanoides</i>
30	<i>C. zeylanoides</i>	65,38	<i>C. zeylanoides</i>
34	<i>C. zeylanoides</i>	42,30	<i>C. zeylanoides</i>
38	<i>D. hansenii</i>	73,07	<i>Debaryomyces</i> spp.
100	<i>D. hansenii</i>	73,07	<i>Debaryomyces</i> spp.
113	<i>D. hansenii</i>	69,23	<i>Cr. humicola</i>
117	<i>Cr. humicola</i>	73,07	NI
125	<i>K. marxianus</i>	73,07	NI
138	<i>K. marxianus</i>	80,76	NI
142	<i>Candida</i> spp.	84,61	<i>Cr. humicola</i>

<sup>a</sup>, % de correspondencia en las pruebas de asimilación de hidratos de carbono <sup>b</sup>, *C.*, *Candida*; *D.*, *Debaryomyces*; *K.*, *Kluyveromyces*; *Cr.*, *Cryptococcus*

Este hecho que también se describe para otros grupos microbianos parece ser especialmente importante en el caso de las levaduras. Dillon y Board (1991) revisaron diversos aspectos de las levaduras asociadas con la carne de los animales de abasto poniendo de manifiesto que las especies aisladas del suelo, de los pastos y de las explotaciones lo eran también del exterior de los animales (vacas y ovejas), de los mataderos y de las canales. Al igual que con *D. hansenii*, las cepas de *Kluyveromyces marxianus* y de *Y. lipolytica* sólo se detectaron en embutidos elaborados en la industria B. *K. marxianus* que se aísla del hombre, de ciertos mamíferos y de productos lácteos (Barnett *et al.*, 1990) no se relaciona habitualmente con carne y productos cárnicos (Dillon y Board, 1991; Cook, 1995; Dillon, 1998). Por el contrario levaduras del género

*Pichia*, y más concretamente, *P. guilliermondii* sí parecen tener cierta importancia en estos hábitats (Cook, 1995).

La dificultad para identificar las levaduras presentes en los alimentos ya se ha señalado anteriormente. En este estudio, nueve cepas no pudieron adscribirse a ningún género descrito. El porcentaje de cepas identificadas (82,28%) fue superior al hallado en trabajos similares (Rohm *et al.*, 1990) pero inferior al obtenido por Encinas (1993) en nuestro laboratorio. Al comparar los resultados obtenidos con las 13 cepas que se identificaron por métodos convencionales y con el sistema miniaturizado, se apreció un valor medio de coincidencia en las pruebas de utilización (asimilación) de azúcares del 70%, correspondiendo el mínimo a una cepa de *C. zeylanoides* (cepa 34, 42,3%) y el máximo a una de *Candida* spp. (cepa 142, 84,6%). En su identificación (Tabla 4), las seis cepas de *C. zeylanoides* pudieron identificarse por ambos métodos, sin embargo, el sistema miniaturizado no permitió adscribir, ni siquiera a género, dos cepas de *K. marxianus* y una de *Cr. humicola*. Con este último sistema, se identificaron, a nivel de género, dos cepas de *D. hansenii*, aunque la tercera (al igual que otra adscrita a *Candida* spp. por el sistema clásico) fueron identificadas como *Cryptococcus humicola*.

Más del 95% de las cepas eran psicrotrofas, halotolerantes y lipolíticas. Además todas crecían a 10°C y utilizaban la glucosa. Por el contrario, ninguna hidrolizaba la caseína (Tabla 5) y la capacidad para asimilar el ácido láctico y otros hidratos de carbono distintos de la glucosa era variable. Las levaduras presentes de forma natural en los embutidos fermentados y otros productos cárnicos crudos curados se ven favorecidas por su tolerancia a la sal y a los valores bajos de pH y  $a_w$ ; asimismo, la capacidad para crecer en condiciones de refrigeración es un carácter que facilita su supervivencia y multiplicación en productos cuya obtención se lleva a cabo a bajas temperaturas. Como en el estudio de Huerta *et al.* (1988), hemos comprobado que nuestras cepas eran halotolerantes, psicrotrofas y no proteolíticas y, coincidiendo con la mayoría de la bibliografía (Cook, 1995; Jessen, 1995; Dillon, 1998), mostraban una intensa actividad lipolítica.

La capacidad de ciertas especies de levaduras para utilizar compuestos nitrogenados e hidratos de carbono ha sido investigada por varios autores (Guerzoni *et al.*, 1993; Singigaglia *et al.*, 1994; Buzzini y Haznedari, 1995). En estos trabajos se pone de manifiesto que especies del género *Trichosporon* así como *Y. lipolytica* pueden poseer una notable actividad proteolítica y que otras como *Rhodotorula glutinis* alteran

alimentos ricos en hidratos de carbono. Quizás, lo más destacable de nuestras cepas sea su incapacidad para hidrolizar la caseína, pero como ya hemos señalado, también Huerta *et al.* (1988) encontraron que, en una población de levaduras obtenidas de jamón crudo curado, la mayoría no eran proteolíticas. Otro dato a resaltar sería el hecho de que las cepas que utilizaban el ácido láctico eran únicamente las aisladas en las fases finales del proceso.

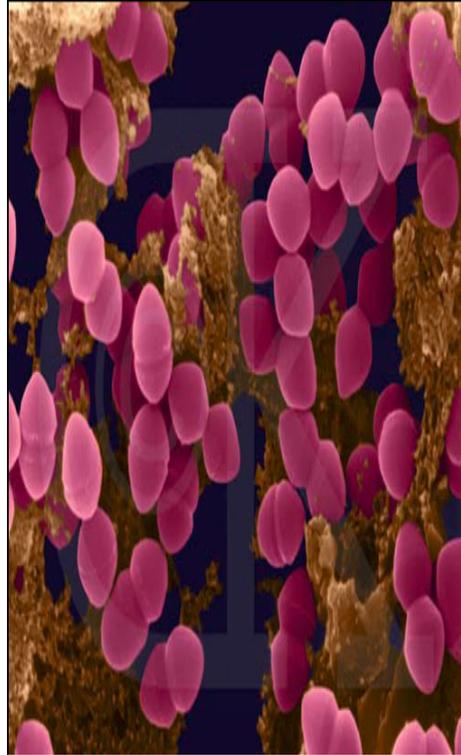
**TABLA 5.** Propiedades de posible interés tecnológico de la población estudiada

<b>Prueba</b>	<b>Industria A</b>	<b>Industria B</b>	<b>Ambas industrias</b>
Lipólisis	96,61 <sup>a</sup>	95,58	96,06
Reducción NO <sub>3</sub>	1,69	1,47	1,57
Crecimiento a:			
5°C	100	97,05	98,53
10°C	100	100	100
30°C	100	100	100
10% NaCl	100	100	100
Utilización de:			
Lactosa	1,69	32,35	18,11
Maltosa	28,8	66,11	48,81
Sacarosa	30,50	55,88	44,09
Glucosa	100	100	100
DL-lactato	38,90	44,11	41,08

<sup>a</sup>, % de cepas que presentaban la característica

Si consideramos las propiedades que presentaban las cepas de levaduras obtenidas del chorizo de Cantimpalos y los datos publicados acerca del papel de estos microorganismos en la fabricación de embutidos fermentados (Jessen, 1995), parece posible concluir que esta población, como en otros productos similares, contribuye a las características de este tipo de chorizo. Más difícil resulta pronunciarse sobre la posible selección de un cultivo iniciador. En principio, muchas de las cepas aisladas poseen propiedades que presentan las cepas utilizadas comercialmente (halotolerancia,

actividad lipolítica, no reducción de nitratos, etc.). Sin embargo, la elección de estos cultivos implica una profunda caracterización tanto desde el punto de vista taxonómico como de su total inocuidad, siendo preciso también determinar aspectos eminentemente prácticos como son las interacciones con el resto de los grupos microbianos de interés tecnológico, los niveles de inoculación para evitar alteraciones y su sensibilidad a aditivos, conservadores y ciertos ingredientes.



## **CAPÍTULO 6.**

### **ENTEROCOCOS**



## **INTRODUCCIÓN**

En la última edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Mundt, 1986) se incluyen siete géneros de cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos. Uno de éstos corresponde al género *Streptococcus* que a su vez se dividió en tres géneros: *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Schleifer *et al.*, 1984, 1985, 1987).

Todos los miembros del género *Enterococcus* se caracterizan por ser pirrolidonil-arilamidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP) positivos, toleran concentraciones del 6,5% de cloruro sódico en medio líquido, crecen en caldo *Elliker* (caldo BE), crecen a 10 y 45°C (*Enterococcus cecorum* no crece a 10°C ni en presencia de 6,5% NaCl) y no forman gas de glucosa en caldo MRS (Medio para *Lactobacillus*, de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) (Facklam y Washington, 1991; Hardie y Whiley, 1997).

Los enterococos están frecuentemente asociados con bacteriuria, endocarditis y otros procesos patológicos del hombre y los animales (Murray, 1990; Facklam y Washington, 1991; Knudtson y Hartman, 1992; Morrison *et al.*, 1997; Etheridge *et al.*, 1988). La mayoría de los aislamientos clínicos de enterococos corresponden a *E. faecalis* (80-90%) y *E. faecium* (5-10%), por el contrario *E. malodoratus* y *E. pseudoavium* no han sido aislados de infecciones humanas, aunque el resto de las especies adscritas a este género se han aislado de muestras clínicas humanas con mayor o menor frecuencia (Facklam y Washington, 1991; Morrison *et al.*, 1997).

Por otro lado, dado que su hábitat natural, entre otros, es el tracto intestinal de los animales homeotermos y de los insectos, se les ha considerado indicadores de contaminación fecal en agua y alimentos. Sin embargo, debido a su capacidad de crecer en ambientes extraentéricos, no siempre sus recuentos pueden utilizarse como indicadores de contaminación fecal, aunque los recuentos en conjunción con la identificación de sus especies pueden informar de las fuentes de contaminación y ayudar a definir los puntos críticos de control (Knudtson y Hartman, 1993).

Los enterococos se consideran microorganismos no deseables en los embutidos fermentados crudos-curados por ser responsables de decoloraciones debidas a la formación o síntesis de peróxidos (Liepe, 1983; Whiteley y D'Souza, 1989), pudiendo

también indicar deficiencias higiénicas y sanitarias en el proceso de elaboración y maduración del embutido cuando se encuentran en un número alto (Solís *et al.*, 1984).

Existe otra razón para considerar negativa su presencia en alimentos fermentados, y es que *E. faecalis* biovar *liquefaciens* (variedad proteolítica de *E. faecalis*) puede inactivar la termonucleasa producida por *Staphylococcus aureus* (Lachica *et al.*, 1972; Medwid y Grant, 1980). La presencia de este enzima se utiliza en los alimentos fermentados como indicador de crecimiento importante de *S. aureus* y potencial producción de enterotoxinas estafilocócicas. Esta posibilidad en los embutidos fermentados crudos curados españoles tipo chorizo o salchichón no es muy elevada, ya que las combinaciones de tiempo y temperatura utilizadas durante el proceso de elaboración y maduración de los mismos son relativamente desfavorables para *S. aureus*; sin embargo, sí puede tener una gran importancia en los embutidos tipo "americano" donde las condiciones en la fase de estufaje son realmente críticas (Bacus, 1986; Lücke, 1986).

A este grupo de microorganismos también se le ha asociado con la producción de aminas biógenas y nitrosaminas, compuestos N-nitroso (fórmula general N-N=O) derivados de aminas secundarias, bastante estables en las condiciones presentes en los alimentos. También pueden encontrarse en el organismo humano formándose a partir de nitrosaminas sustituidas que, siendo relativamente resistentes al cocinado, originan compuestos N-nitroso *in vivo* (Mirvish *et al.*, 1980). En alimentos fermentados se han aislado estos compuestos y se han relacionado con los enterococos (Joosten y Stadhouders, 1987; Tham, 1988), si bien es cierto que otros grupos microbianos también presentes en los embutidos crudos-curados, como son las bacterias acidolácticas y las enterobacterias, tienen la capacidad de producir este tipo de compuestos (Eitenmiller *et al.*, 1981; Stratton *et al.*, 1991).

La bibliografía relativa a la presencia de estos microorganismos en productos cárnicos no es muy abundante (Dierick *et al.*, 1974; Wortberg y Woller, 1982; Ramantanis *et al.*, 1985; Tiecco *et al.*, 1985; Santos *et al.*, 1986; Askar y Trepton, 1989; Buncic y Smiljanic, 1990) y aún es más restringida en cuanto a la relación existente entre el aislamiento de enterococos y la presencia de aminas biógenas (Askar y Trepton, 1989; Buncic y Smiljanic, 1990; García *et al.*, 1991).

En cuanto a los posibles efectos beneficiosos de este grupo microbiano, algunas de sus especies tienen una reconocida actividad tecnológica en la obtención de productos cárnicos y lácteos fermentados (Marth, 1963; Ordóñez, 1974; Battistotti *et al.*, 1977; Ingram y Simonsen, 1980; Holley, 1988a y 1988b; Parente, 1989; Alonso, 1991; Encinas, 1993; López-Díaz, 1993) y en la producción de ensilados (Lindgren *et al.*, 1985) o de aditivos para alimentación animal (Pollman *et al.*, 1980; Fuller, 1989). Además, ciertas especies presentan actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos (Sulzer y Busse, 1991; Lewus *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1994; Giraffa, 1995), siendo importante señalar la existencia de cepas de *E. faecium* con capacidad de inhibición frente a *Listeria* en general y frente a *L. monocytogenes* en particular, por la producción de enterocinas 1146 (McKay, 1990; Parente y Hill, 1992a, 1992b) ó B, P, L50A y L50B (Cintas *et al.*, 1995) con un amplio espectro antimicrobiano.

Los objetivos del capítulo han sido: 1) estudiar la evolución cuantitativa y cualitativa de los enterococos en el chorizo de Cantimpalos, 2) evaluar su potencial capacidad tecnológica, y 3) estudiar su posible participación en el control de microorganismos patógenos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MUESTRAS Y RECUENTOS**

Se estudiaron dos fabricaciones en cada una de las industrias A y B. Se tomaron muestras los días 1, 2, 9 y 16 en la industria A, y 1, 3, 6, 15 y 21 en la industria B. Los recuentos se llevaron a cabo en agar Kanamicina Azida Sódica Esculina (KAE, Unipath), por siembra en profundidad e incubando las placas a 37°C durante 24 horas.

### **CEPAS**

Se seleccionaron al azar (Harrigan y McCance, 1976) 190 cepas: 30 aisladas del producto listo para el consumo (capítulo 2) y 160 correspondientes al seguimiento del proceso de elaboración y maduración del chorizo de Cantimpalos en las industrias y lotes estudiados. Las cepas seleccionadas se purificaron por pases alternativos en caldo BHI (Unipath) y placas de KAE (Unipath). Una vez purificadas, se mantuvieron en viales de agar Triptona

Soja (TSA, Unipath) inclinado en condiciones de refrigeración hasta su posterior caracterización.

### CARACTERIZACIÓN

Las cepas se sometieron a las siguientes pruebas con el objeto de conseguir su caracterización: tinción de Gram, catalasa, producción de pigmento (crecimiento en placas de TSA-Unipath- suplementadas con extracto de levadura (1% p/v) e incubándose a 37°C, 48 horas), crecimiento en anaerobiosis (en medio O/F -Difco- y en medio MRS -Unipath- adicionado de azul de bromotimol como indicador -0,08g/l-), producción de CO<sub>2</sub> de glucosa, hidrólisis de la esculina y crecimiento en presencia de 40% (p/v) de bilis, hidrólisis de la L-arginina, hemólisis en agar sangre de oveja, hidrólisis de la gelatina, movilidad, crecimiento en presencia de 4 y 6,5% de NaCl, crecimiento a 10, 45 y 50°C, oxidación/fermentación del glicerol, descarboxilación de fenilalanina, histidina, lisina, ornitina, tirosina y triptófano, así como producción de ácido a partir de hidratos de carbono: L-arabinosa, inulina, lactosa, maltosa, manitol, melecitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, sorbitol, sorbosa, sacarosa, salicina, trealosa y D-xilosa (siembra en placas de microtítulo con multiinoculador Dynatech, Jane-Williams, 1976).

### IDENTIFICACIÓN

La identificación de las cepas se llevó a cabo siguiendo los esquemas propuestos por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), Facklam *et al.* (1991), Devriese *et al.* (1992), Pompei *et al.* (1992) y Morrison *et al.* (1997).

### CAPACIDAD ANTIMICROBIANA (ANTI-*Listeria*) DE CEPAS DE *E. faecium*

Doce cepas no hemolíticas de *E. faecium* se ensayaron frente a 25 cepas de *Listeria* de diversos orígenes (Tabla 9). Asimismo, se investigaron las posibles relaciones antagónicas entre las cepas de *E. faecium* que mostraban actividad anti-*Listeria* y ocho cepas de bacterias acidolácticas aisladas por nosotros y que mostraban capacidad para inhibir a ciertas bacterias patógenas (capítulo 2).

La metodología utilizada fue similar a la descrita por Parente y Hill (1992a y 1992b) y por Arihara *et al.* (1993) y se resume a continuación. Tres medios líquidos diferentes (BHI, M-17 y *Skim Milk* al 10% (p/v) -Unipath-) se inocularon con *ca.* 10<sup>5</sup>

ufc/ml de cada una de las cepas de *E. faecium*, incubándose a 37°C durante 24h. En los estudios preliminares de inhibición, cada 5 horas se tomaron muestras de los cultivos de *E. faecium*, determinándose su número (método de siembra en espiral) y su actividad anti-*Listeria*. Esta última se investigó utilizando el método descrito por Fleming *et al.* (1975), denominado generalmente como *agar spot test* (Schillinger y Lücke, 1989).

Como las 12 cepas ensayadas mostraron halos de inhibición en dichos ensayos preliminares, todas se inocularon en caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Unipath) y se incubaron a 37°C durante 24h. Los cultivos se centrifugaron (10.000 rpm, 10 min., 4°C), ajustándose el pH de los sobrenadantes a  $6,8 \pm 0,1$  con NaOH 1N. Los sobrenadantes neutralizados se esterilizaron por filtración (filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro) y se volvió a investigar su actividad listericida empleándose el método de difusión en agar (pocillos) propuesto por Muriana y Luchansky (1993). En estas condiciones, sólo dos de las 12 cepas de *E. faecium* siguieron mostrando actividad inhibidora.

Los sobrenadantes de estas dos cepas se sometieron a un tratamiento de purificación parcial mediante precipitación con sulfato amónico al 80% (4°C, 2 horas). El precipitado obtenido se resuspendió en tampón fosfato estéril y se mantuvo congelado (-20°C) para ensayos posteriores.

A los precipitados resuspendidos se añadieron diversos enzimas (tripsina, B-quimotripsina, proteinasa  $\kappa$ , pronasa E, ribonucleasa A y catalasa, todos de la firma Sigma), determinándose su actividad listericida por el método de difusión a partir de pocillos en el agar (Parente y Hill, 1992a, 1992b; Arihara *et al.*, 1993; Muriana y Luchansky, 1993). Asimismo, se investigó su estabilidad durante la congelación (-20 y -32°C) y sus actividades hemolítica (agar sangre suplementado con sangre desfibrinada de cordero (5%), Unipath), lecitinasa (agar yema de huevo, Harrigan y McCance, 1976), DNasa (agar DNasa, Unipath) y caseinolítica (agar nutritivo suplementado con *Skim Milk* al 10%, Unipath, Harrigan y McCance, 1976) mediante técnicas de difusión en agar.

Finalmente, se evaluó la posible acción inhibidora frente a *Listeria* de las enzimas utilizadas y del sulfato amónico. Para ello, se inocularon dos diluciones de cada cepa de *Listeria* ( $10^5$  y  $10^6$  ufc/ml) en el medio GMP-PLUS (bioMeriéux). A cada mililitro de medio, se añadieron 0,2 ml del inóculo y 0,1 ml de la solución del enzima o de sulfato amónico a una concentración adecuada para que en el volumen final, ésta fuera idéntica a

la utilizada en los ensayos previos. El efecto se evaluó en función de los tiempos de detección (DT), siendo el equipo utilizado un Bactometer modelo 64 (Biomerioux).

## **RESULTADOS**

En las Tablas 1 y 2 se recogen los valores correspondientes a los recuentos de enterococos a lo largo del proceso de elaboración y maduración-secado del chorizo de Cantimpalos en las industrias y lotes estudiados y en la Tabla 3 las especies de *Enterococcus* presentes en el producto final listo para el consumo.

En la Tabla 4 se presenta la adscripción a especies de las 106 cepas de enterococos obtenidas durante el proceso de elaboración y maduración de los lotes analizados, observándose como la especie mayoritaria era *E. casseliflavus* (36,79%), seguida en importancia numérica por *E. faecium* (16,03%) y *E. mundtii* (14,15%). Otras especies aisladas fueron *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *E. raffinosus*, *E. hirae* y cepas que compartían propiedades de especies descritas. En la Tabla 5 se muestra la evolución de las especies de *Enterococcus* en las industrias y lotes considerados.

En la Tabla 6 se relacionan las principales aminos biógenas presentes en alimentos fermentados y los niveles habitualmente detectados (Brink *et al.*, 1990 y Stratton *et al.*, 1991), mientras que en la Tabla 7 se presenta la actividad descarboxilasa de las cepas de *Enterococcus* aisladas durante las fabricaciones estudiadas y en la Tabla 8 la actividad descarboxilasa de cepas aisladas de producto final listo para el consumo, destacando la actividad descarboxilasa frente a los aminoácidos tirosina (95% de las cepas), fenilalanina e histidina (30 y 20%, respectivamente).

En la Tabla 9 se recoge la identificación y el origen de las cepas de *Listeria* y bacterias acidolácticas utilizadas para investigar la actividad antimicrobiana de las cepas de *E. faecium* y, finalmente, en la Tabla 10 los resultados de estos estudios de inhibición.

## **DISCUSIÓN**

De los resultados obtenidos se deduce que los niveles de *Enterococcus* en el chorizo de Cantimpalos se mantienen prácticamente constantes a lo largo de todo el

proceso de elaboración y maduración-secado. En la industria A (Tabla 1) la población media inicial fue de 3,65 log<sub>10</sub> ufc/g, con recuentos en el producto final listo para el consumo (16 días de maduración) de 4,34 log<sub>10</sub> ufc/g en el lote I y 4,36 log<sub>10</sub> ufc/g en el lote II.

En la industria B (Tabla 2) los valores iniciales medios fueron de 3,31 log<sub>10</sub> ufc/g, siendo los recuentos a los 15 días de 3,46 log<sub>10</sub> ufc/g en el lote I y 2,19 log<sub>10</sub> ufc/g en el lote II (tiempo correspondiente a la mitad del período de maduración-secado y coincidiendo con el final del proceso de maduración-secado para la industria A). En la industria B, a los 21 días de maduración la población de enterococos fue de 2,97 y 3,30 log<sub>10</sub> ufc/g para los lotes I y II, respectivamente. Estos datos son similares a los obtenidos por otros autores para determinados embutidos fermentados crudos-curados, si bien es preciso señalar que en la mayoría de los casos aparecen reflejados los recuentos como “de *Streptococcus*” (denominación que incluye a los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*). Refiriéndonos a embutidos españoles, Martínez-Solís *et al.* (1982) obtuvieron recuentos entre 2 y 4 log<sub>10</sub> ufc/g durante el proceso de maduración-secado de chorizos y de 2 log<sub>10</sub> ufc/g en el producto final listo para el consumo, mientras que en la longaniza de Aragón encontraron entre 3,29 y 3,87 log<sub>10</sub> ufc/g. En la sobrasada Mallorquina, señala Ubach *et al.*, (1988) recuentos de 2,73-4,38 log<sub>10</sub> ufc/g. Es interesante destacar cómo en estudios realizados sobre preparados comerciales utilizados como cultivos iniciadores (Coretti, 1977; Gerick y Gossling, 1981; Holley, 1988a, 1988b; Lücke, 1988) se han aislado estreptococos (enterococos) en tasas inferiores a 2 log<sub>10</sub> ufc/g.

**TABLA 1.** Evolución de los recuentos de enterococos y de los valores de pH y a<sub>w</sub> durante la fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos (industria A)

		Día de muestreo			
Parámetro		1	2	9	16
Lote I	Población	3,62 <sup>a</sup> (9/10) <sup>b</sup>	4,30 (6/6)	4,25 (7/10)	4,34 (5/10)
	pH	5,61	5,55	5,19	5,00
	a <sub>w</sub>	0,959	0,955	0,893	0,880
Lote II	Población	3,67 (8/10)	2,60	4,63 (9/10)	4,36 (8/10)
	pH	6,11	6,10	5,52	4,90
	a <sub>w</sub>	0,945	0,960	0,872	0,830

<sup>a</sup>, log<sub>10</sub> ufc/g; <sup>b</sup>, numerador, n° de cepas confirmadas como *Enterococcus*; denominador, n° de cepas seleccionadas al azar

De las 190 cepas aisladas del medio KAE, se adscribieron al género *Enterococcus* 126 (20 de producto final y 106 obtenidas durante las fabricaciones) mientras que las otras 64 (el 33,68%) no se consideraron enterococos. Las 126 cepas adscritas a este género se caracterizaron por crecer a 10 y 45°C y tolerar 4 y 6,5% NaCl, multiplicarse en medios con un 40% de bilis e hidrolizar la esculina. De las 126 cepas indicadas, 20 correspondían al producto final listo para el consumo (capítulo 2) y destacaban por su uniformidad fenotípica: móviles, no pigmentadas, incapaces de hidrolizar la gelatina y con capacidad de fermentación de gran número de azúcares (L-arabinosa, lactosa, maltosa, manitol, melecitosa, melibiosa, rafinosa, sorbitol, sacarosa, salicina, trealosa y D-xilosa), identificándose mayoritariamente como *E. gallinarum*, *E. mundtii* y otros (Tabla 3).

**TABLA 2.** Evolución de los recuentos de enterococos y de los valores de pH y a<sub>w</sub> durante la fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos (industria B)

	Parámetro	Día de muestreo				
		1	3	6	15	21
Lote I	Población	3,23 (7/10) <sup>b</sup>	2,90 (9/10)	3,64 (5/10)	3,46 (2/4)	3,30 (1/10)
	pH	5,83 <sup>a</sup>	6,01	6,18	5,11	5,00
	a <sub>w</sub>	0,957	0,952	0,919	0,901	0,893
Lote II	Población	3,39 (5/10)	2,88 (5/10)	2,30 (6/10)	2,19 (8/10)	2,98 (6/10)
	pH	6,10	6,20	5,70	5,01	4,91
	a <sub>w</sub>	0,961	0,975	0,921	0,914	0,901

<sup>a</sup>, log<sub>10</sub> ufc/g; <sup>b</sup>, numerador, n° de cepas confirmadas como *Enterococcus*; denominador, n° de cepas seleccionadas al azar

Esta adscripción definitiva refleja una clara diferencia con las especies aisladas durante el seguimiento del proceso (Tabla 4) ya que esta población es mucho más heterogénea, siendo la especie dominante *E. casseliflavus* (39 cepas). Otras especies aisladas fueron *E. faecium* (17 cepas), *E. mundtii* (15 cepas), *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *E.*

*hirae* y *E. raffinosus*. Un total de 22 cepas presentaron patrones bioquímicos intermedios entre las especies señaladas.

Estos datos difieren de los hallados por Knudson y Hartman (1993) en relación con los aislamientos en carne de cerdo, donde la especie dominante era *E. faecalis* con un 79% seguida de *E. faecium* con un 11%. *E. faecium* es común en cerdo y *E. faecalis* se aísla frecuentemente de muestras humanas. Parece, pues, que en los embutidos estudiados por nosotros, las principales fuentes de contaminación inicial no serían éstas.

**TABLA 3.** Especies de *Enterococcus* presentes en chorizo de Cantimpalos listo para el consumo

Especie	Nº de cepas	%
<i>E. gallinarum</i>	13	65
<i>Enterococcus</i> no hemolíticos, móviles, no pigmentados	6	30
<i>E. mundtii</i>	1	5

**TABLA 4.** Especies a las que se adscribieron las cepas de *Enterococcus* aisladas del chorizo de Cantimpalos (industrias A y B) durante el proceso de elaboración-maduración

Especie	Industria A		Industria B		Ambas industrias	
	nº cepas	%	nº cepas	%	nº cepas	%
<i>E. casseliflavus</i>	17	32,69	22	40,74	39	36,79
<i>E. mundtii</i>	9	17,30	6	11,11	15	14,15
<i>E. gallinarum</i>	2	3,84	2	3,70	4	3,77
<i>E. faecium</i>	7	13,46	10	18,51	17	16,03
<i>E. faecalis</i>	1	1,92	5	9,25	6	5,66
<i>E. raffinosus</i>			1	1,85	1	0,94
<i>E. hirae</i>			2	3,70	2	1,88
<i>E. raffinosus-faecium</i>	9	17,30	5	9,25	14	13,20
<i>E. faecium-faecalis</i>	7	13,46			7	6,60
<i>E. hirae-faecium</i>			1	1,85	1	0,94
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>49,05</b>	<b>54</b>	<b>50,94</b>	<b>106</b>	<b>100</b>

Entre las dos industrias estudiadas también se observan diferencias. En la industria A las especies aisladas en el producto final eran muy variadas, mientras que en la industria B se aislaron sólo tres especies. Las diferencias se aprecian también entre los lotes de la misma industria. Así en el lote I de la industria A, *E. casseliflavus* es la especie

mayoritaria en la masa y después de la fase de estufaje (1 y 2 días) pero en los muestreos posteriores se suceden especies con patrones bioquímicos intermedios (*E. raffinosus-faecium-faecalis*) (Tabla 5).

En el lote II de la misma industria dos especies (*E. gallinarum* y *E. mundtii*) se aislan en el muestreo inicial, pero a los 16 días, la especie dominante es *E. faecium*. En la industria B, lote I, *E. casseliflavus* está presente de forma mayoritaria a lo largo de todo el proceso de fabricación (Tabla 5); sin embargo, en el lote II esta especie sólo aparece en la masa y conforme avanza el proceso de fermentación-maduración se instaura, como población dominante, *E. faecium*.

**TABLA 5.** Evolución de las especies de *Enterococcus* según el día de muestreo, la industria y el lote

		<b>Industria A</b>				
		<b>Día de muestreo</b>				
<b>Especie</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	
<b>Lote I</b>	<i>E. casseliflavus</i>	8	3			
	<i>E. mundtii</i>	1	2		1	
	<i>E. gallinarum</i>		1			
	<i>E. faecalis</i>				1	
	<i>E. raffinosus-faecium</i>			4	2	
	<i>E. faecium-faecalis</i>			3	1	
<b>Lote II</b>	<i>E. casseliflavus</i>	6				
	<i>E. mundtii</i>	2		2	1	
	<i>E. gallinarum</i>				1	
	<i>E. faecium</i>			2	5	
	<i>E. faecium-faecalis</i>			3		
	<i>E. raffinosus-faecium</i>			2	1	
		<b>Industria B</b>				
		<b>Día de muestreo</b>				
<b>Especie</b>		<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>21</b>
<b>Lote I</b>	<i>E. casseliflavus</i>	7	7	4	1	1
	<i>E. mundtii</i>		1		1	
	<i>E. gallinarum</i>			1		
	<i>E. faecium</i>		1			
<b>Lote II</b>	<i>E. casseliflavus</i>	2				
	<i>E. mundtii</i>	1		2	1	
	<i>E. gallinarum</i>	1				
	<i>E. faecium</i>			2	2	5
	<i>E. faecalis</i>			1	4	
	<i>E. hiraе</i>		1			1
	<i>E. hiraе-faecium</i>	1				
	<i>E. raffinosus</i>		1			
	<i>E. raffinosus-faecium</i>		3	1	1	

De lo anteriormente expuesto, parece posible concluir que aunque *E. casseliflavus* era la especie dominante en la masa, durante el proceso de fabricación tiende a desaparecer, siendo sustituida en unos casos por especies diversas y en otros por *E. faecium*. La presencia de esta última en el chorizo no es sorprendente dado su hábitat original, pero tanto *E. casseliflavus* como *E. mundtii* -también aislada por nosotros- se detectan raramente en mamíferos, estando asociadas principalmente con productos vegetales (Devriese *et al.*, 1992). *E. faecalis* -relacionada generalmente con el hombre- se halló en fases avanzadas de la fabricación del lote II de la industria B. Como ya se ha señalado en capítulos precedentes, tanto las prácticas como el sistema de elaboración del chorizo en la industria A eran más eficaces para garantizar la calidad higiénico-sanitaria del producto final.

**TABLA 6.** Aminas biógenas presentes en alimentos fermentados

<b>Amina</b>	<b>Aminoácido precursor</b>	<b>Niveles hallados</b>
Feniletilamina	fenilalanina	ND <sup>a</sup> -6,0 <sup>b</sup>
Histamina	histidina	trazas-55,5
Cadaverina	lisina	trazas-5,6
Putrescina	ornitina	3,1-39,6
Tiramina	tirosina	10,2-150,6
Triptamina	triptófano	40-130

<sup>a</sup>, No detectado, <sup>b</sup>, mg/kg. Fuente: ten Brink *et al.*, 1990; Stratton *et al.*, 1991

Otro aspecto que debe mencionarse es la dificultad que presentaba la identificación a nivel de especie en parte de la población estudiada. Esto se refleja tanto en el porcentaje (20,74%) de cepas que poseían propiedades intermedias entre dos especies como en la desviación de los patrones característicos que mostraban algunas de las cepas identificadas. En nuestra experiencia, no es infrecuente que los enterococos aislados de alimentos fermentados posean propiedades fenotípicas que no se ajusten totalmente a las de especies descritas o propuestas (Encinas, 1993; Román, 1997).

Como ya se ha señalado, los enterococos se han asociado con la presencia y formación de aminas biógenas en alimentos fermentados (ten Brink *et al.*, 1990; Stratton *et al.*, 1991, Tabla 6). Para estimar el poder potencial de formación de estos compuestos por parte de las cepas aisladas se procedió a comprobar la capacidad de descarboxilación de los aminoácidos fenilalanina, histidina, lisina, ornitina, tirosina y triptófano, como precursores de las aminas detectadas por otros autores en embutidos fermentados. Los enterococos aislados en nuestro estudio se caracterizaron por presentar una mayor actividad descarboxilasa frente a los aminoácidos tirosina, para las cepas de ambas industrias, y fenilalanina y lisina para las de la industria B (Tabla 7).

**TABLA 7.** Actividad descarboxilasa de las cepas de *Enterococcus* aisladas del chorizo de Cantimpalos

Especie	Aminoácido precursor											
	FEN		HIS		LIS		ORN		TIR		TRIP	
	A <sup>b</sup>	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>E. casseliflavus</i>		2 <sup>c</sup>			1	3	1	1	12	13		
<i>E. mundtii</i>		2				2		1	4	6		1
<i>E. gallinarum</i>									2	2		
<i>E. faecium</i>		2		2		4		2	5	10		1
<i>E. faecalis</i>		2		1		1	1		1	4		
<i>E. raffinosus</i>												
<i>E. hirae</i>		1								3		1
<i>E. raffinosus-faecium</i>	1				1	1	2	1	3	5	1	
<i>E. faecium-faecalis</i>	2				2		3		6		2	
<i>E. hirae-faecalis</i>										1		
Total	3	9		3	4	11	7	5	33	43	3	3
% cepas s. ind. <sup>d</sup>	5,8	16,7		5,6	7,7	20,4	13,5	9,3	63,5	79,6	5,8	5,6
% cepas s. total <sup>e</sup>	2,8	8,5		2,8	3,8	10,4	6,6	4,7	31,1	40,6	2,8	2,8

<sup>a</sup>, ORN, L-ornitina; LIS, L-lisina; HIS, L-histidina; TIR, L-tirosina; FEN, L-fenilalanina; TRIP, L-triptófano; <sup>b</sup>, industria; <sup>c</sup>, núm. de cepas con actividad descarboxilasa; <sup>d</sup>, % de cepas con actividad descarboxilasa sobre el global de la industria; <sup>e</sup>, % de cepas con actividad descarboxilasa sobre el total de la población

Si consideramos las especies independientemente, *E. faecium* y *E. faecalis* fueron las más eficaces, ya que presentaron esta actividad para cinco/seis de los aminoácidos estudiados, *E. casseliflavus* descarboxiló a la tirosina y lisina además de la ornitina, *E. mundtii* sólo manifestó actividad frente a los aminoácidos estudiados (excepto tirosina) cuando procedía de la industria B, *E. hirae* sólo descarboxiló tirosina, fenilalanina y triptófano, y *E. raffinosus* no descarboxiló ningún aminoácido. A la luz de estos datos cabe sugerir que la amina biógena con más posibilidades de formarse en el chorizo de Cantimpalos sería la tiramina y en menor medida feniletilamina y triptamina.

El posible papel beneficioso de los enterococos en la obtención de embutidos fermentados se ha asociado, entre otros factores, con el desarrollo del aroma, siendo importantes en este sentido los compuestos resultantes del metabolismo de los aminoácidos libres, que pueden hallarse en estos productos en cantidades relativamente elevadas debido a la actividad microbiana, a la acción de los propios enzimas tisulares y al aporte procedente de ciertos ingredientes (Domínguez *et al.*, 1989; Dainty y Blom, 1995). En nuestro caso, únicamente 14 cepas (11%) mostraron actividad proteolítica (hidrólisis de la gelatina) aunque un número mucho mayor fue capaz de descarboxilar diferentes aminoácidos (Tablas 7 y 8). La influencia de los compuestos derivados de la descarboxilación de los aminoácidos en las propiedades organolépticas de los embutidos fermentados ha sido revisada por Montel *et al.* (1998).

**TABLA 8.** Actividad descarboxilasa de enterococos aislados de producto listo para el consumo

Especie	Aminoácido precursor					
	FEN	HIS	LIS	ORN	TIR	TRP
<i>E. gallinarum</i>	4	2	1	1	12	1
<i>E. mundtii</i>		1			1	
Otros	2	1	2	1	6	1
<b>%</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>95</b>	<b>30</b>	<b>10</b>

FEN, L-fenilalanina; HIS, L-histidina, LIS, L-lisina; ORN, L-ornitina; TIR, L-tirosina; TRIP, L-triptófano

Varios autores han aislado *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* de embutidos fermentados (Glass y Doyle, 1989; Farber, 1991; Encinas *et al.*, 1999). Sin embargo, en este trabajo, no se detectaron en las muestras correspondientes al producto final

(capítulo 2) ni en las obtenidas durante el proceso de elaboración y maduración-secado. Esto puede deberse a diferentes factores como la adición de ácidos orgánicos o sus sales, las condiciones disgenésicas del propio producto y/o la presencia de sustancias antimicrobianas elaboradas por otros microorganismos. En relación con estas últimas, se ha demostrado la producción de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria* por parte de cepas de *E. faecium* aisladas de productos cárnicos, habiéndose caracterizado algunas como las enterocinas A, B, P, L50A, L50B y 1146 (Mckay, 1990; Parente y Hill, 1992a; Giraffa, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Hugas, 1998). Esto nos sugirió que sería interesante investigar este carácter entre las cepas de *E. faecium* aisladas.

**TABLA 9.** Identificación y origen de las cepas de *Listeria* y bacterias acidolácticas utilizadas en los estudios de inhibición de las cepas de *E. faecium* B2-78 y B7-122

<i>Listeria</i>					
Cepa	Origen	Nom <sup>a</sup> .	Cepa	Origen	Nom.
<i>L. innocua</i>	ensilado	A	<i>L. monocytogenes</i> cnh4	cerebro	B
<i>L. monocytogenes</i> ch3	oveja	C	<i>L. monocytogenes</i> cnh1	cerebro	D
<i>L. innocua</i> ens 9	ensilado	E	<i>L. innocua</i> ens 10	ensilado	F
<i>L. innocua</i> ens 2	ensilado	G	<i>L. monocytogenes</i> m 31	médula	H
<i>L. monocytogenes</i> m 25	médula	I	<i>L. monocytogenes</i> m 35	médula	J
<i>L. innocua</i> 83 OVL1	oveja	K	<i>Listeria</i> 83°FM2	oveja	L
<i>Listeria</i> 85FP H1	oveja	M	<i>Listeria</i> 85 OF H4	oveja	N
<i>Listeria</i> 84 PL V2	oveja	Ñ	<i>Listeria</i> 84 OV H1	oveja	O
<i>Listeria</i> 84 OF L5	oveja	P	<i>L. monocytogenes</i> 939	CECT	Q
<i>L. grayi</i> 981	CECT	R	<i>L. ivanovii</i> 751	CECT	S
<i>L. murrayi</i> 924	CECT	T	<i>L. welshimeri</i> B	CECT	U
<i>L. seeligeri</i> 917	CECT	V	<i>L. innocua</i> 4030	CECT	W
<i>Listeria</i> 83OFM3	oveja	X			
<b>Bacterias acidolácticas</b>					
<i>L. curvatus</i> 15	chorizo		<i>L. curvatus</i> 12	chorizo	
<i>L. curvatus</i> 69	chorizo		<i>L. curvatus</i> 71	chorizo	
<i>L. curvatus</i> 93	chorizo		<i>L. curvatus</i> 72	chorizo	
<i>L. curvatus</i> 162	chorizo		<i>P. damnosus</i> 14	chorizo	

<sup>a</sup>, nomenclatura empleada para la identificación de las cepas en los ensayos así como en los resultados

En los ensayos iniciales (filtrados sin neutralizar y método *spot*), se comprobó que las 12 cepas seleccionadas poseían efecto inhibitorio frente a las cepas de *Listeria* (Tabla 9), pero cuando se procedió a neutralizar, y se utilizó la técnica de difusión en agar, sólo dos de ellas –denominadas B2-78 y B7-122- manifestaron actividad antimicrobiana.

Ambas cepas mostraban la máxima acción anti-*Listeria* en los extractos correspondientes a las 15 y 20 horas de incubación, obteniéndose los mayores halos de inhibición con los cultivos realizados en caldo BHI (Tabla 10). Esta última observación no coincide con los datos de Parente y Hill (1992a) que señalan como medio óptimo para su cepa, el M-17. Sin embargo, también McKay (1990) obtuvo resultados mejores con BHI. La influencia de los medios de cultivo en los resultados de las pruebas para detectar la producción de compuestos inhibidores similares a las bacteriocinas (BLIS) por parte de bacterias acidolácticas ha sido revisada por Hoover (1993). Este autor concluye que, entre otros factores, la presencia en el medio de determinados nutrientes puede afectar a la síntesis de estos compuestos.

**TABLA 10.** Resultado del estudio de la actividad inhibidora del sobrenadante neutralizado y filtrado de cultivos de las cepas B2-78 y B7-122 de *E. faecium* aisladas de chorizo de Cantimpalos (\*)

<i>Listeria</i>	<i>E. faecium</i>		<i>Listeria</i>	<i>E. faecium</i>		<i>Listeria</i>	<i>E. faecium</i>	
	78	122		78	122		78	122
A	15 <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>	J	13	14	R	15	14
B	12	+	K	17	14	S	17	19
C	12	10	L	16	13	T	14	+
D	13	+	M	20	23	U	17	+
E	15	14	N	17	13	V	15	11
F	13	+	Ñ	15	16	W	17	+
G	15	+	O	15	9	X	14	12
H	15	+	P	16	19			
I	15	20	Q	17	19			

(\*) Método de Muriana y Luchansky (1993), <sup>a</sup>, diámetro del halo de inhibición en mm, <sup>b</sup>+, el diámetro del halo de inhibición está comprendido entre 5 y 7 mm

La congelación y la adición de catalasa no afectaron a la actividad anti-*Listeria* de los sobrenadantes concentrados pero los enzimas proteolíticos la inhibieron completamente, poniendo de manifiesto la naturaleza proteica del o de los compuestos responsables de este efecto. La enterocina 1146 es resistente a la catalasa y al

tratamiento térmico pero sensible a un número considerable de enzimas proteolíticas (Parente y Hill, 1992a) y lo mismo se ha observado con otros compuestos BLIS (como Ef108 y enterocina 900) producidos por cepas de *E. faecium* de diversos orígenes (Dallas *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996). Los BLIS que producían dos cepas patrón de esta especie y otra de origen animal eran, asimismo, resistentes a la catalasa y sensibles a varias proteasas pero ni la pepsina ni la ribonucleasa A afectaban a su actividad (Arihara *et al.*, 1993). Hugas (1998) considera idénticas las enterocinas 1146 y A. Esta última, que ha sido bien caracterizada (Aymerich *et al.*, 1996), destaca por su capacidad listericida, habiéndose sugerido que puede pertenecer a la familia de las pediocinas.

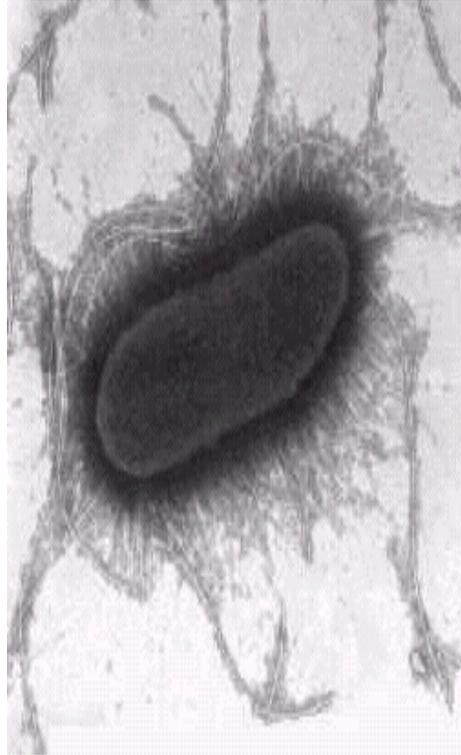
En nuestro estudio, como en el de Arihara *et al.* (1993), los filtrados no poseían actividad hemolítica y tampoco mostraron capacidad para hidrolizar substratos lipídicos o proteicos. Esto las diferencia de otros compuestos BLIS producidos por enterococos. Por lo que respecta al posible efecto inhibitorio de las enzimas ensayadas y del agente precipitante (sulfato amónico), se comprobó que su adición no influía en el crecimiento de las cepas ya que no modificaba de forma significativa sus tiempos de detección.

Un dato interesante con vistas a la posible selección de un cultivo iniciador es el hecho de que no existía antagonismo entre las cepas B2-78 y B7-122 y las bacterias acidolácticas incluidas en el estudio. Éstas, que se habían identificado como *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* y *Pediococcus damnosus*, se caracterizaban por inhibir también a *Listeria monocytogenes* así como a *Staphylococcus aureus* y *Aeromonas hydrophila* (capítulo 2). La enterocina 1146 tampoco afectaba a las bacterias acidolácticas de interés en alimentos fermentados (Parente y Hill, 1992a) pero otros compuestos BLIS producidos por cepas de *E. faecium* sí presentaban este carácter (Arihara *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1996).

Las ventajas y los inconvenientes de la utilización de enterococos productores de bacteriocinas y de las propias enterocinas en la obtención de productos lácteos y cárnicos fermentados han sido evaluados por diversos autores (Giraffa, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Hugas, 1998). En general, se considera que podrían tener efectos positivos en ciertos alimentos fermentados pero el riesgo que representan debe ser convenientemente evaluado y, por supuesto, las cepas seleccionadas han de garantizar la inocuidad del producto. La virulencia de estas bacterias se ha asociado con la producción de ciertos compuestos como citolisinas, habiéndose comprobado que la producción de bacteriocinas, que a menudo está asociada a bacteriófagos, puede incrementarla

(Morrison *et al.*, 1997). Otros aspectos a considerar son su capacidad para adquirir resistencia a los antibióticos y su papel en la producción de aminas vasoactivas. Debe recordarse, sin embargo, que algunas de estas propiedades no son generales sino que están presentes en cepas concretas. En productos lácteos, los miembros de este género pueden alcanzar niveles elevados, sin embargo, en embutidos -al menos en chorizo-, no se multiplican de forma significativa. Por otro lado, la producción de bacteriocinas y compuestos BLIS en condiciones experimentales no implica que esto suceda también en los alimentos ni que, en caso de producirse, éstas sean eficaces para controlar determinados microorganismos patógenos.





## **CAPÍTULO 7.**

*ENTEROBACTERIACEAE,  
SALMONELLA Y YERSINIA*



## **INTRODUCCIÓN**

La carne es un substrato excelente para la multiplicación de gran número de bacterias. Su almacenamiento a bajas temperaturas selecciona la flora aerobia psicrotrofa, Gram-negativa, y así al avanzar la vida útil el género dominante es *Pseudomonas* acompañado por *Moraxella*, *Psychrobacter* (antes “*Moraxella-like*”), *Acinetobacter*, etc. Sin embargo, ciertas especies de enterobacterias psicrotrofas, contaminantes habituales de la canal, pueden multiplicarse en el tejido adiposo y en la carne de pH alto. En cerdo y también en ovino, temperaturas de 4°C y superiores favorecen a estos microorganismos (García-López *et al.*, 1998).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentes en la carne son ubicuos en el matadero (Nortjé *et al.*, 1990; Gustavsson y Borch, 1993). Además, como muchos de los géneros de interés tienen su hábitat en el intestino de los animales de abasto, ciertas operaciones del sacrificio, faenado y despiece favorecen su diseminación, especialmente en el ganado porcino (Troerger y Woltersdorf, 1989). Es evidente, por tanto, que las enterobacterias van a estar presentes en la masa utilizada para la fabricación de embutidos, siendo su principal origen los tejidos animales puesto que su incidencia en otros ingredientes es escasa (Pivnick, 1980).

Los factores que favorecen la multiplicación de estas bacterias durante la elaboración de embutidos fermentados son: valores altos de pH y  $a_w$  en las fases iniciales, niveles bajos de hidratos de carbono, bacterias acidolácticas y nitritos en la masa, utilización de nitratos y estufaje a temperaturas elevadas (Lücke, 1985).

Entre los 29 géneros (14 “tradicionales” y 15 “adicionales”) incluidos en la familia *Enterobacteriaceae* (Brenner, 1992), se encuentran no sólo agentes alterantes sino también patógenos reconocidos (*Salmonella*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* y ciertos grupos de *Escherichia coli*) y oportunistas como *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Kluyvera* y *Klebsiella* (Doyle, 1989). Asimismo está bien documentada la participación de ciertas enterobacterias en la formación de aminas biógenas (Stratton *et al.*, 1991). Finalmente, aunque los resultados obtenidos no son concluyentes, diversos autores han investigado el papel que desempeñan bacterias pertenecientes a esta familia como potenciadores del aroma en embutidos fermentados artesanales (Zeuthen, 1995).

Todo lo expuesto anteriormente justifica el estudio de la evolución cuantitativa y

cualitativa de las *Enterobacteriaceae* en el chorizo de Cantimpalos, así como la identificación de las cepas aisladas en el capítulo 2 y cuyas características hacían sospechar su pertenencia a los géneros *Salmonella* y *Yersinia*.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **EVOLUCIÓN DE *Enterobacteriaceae* DURANTE LA FABRICACIÓN Y MADURACIÓN**

**Embutidos.** Se seleccionaron dos industrias (A y B), siguiéndose, en cada una de ellas, dos fabricaciones. La toma de muestras se realizó en los días 1, 2, 9 y 16 (industria A) y en los días 1, 3, 6, 15 y 21 (industria B).

**Recuentos.** Se llevaron a cabo en placas de *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA, Unipath), incubándose a 37°C durante 24 horas (Mossel y Moreno, 1985). De placas correspondientes a cada día de muestreo, se tomaron al azar cinco colonias, que se purificaron mediante pases alternativos en caldo y agar Nutritivo (Unipath). Finalizado el proceso, 85 cepas se mantuvieron refrigeradas en viales de agar Triptona de Soja (TSA, Unipath) inclinado, resemebrándose cada dos meses.

### **CEPAS SOSPECHOSAS DE PERTENECER A LOS GÉNEROS *Salmonella* Y *Yersinia***

En este estudio se incluyeron, asimismo, 29 cepas sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* y 106 que mostraban características del género *Yersinia*. Todas ellas procedentes de placas de medios selectivos señalados en el capítulo 2 de esta Tesis.

### **CARACTERIZACIÓN DE *Enterobacteriaceae* Y *Salmonella***

**Tinción de Gram.** Se realizó empleando la modificación de Jensen (Cruickshank, 1965), anotándose reacción de Gram, morfología y agrupamiento.

**Características de crecimiento en caldo.** Se incubaron en caldo Triptona de Soja (TSB, Unipath) a 30°C durante 24 horas. Las características anotadas fueron turbidez, depósito en el fondo del tubo, formación de película y flóculos.

**Producción de catalasa.** Se determinó añadiendo unas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, v/v) a un cultivo joven en placa de agar Nutritivo (AN, Unipath) suplementado con glucosa (Unipath) al 1% (p/v) para evitar las falsas reacciones positivas asociadas a la producción de pseudocatalasa.

**Actividad oxidasa.** Se puso de manifiesto siguiendo la técnica descrita por Gaby y Hadley (Cowan, 1974).

**Prueba de oxidación/fermentación.** Se empleó el medio O/F de Hugh y Leifson (Difco) adicionado de glucosa (Unipath) al 1% (p/v), siguiéndose las recomendaciones de Ewing (1986).

**Movilidad.** Esta prueba se realizó en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de *GI Motility medium* (Difco). Las condiciones de incubación fueron 35°C durante siete días.

**ONPG test.** Se llevó a cabo utilizando los discos de Unipath y las recomendaciones del fabricante.

**Capacidad de reducción de nitratos a nitritos.** Para investigar este carácter se utilizó caldo Nitrato (Difco) y el método propuesto por Lanyi (1987).

**Reacción en agar TSI.** Volúmenes de 3 ml del medio agar *Triple Sugar Iron* (Unipath) se distribuyeron (pico de flauta) en tubos de hemólisis. Los tubos inoculados se incubaron a 35°C durante 48 horas. La lectura e interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo con Koneman *et al.* (1989).

**Reacción en el medio LIA.** Para la realización de esta prueba se empleó el medio agar *Lysine Iron* (Unipath). Tanto la distribución del medio, como las condiciones de incubación y la interpretación de los resultados fueron las descritas por Koneman *et al.* (1989).

**Producción de acetil-metilcarbinol (Prueba de Voges-Proskauer).** Volúmenes de 5 ml del medio MR-VP (Unipath) se distribuyeron en tubos de ensayo que, una vez inoculados, se incubaron a 35°C durante tres días. Para comprobar la presencia de acetil-metilcarbinol, se utilizó el reactivo de Kovacs -método de Barritt- (Cowan, 1974).

**Prueba del rojo de metilo.** También se investigó en el medio MR-VP (Unipath). A una alícuota del cultivo (24 horas a 30°C) se le añadieron unas gotas de la solución de rojo de metilo (0,04%, p/v), manifestándose la reacción positiva por la aparición de un anillo rojo (Koneman *et al.*, 1989).

**Producción de indol.** Se llevó a cabo en caldo conteniendo triptófano al 1% (p/v)

(Koneman *et al.*, 1989). Para detectar este compuesto, se utilizó el reactivo de Kovacs para el indol (Cowan, 1974).

**Utilización de citrato.** Se empleó agar Citrato de Simmons (Unipath) distribuido en tubos de hemólisis (volúmenes de 3 ml, en pico de flauta), siguiendo las recomendaciones de Koneman *et al.* (1989).

**Producción de ureasa.** Para la realización de esta prueba también se siguieron las indicaciones de Koneman *et al.* (1989). El medio de cultivo empleado fue agar Base para Urea de Christensen (Unipath) suplementado con una solución estéril de Urea al 40% (Difco).

**Reacciones en el medio SIM (Unipath).** Esta prueba se llevó a cabo con el fin de confirmar la movilidad de las cepas así como su capacidad para producir indol y H<sub>2</sub>S. Se siguieron las recomendaciones de Cowan (1974).

**Producción de ácido y gas de glucosa.** Ambos caracteres se determinaron en el Medio Base para Carbohidratos (Difco), distribuido en volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo conteniendo una campana de Durham y con glucosa al 1% (p/v). Las condiciones de incubación fueron 35°C durante 5 días.

**Desaminación de la fenilalanina.** Tanto el medio como los reactivos empleados fueron los recomendados por Koneman *et al.* (1989).

**Actividad descarboxilasa.** Esta propiedad se investigó en el Medio Base de Moeller para Descarboxilasa (Difco) al que se añadía un 1% (p/v) del aminoácido a estudiar (L-lisina, L-arginina, L-ornitina -Sigma-). A los tubos inoculados se les adicionó vaselina estéril (microaerofilia), incubándose hasta siete días a 35°C.

**Hidrólisis de la gelatina.** Se empleó Gelatina Nutritiva (Difco), siendo las condiciones de incubación 35°C durante 14 días.

**Producción de ácido a partir de hidratos de carbono.** Para determinar la capacidad de las cepas para producir ácido a partir de hidratos de carbono en aerobiosis se utilizó el Medio Base para Carbohidratos (Difco) al que se añadía el azúcar correspondiente a una concentración final del 1% (p/v). Los azúcares se esterilizaron por filtración (filtros Millipore de 0,22 µm de diámetro de poro). La siembra se realizó en placas de microtítulo siguiendo las indicaciones de Jayne-Williams (1976), utilizando un multiinoculador Dynatech provisto de un cabezal de 96 agujas. Las placas inoculadas se incubaron a 35°C durante cinco días, realizándose lecturas a las 18 y 24 horas y cada día

hasta el quinto. Los hidratos de carbono investigados fueron: adonitol, amigdalina, L-arabinosa, dulcitol, D(+)glucosa, *mio*-inositol, lactosa, D-manitol, D(+)manosa, D(+)melibiosa, D(+)rafinosa, L-ramnosa, sacarosa, salicina, D-sorbitol, L(-)sorbosa y D-xilosa (Ewing, 1986; Koneman *et al.*, 1989).

### IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de las cepas (género y especie) se emplearon los esquemas propuestos por diversos autores (Ewing; 1986; Koneman *et al.*, 1989; Brenner, 1992) así como un sistema informatizado (Prieto, 1990).

### CARACTERIZACIÓN DE *Yersinia*

Inicialmente, las 119 cepas sospechosas de pertenecer al género *Yersinia*, se sometieron a las pruebas recomendadas por Schieman (1982, 1989) tomando las precauciones necesarias para evitar la posible pérdida del plásmido asociado a la virulencia. El esquema de identificación propuesto por los autores señalados incluye: tinción de Gram, siembra en medio no selectivo, siembra en agar *Kliger Iron* (KIA, Unipath), producción de ureasa, utilización del citrato y fermentación de sacarosa, ramnosa, rafinosa, melibiosa y  $\alpha$ -metil-D-glucósido. Como ninguna de las cepas se pudo adscribir a *Yersinia*, la población se sometió a las pruebas adicionales siguientes: catalasa, oxidasa, oxidación/fermentación, Voges-Proskauer, rojo de metilo, reacciones en TSI y LIA, descarboxilación de aminoácidos (ornitina, lisina y arginina), desaminación de la fenilalanina, reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina, ONPG test, producción de H<sub>2</sub>S y producción de ácido a partir de amigdalina, D(+)glucosa, L-arabinosa, manitol y sorbitol.

Para la identificación de las cepas Gram-negativas, anaerobias facultativas, se utilizaron los sistemas citados anteriormente. Las cepas inmóviles y aerobias estrictas se adscribieron a género de acuerdo con el esquema de García-López *et al.* (1998)

## **RESULTADOS**

La Tabla 1 recoge la evolución cuantitativa de *Enterobacteriaceae* durante la fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos. Asimismo, se presenta el número de cepas seleccionadas que se confirmaron como miembros de esta familia.

En la Tabla 2 se da cuenta de los géneros y especies a los que pertenecían las cepas aisladas del medio VRBGA. La identificación de las cepas de presuntas salmonelas aisladas del medio EF-18 aparecen en la Tabla 3. Información similar pero referida a las cepas de posibles yersinias obtenidas de los medios CIN y MacConkey se da en la Tabla 4.

La actividad descarboxilasa de las cepas aisladas de VRBGA y pertenecientes a los géneros dominantes se presenta en la Tabla 5. Considerando el conjunto de la población estudiada, el 89% descarboxilaba la lisina y/o la ornitina aunque la mayoría (80,43%) mostraba actividad sobre ambos aminoácidos. Las cepas que carecían de esta propiedad pertenecían a las especies *Citrobacter amalonaticus* y *Pantoea agglomerans*.

## **DISCUSIÓN**

En general, se considera que las *Enterobacteriaceae* permanecen estables o sufren un ligero incremento (inferior a 1 unidad logarítmica/g) en las fases iniciales de obtención de los embutidos fermentados y que, posteriormente, tienden a disminuir lentamente (Lücke, 1985). En este estudio, se aprecia una notable diferencia en el comportamiento de este grupo bacteriano relacionado con el proceso de elaboración. Así, en las dos fabricaciones de la industria A, se observa un descenso, no muy acusado, durante los dos primeros días y más marcado en las fases siguientes, llegando a no detectarse en el producto final del lote I. En el lote II de la industria B, se aprecia un notable incremento (*ca.* 3 unidades logarítmicas/g) durante el periodo de reposo de la masa (3 días a 0-1°C), disminuyendo ligeramente en el tercer muestreo (3 días a 11°C) y más acusadamente en las fases siguientes, aunque el recuento a los 15 días fue aún superior al hallado en la masa inicial. El comportamiento en el Lote I de la industria B es difícil de explicar ya que en dos de los muestreos (días 6 y 21) ninguna de las cepas

seleccionadas se confirmaron como *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, si consideramos que a los 15 días se hallaron niveles de 3,25 log<sub>10</sub> ufc/g, es muy probable que a los 21 días también estuviesen presentes niveles detectables de estos microorganismos. En los embutidos elaborados en la industria A, se apreció un descenso continuado del pH durante todo el proceso de fabricación, mientras que en los lotes de la industria B aumentaba durante la fase de reposo e incluso a los 6 días (Tabla 1). En cuanto a la a<sub>w</sub>, en los dos Lotes I descendió durante todo el proceso pero en los Lotes II se detectó un incremento en el segundo muestreo (2 días en la industria A y 3 días en la B). Al final del proceso, el pH de los cuatro lotes fue muy semejante, oscilando entre 4,91 y 5, siendo los valores de a<sub>w</sub> más variables (entre 0,830 y 0,901) aunque siempre inferiores en la industria A. Tanto la evolución del pH como de la a<sub>w</sub> son factores determinantes en la inactivación de las enterobacterias, habiéndose demostrado, incluso matemáticamente, que las condiciones durante la fabricación y el control durante el secado influyen significativamente en ambos parámetros (Bello y Sánchez-Fuertes, 1995).

**TABLA 1.** Evolución de los recuentos de *Enterobacteriaceae* y de los valores de pH y a<sub>w</sub> durante la fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos en dos industrias diferentes

Industria A					Industria B				
Lote I									
Día <sup>a</sup>	pH	a <sub>w</sub>	Ent <sup>b</sup>	Conf. <sup>b</sup>	día	pH	a <sub>w</sub>	Ent.	Conf.
1	5,60	0,959	3,38	4 3,28	1	5,38	0,957	3,76	1 3,06
2	5,50	0,955	3,18	3 <sup>c</sup> 2,95	3	6,01	0,952	2,98	2 2,58
9	5,19	0,893	1,74	3 1,51	6	6,18	0,919	3,54	0 <0,69
16	5,00	0,880	<0,69		15	5,11	0,901	3,48	3 3,25
					21	5,00	0,893	5,45	0 <0,69
Lote II									
Día <sup>a</sup>	pH	a <sub>w</sub>	Ent <sup>b</sup>	Conf. <sup>b</sup>	día	pH	a <sub>w</sub>	Ent.	Conf.
1	6,11	0,945	3,47	3 3,24	1	6,10	0,961	2,65	1 1,95
2	6,10	0,960	3,43	3 3,20	3	6,20	0,975	4,81	5 4,81
9	5,52	0,872	2,17	4 2,07	6	5,70	0,921	4,54	4 4,40
16	4,99	0,830	1,60	3 1,37	15	5,01	0,914	3,09	4 2,99
					21	4,91	0,901	2,62	3 2,39

<sup>a</sup>, día de muestreo; <sup>b</sup>, Ent., recuento de presuntas *Enterobacteriaceae* (log<sub>10</sub> ufc/g), Conf., *Enterobacteriaceae* confirmadas (log<sub>10</sub> ufc/g); <sup>c</sup>, n° de cepas confirmadas como enterobacterias de 5 seleccionadas al azar

Salvo en lo referente a *Staphylococcus aureus*, no están claramente establecidos los valores de pH y  $a_w$  que garantizan la obtención de embutidos fermentados seguros. Ledward (1985) sugiere valores de  $a_w \leq 0,85$  y un pH inferior a 5, mientras que en Canadá (Anónimo, 1983) se proponen valores de 0,90 y 5,4, respectivamente. Aunque los embutidos fermentados de variedades semejantes a las estudiadas por nosotros no se implican frecuentemente en infecciones por bacterias patógenas de la familia *Enterobacteriaceae* (Lücke, 1985), se han descrito, ocasionalmente, brotes por *Salmonella* (D'Aoust y Evans, 1978; Taplin, 1982; Cowden *et al.*, 1989;) y por *Escherichia coli* O157:H7 (Alexander *et al.*, 1995). Por otra parte, la incidencia de *Salmonella* en chorizo y longaniza puede llegar a ser alta (entre el 20 y 72%), especialmente en Sudamérica (Kurk *et al.*, 1996), variando los porcentajes con el sistema de fabricación (industrial o artesanal). En España, Torregrosa *et al.* (1994) detectaron *Salmonella* en el 16,7% de las muestras (48) de chorizo fresco estudiadas. En nuestro caso, ninguna de las cepas seleccionadas como “presuntas” salmonelas (capítulo 2) pudieron adscribirse a este género, lo que sugiere que las condiciones de fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos son suficientemente eficaces para controlar a este microorganismo. Tampoco se pudo confirmar la presencia de *Yersinia* en los medios selectivos específicos y únicamente tres cepas (obtenidas del medio EF-18) se identificaron como *Yersinia aldovae*. Aunque *Y. enterocolitica* está frecuentemente presente en carne de cerdo, como en el caso anterior no parece que el chorizo de Cantimpalos suponga un riesgo en relación con esta bacteria. Una observación similar en otras variedades de chorizo y fuet ha sido realizada por Encinas (1993).

Los datos recogidos en la Tabla 2, ponen de manifiesto que las enterobacterias aisladas (medio VRBGA) con mayor frecuencia de chorizo de Cantimpalos pertenecían a los géneros *Enterobacter-Pantoea* y *Serratia* con una incidencia menor de *Hafnia* y *Citrobacter*. Todos estos géneros se aíslan con frecuencia de carne y productos cárnicos, habiéndose comprobado tanto su capacidad para multiplicarse en estos substratos cuando el pH es elevado (próximo a 6 o superior), como el carácter psicrotrofo de muchas de las cepas de este origen (Ridell y Korkeala, 1997; García-López *et al.*, 1998). Los dos géneros dominantes hallados por nosotros también parecen serlo en otros embutidos españoles (Pérez-Cardenal *et al.*, 1992; Encinas, 1993). En la misma Tabla 2 se presentan los géneros y especies detectados durante la fabricación y maduración,

apreciándose que no parece existir un patrón definido en la sucesión de *Enterobacteriaceae* aunque *Pantoea agglomerans* se solía aislar en las muestras iniciales (con valores de pH próximos a 6 ó superiores) y *Hafnia alvei* al final de la maduración. Esta última especie aparece frecuentemente en otros productos fermentados como ciertos quesos de variedades duras y semiduras (Román, 1997).

**TABLA 2.** Géneros y especies de *Enterobacteriaceae* aisladas durante la fabricación y maduración del chorizo de Cantimpalos

<b>Industria A</b>			
	Día <sup>a</sup>	pH	Especies
<b>Lote I</b>	1	5,61	<i>H. alvei</i> <sup>d</sup> , <i>S. fonticola</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i>
	2	5,55	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>C. freundii</i>
	9	5,19	<i>K. ascorbata</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>Es. blattae</i>
	16	5,00	
<b>Lote II</b>	1	6,11	<i>E. cloacae</i> (2) <sup>b</sup> , <i>C. Diversus/C. cosevi</i>
	2	6,10	<i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> , <i>E. gergoviae</i>
	9	5,52	<i>C. amalonaticus</i> (2), <i>Kb. Oxytoca</i> , <i>S. odorifera</i>
	16	4,99	<i>S. ficaria</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Ed. hoshinae</i>
<b>Industria B</b>			
<b>Lote I</b>	1	5,83	<i>P. agglomerans</i>
	3	6,01	<i>P. agglomerans</i> , <i>S. liquefaciens</i>
	6	6,18	
	15	5,11	<i>C. amalonaticus</i> , <i>Kb. oxytoca</i> , <i>E. intermedium</i>
	21	5,01	
<b>Lote II</b>	1	6,10	<i>S. fonticola</i>
	3	6,20	<i>P. agglomerans</i> , <i>Cd. davisae</i> , <i>S. liquefaciens</i> (2), <i>E. gergoviae</i>
	6	5,70	<i>E. intermedium</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>S. liquefaciens</i>
	15	5,01	<i>E. cloacae</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>S. liquefaciens</i>
	21	4,91	<i>S. marcescens</i> , <i>H. Alvei</i>

<sup>a</sup> H, *Hafnia*; S, *Serratia*; E, *Enterobacter*; C, *Citrobacter*; K, *Kluyvera*; P, *Pantoea*; Es, *Escherichia*; Kb, *Klebsiella*; Ed, *Edwardsiella*; Cd, *Cedecea*. <sup>b</sup>( ), n° de cepas

Las condiciones en las que se llevó a cabo la investigación de la posible presencia de *Yersinia* y *Salmonella* en chorizo listo para el consumo (Capítulo 2) es evidente que tuvieron que ejercer una acción selectiva sobre determinadas enterobacterias pero, en cualquier caso, se detectaron, especialmente en los medios CIN y MacConkey, muchos de los géneros aislados en VRBGA (Tablas 3 y 4). Destaca, en el medio EF-18 (para *Salmonella*), la presencia mayoritaria de *Escherichia* aunque ninguna de las 10 cepas aisladas se adscribió a la especie *E. coli*.

Parece oportuno considerar la eficacia de los métodos y medios utilizados para el aislamiento de *Y. enterocolitica* y *Salmonella* así como para el recuento de *Enterobacteriaceae* en embutidos fermentados. En este trabajo, se pone de manifiesto la necesidad de confirmar la identidad de las colonias que en los medios EF-18, CIN, MacConkey e incluso en VRBGA presentan características que las hacen sospechosas de pertenecer a la especie, género o familia investigadas. Así, ninguna de las cepas de presuntas yersinias o salmonelas se identificaron como tales y solamente el 56,8% de las seleccionadas de placas de VRBGA se confirmaron como *Enterobacteriaceae*.

**TABLA 3.** Géneros y especies a los que se adscribieron las 29 cepas aisladas del medio EF-18 (presuntas salmonelas)

Género	Especie	nº de cepas
<i>Escherichia</i>	<i>E. fergusonii</i>	7
	<i>E. vulneris</i>	3
<i>Serratia</i>	<i>S. odorifera</i>	6
<i>Yersinia</i>	<i>Y. aldovae</i>	3
<i>Yokonella (Koserella)</i>	<i>Y. regensburgei/K. trabulsii</i>	2
<i>Edwardsiella</i>	<i>E. hoshinae</i>	2
<i>Enterobacter-Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>	2
	<i>E. aerogenes</i>	1
<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	1
	<i>Klebsiella spp.</i>	1
<i>Vibrio</i>	<i>V. metschnikovii</i>	1

Diversas aminos biógenas han sido detectadas en embutidos españoles (Silla Santos, 1996). Entre las diferentes bacterias productoras de estos compuestos se encuentran los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, cuya capacidad para producir diaminas (putrescina y/o cadaverina) en condiciones experimentales está bien establecida (ten Brink *et al.*, 1990). En carne envasada al vacío y mantenida a 1°C, se ha demostrado la formación de putrescina y cadaverina asociada al crecimiento de enterobacterias hasta niveles elevados. En esas condiciones, *Hafnia alvei* y *Serratia liquefaciens* parecían ser las dos especies más eficaces (Edwards *et al.*, 1987).

En nuestro estudio, todas las cepas de *Hafnia alvei* descarboxilaban la lisina y la ornitina, siendo ambos aminoácidos también descarboxilados por las cepas de *Serratia* (100 y 90%, respectivamente). Con excepción de las tres cepas de *Citrobacter amalonaticus* y de dos identificadas como *Pantoea agglomerans*, las pertenecientes a

los otros géneros identificados descarboxilaban al menos uno de estos aminoácidos. Asimismo, en ciertos productos cárnicos la presencia de cadaverina se debe fundamentalmente a la acción de las enterobacterias mientras que la de putrescina procede de la acción de este grupo bacteriano y de las bacterias acidolácticas (Krökel, 1995).

**TABLA 4.** Géneros a los que se adscribieron las 106 cepas aisladas de los medios CIN y MacConkey (presuntas yersinias)

<b>Familia/Género</b>	<b>Durante la fabricación</b>	<b>Producto final</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Citrobacter</i>	27 <sup>b</sup>	2
<i>Hafnia</i>	5	3
<i>Klebsiella</i>	3	4
<i>Proteus</i>	6	0
<i>Enterobacter</i>	2	4
<i>Serratia</i>	4	1
<i>Shigella</i>	0	1
NI <sup>a</sup>	4	3
<i>Moraxellaceae</i>		
<i>Acinetobacter</i>	11	1
NI <sup>a</sup>	19	
<i>Deinococcaceae</i>		
<i>Enterococcus</i>	6	

<sup>a</sup> NI, no identificadas; <sup>b</sup>, núm. de cepas

Son varias las condiciones que determinan la formación de aminas biógenas en los alimentos, destacando entre ellas: la presencia de aminoácidos libres, la de microorganismos descarboxilasa positivos y el establecimiento de unas condiciones que permitan su multiplicación, la síntesis de enzimas descarboxilantes y la acción de estos últimos sobre los aminoácidos correspondientes.

Estudios realizados en carne envasada al vacío han puesto de manifiesto que el acúmulo de cadaverina se asociaba con niveles de *S. liquefaciens* de 4,30 log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup> y, en el caso de *H. alvei*, con niveles de 6,50 log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup>; para el acúmulo de putrescina, ambas bacterias debían alcanzar poblaciones superiores a 6 log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup> (Dainty *et al.*, 1986). En embutidos fermentados, ten Brink *et al.* (1990) observaron que el contenido en ambas diaminas dependía de la actividad descarboxilante de las bacterias acidolácticas y de la flora presente inicialmente en la carne, destacando el

papel de las *Enterobacteriaceae*. La importancia de la calidad microbiológica de la carne y el tocino ha sido destacada también por Hernández-Jover *et al.* (1997). Los primeros (ten Brink *et al.*, 1990) apreciaron también que, durante la obtención de estos productos cárnicos, se produce por proteólisis un incremento de la lisina aunque no de la ornitina. Asimismo, demostraron que la casi desaparición de la ornitina asociada al nivel máximo de putrescina tenía lugar ya el primer día de fermentación y era debida a una cepa de *Lactobacillus* empleada como cultivo iniciador, mientras que la cadaverina, que se empezaba a detectar el segundo día de fermentación, seguía incrementándose hasta el producto final. Estos investigadores sugieren que las *Enterobacteriaceae* capaces de multiplicarse en las primeras fases del proceso podían haber producido la lisina Descarboxilasa que permaneció activa durante la fermentación y maduración. Aunque es muy difícil concluir acerca del posible riesgo que presentan las enterobacterias como productoras de diaminas en chorizo, parece, a la luz de los datos obtenidos en otros trabajos y teniendo en cuenta la elevada capacidad descarboxilante de nuestras cepas, que es preciso controlar eficazmente el crecimiento de estas bacterias ya en las fases iniciales y que el método de fabricación empleado por la industria B (maduración de la masa durante 3 días a 1°C) no parece adecuado en este sentido.

---

**TABLA 5.** Actividad descarboxilasa de los principales géneros de *Enterobacteriaceae* aislados de chorizo de Cantimpalos (medio VRBGA)

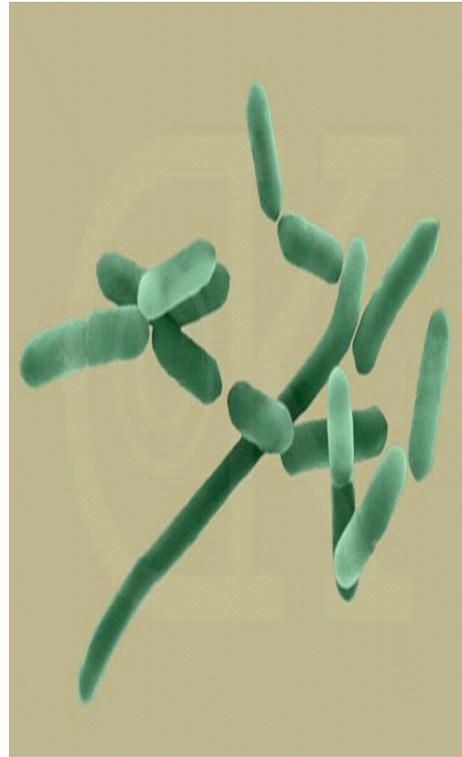
---

<b>Género</b>	<b>Aminoácido</b>	
	<b>Lisina</b>	<b>Ornitina</b>
<i>Hafnia</i>	100 <sup>a</sup>	100
<i>Serratia</i>	100	90
<i>Enterobacter-Pantoea</i>	84,2	89,5
<i>Citrobacter</i>	20	40

---

<sup>a</sup>, porcentaje de cepas adscritas a género que poseían actividad descarboxilasa

---



## **CAPÍTULO 8.**

**PSICROTROFOS, *AEROMONAS*  
Y *LISTERIA***



## INTRODUCCIÓN

La flora presente en carne y tejido adiposo depende de las condiciones en las que los animales de abasto se crían, sacrifican y procesan. Inicialmente, se trata de un grupo heterogéneo de microorganismos -principalmente mesófilos- entre los que se encuentran ciertas bacterias Gram-positivas (micrococos, estafilococos, *Bacillus*, corineformes, bacterias acidolácticas, *Brochothrix thermosphacta*, etc.) y Gram-negativas (*Pseudomonas*, flavobacterias, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, etc.) (Dainty y Mackey, 1992). El mantenimiento a refrigeración de las canales y la carne selecciona aquellos microorganismos capaces de multiplicarse a bajas temperaturas (psicrotrofos). Si el almacenamiento tiene lugar en aerobiosis, se hacen dominantes las bacterias Gram-negativas tanto móviles como inmóviles, especialmente *Pseudomonas* y, en determinadas circunstancias, *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, cuando el envasado o el procesado introduce factores limitantes como son valores bajos de pH y  $a_w$ , disminución del Eh, etc., el crecimiento de las bacterias psicrotrofas Gram-negativas se ve restringido de forma importante pasando a predominar las bacterias psicrotrofas Gram-positivas que, en general, poseen una mayor resistencia a estos factores limitantes (Holzapfel, 1998).

El estudio de la flora psicrotrofa en carne y productos cárnicos tiene un doble interés: por un lado, determinados miembros de este grupo son alterantes importantes (Dainty y Mackey, 1992; Borch *et al.*, 1996; Nychas *et al.*, 1998), por otro, ciertas bacterias patógenas psicrotrofas como *Aeromonas* y *Listeria* contaminan frecuentemente la carne fresca pudiendo multiplicarse y suponer un riesgo en ciertos productos cárnicos (Varnam y Sutherland, 1998).

Los miembros del género *Listeria* son bacilos Gram-positivos, no esporulados, anaerobios facultativos capaces de sobrevivir en hábitats muy diversos. En general, se admiten siete especies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *L. ivanovii* subsp. *londonensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. murrayi*) ya que la octava, *L. denitrificans*, ha sido recalificada como *Josenia denitrificans*. Sin embargo, en la actualidad parece más adecuado considerar sólo seis especies ya que *L. murrayi* parece ser idéntica a *L. grayi* (Roccourt y Cossart, 1997). De ellas, sólo *L. monocytogenes* y *L.*

*ivanovii* se consideran virulentas, aunque *L. welshimeri* y *L. seeligeri* también pueden ser ocasionalmente patógenas.

El género *Aeromonas* incluye bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos. La taxonomía de estas bacterias se caracteriza por ser muy confusa y por estar cambiando continuamente. Hasta ahora se han descrito 14 grupos de hibridación (GH<sub>s</sub> o genoespecies) y 12 fenoespecies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. veronii* biovar *veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. encheleia* y *A. popoffii* (Kirov, 1997; Huys *et al.*, 1997a, 1997b). Generalmente, se considera que las fenoespecies implicadas en infecciones alimentarias son *A. hydrophila* (cepas pertenecientes a los GH<sub>s</sub> 1, 2 y 3), *A. caviae* (cepas pertenecientes a los GH<sub>s</sub> 4, 5 y 6) y *A. sobria* (cepas pertenecientes a los GH<sub>s</sub> 7, 8 y 9) (ICMSF, 1996; Kirov, 1997).

Los objetivos del trabajo recogidos en este capítulo han sido: 1) estudiar la evolución cuantitativa y cualitativa de la población psicrotrofa durante la fabricación del chorizo de Cantimpalos en la industria B (seleccionada por la peculiaridad del proceso), 2) investigar el comportamiento de *Aeromonas* durante la fabricación en la industria A así como su incidencia en el producto listo para el consumo (capítulo 2), 3) caracterizar e identificar las cepas de *Aeromonas*, y 4) investigar la posible presencia de *Listeria* en producto final.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **PSICROTROFOS**

#### **MUESTRAS Y RECUENTOS**

Se siguieron dos fabricaciones de la industria B, tomándose muestras los días 1, 3, 6, 15 y 21. Las siembras (extensión en superficie) se realizaron en agar para Recuento en Placa (Unipath) incubándose a 7°C durante 14 días.

### CEPAS

De placas correspondientes a cada día de muestreo se seleccionaron al azar (Harrigan y McCance, 1976), 4-6 colonias que se purificaron mediante pases sucesivos en agar y caldo Nutritivo (Unipath). Finalizado el proceso, 62 cepas se sembraron en viales de agar Triptona Soja (TSA, Unipath) inclinado, que se almacenaron a refrigeración.

### CARACTERIZACIÓN

Para preparar el inóculo, las cepas se sembraron en caldo Triptona Soja (TSB, Unipath) conteniendo un 1% de extracto de levadura. Todas las pruebas, salvo que se indique otra temperatura, se realizaron a 28°C. Las características investigadas fueron las siguientes: tinción de Gram (Cruickshank, 1965), actividad oxidasa y catalasa (Cowan, 1974), morfología de las colonias (forma, tamaño y opacidad), producción de pigmentos difusibles (King *et al.*, 1954; Hendrie y Shewan, 1979; Palleroni, 1984) y no difusibles (Hendrie y Shewan, 1979), características de crecimiento en medio líquido (densidad y crecimiento superficial), movilidad (*GI Motility medium*, Difco), crecimiento en caldo a distintas temperaturas (4, 7, 10, 37 y 41°C), crecimiento en medio sólido a diferentes temperaturas (25, 28, 30, 37 y 41°C), tolerancia al NaCl (3, 4, 6, 6,5 y 7,5%, p/v; Jayne Williams, 1976), prueba de oxidación-fermentación (Cowan, 1974), hidrólisis de gelatina, caseína, hipurato, almidón y ADN (Cowan, 1974), descarboxilación de L-ornitina y L-lisina, hidrólisis de arginina (Thornley, 1960; Palleroni, 1984), producción de levano y dextrano (Lelliot *et al.*, 1966), producción de H<sub>2</sub>S, actividad lipolítica sobre Tween 80 y yema de huevo (Sierra, 1957; Lànyi, 1987), pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer (Harrigan y McCance, 1976), utilización de citrato como única fuente de carbono (Lànyi, 1987), producción de ureasa e indol (Cowan, 1974; Lànyi, 1987), reducción de nitratos y tolerancia al KCN (Cowan, 1974), hidrólisis de tirosina y desnitrificación (Molin y Ternström, 1982), actividad hemolítica (Cowan, 1974), producción de ácido y gas de la glucosa, crecimiento en los siguientes medios selectivos: agar Kanamicina Azida Sódica Esculina, agar MRS, medio de Baird-Parker y agar de MacConkey (Unipath), y producción de ácido a partir de los siguientes hidratos de carbono (1%, p/v): adonitol, almidón, L-arabinosa, D-celobiosa, dulcitol, esculina, β-D-fructosa, D-galactosa, *mio*-inositol, inulina, manosa, melezitosa, α-D-melibiosa, D-rafinosa, α-L-ramnosa, sacarosa, salicina, D-sorbitol, L-sorbosa, D-

trealosa, xilitol y D-xilosa (todos ellos de Sigma). Esta última prueba se realizó en placa de microtítulo empleando un multiinoculador Dynatech con cabezal de 96 agujas.

Paralelamente a su caracterización, las cepas de bacilos Gram-positivos se cultivaron en caldo Nutritivo (Unipath) conteniendo 50 mg/l de Mn SO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (30°C/48 horas, y manteniendo los caldos tres días más a temperatura ambiente) posteriormente se sometieron a tratamiento térmico (80°C durante 10 minutos), sembrándose a continuación en agar Leche (Unipath) y en agar y caldo Nutritivo (Unipath). De este modo se confirmaban las cepas de *Bacillus*, en las que se examinaba la producción de esporos, su posición, si deformaban o no el esporangio y su forma. La tinción de esporos se realizó de acuerdo con las recomendaciones de Kramer *et al.* (1982).

#### IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de las cepas se siguieron los esquemas recogidos en la última edición de “The Prokaryotes” (Balows *et al.*, 1992).

#### *Aeromonas*

#### MUESTRAS Y RECUENTOS

Se estudiaron dos fabricaciones en cada una de las industrias A y B. En esta última no se detectó ninguna cepa de *Aeromonas* en la masa, por ello, se siguió la evolución en la primera, muestreándose los días 1, 2, 9 y 16. Asimismo, se investigó la presencia de estas bacterias en 48 muestras de producto listo para el consumo obtenidas de cuatro industrias diferentes (capítulo 2).

Las muestras se homogeneizaron en agua de peptona al 0,1% (p/v) conteniendo 1% (p/v) de Tween 80. Las diluciones (0,1 ml) se sembraron en agar Glutamato Almidón Penicilina Rojo Fenol (GSP, Merck), incubándose las placas a 28°C durante tres días. Paralelamente se llevó a cabo un enriquecimiento en frío. Para ello, el homogeneizado original se mantuvo 15 días a 7°C, tomándose alícuotas a los 7 y 15 días para su siembra en agar GSP (Merck).

### CEPAS

Un total de 16 cepas (5 aisladas del producto final listo para el consumo y 11 obtenidas del muestreo del lote I, día 1) presentaban características propias de *Aeromonas* (colonias amarillas, grandes y rodeadas de un halo del mismo color). Estas cepas se purificaron mediante pases en caldo Triptona Soja (TSB, Unipath) y agar Triptona Soja (TSA, Unipath), manteniéndose en viales de agar TSA (Unipath) inclinado para su posterior caracterización e identificación, que se llevó a cabo siguiendo el esquema propuesto por García-López *et al.* (1998), que incluye las pruebas siguientes: tinción de Gram y morfología celular, movilidad, actividad oxidasa, prueba de oxidación-fermentación, producción de pigmentos e hidrólisis del ADN. Diez cepas se confirmaron como *Aeromonas*, cinco se identificaron como *Acinetobacter* spp. y una como *Pseudomonas*.

### CARACTERIZACIÓN

Las 10 cepas confirmadas como *Aeromonas* se sometieron a las pruebas siguientes: producción de catalasa, reacciones en el medio AH (Kaper *et al.*, 1979), oxidación-fermentación del manitol, resistencia al agente O/129 (10 y 150 µg), formación de gas a partir de glucosa, prueba de Voges-Proskauer, descarboxilación de ornitina y lisina, hidrólisis de esculina, producción de H<sub>2</sub>S, β-hemólisis en sangre de ovino, hidrólisis de elastina, gelatina, caseína, almidón, Tween 80, lecitina y tributirina, producción de ácido a partir de: L-arabinosa, sacarosa, *mio*-inositol, D-manitol y salicina, crecimiento a 37°C y en caldo nutritivo con (1%, p/v) y sin NaCl. Las pruebas se realizaron en la forma descrita por Farmer *et al.* (1992) y Kirov (1997).

### ADSCRIPCIÓN A ESPECIE

Se llevó a cabo utilizando los esquemas de identificación propuestos por los autores anteriores (Farmer *et al.*, 1992 y Kirov, 1997).

### Listeria

### MUESTRAS Y RECUEENTOS

Se investigó la presencia de *Listeria* en 48 muestras de producto final obtenidas de cuatro industrias diferentes, estando descritos los métodos empleados en el capítulo 2 de esta Tesis.

### CEPAS

Se estudiaron 59 cepas que por sus características podrían considerarse “presuntas” listerias.

### CARACTERIZACIÓN

Inicialmente, se llevaron a cabo las pruebas siguientes: tinción de Gram, crecimiento a 35°C, producción de catalasa a 37°C, movilidad a 37 y 20°C, prueba de la oxidación-fermentación, producción de ácido y gas de la glucosa, prueba de Voges-Proskauer, hidrólisis de la esculina y producción de fosfatasa alcalina, oxidasa y ureasa (Jones y Seeliger, 1992). Ninguna de las cepas se identificó como *Listeria*, pero para facilitar su adscripción a género se investigaron otros caracteres como actividad hemolítica, reacción en agar *Triple Sugar Iron* (TSI, Unipath), prueba del rojo de metilo y producción de ácido a partir de varios hidratos de carbono (almidón, D-galactosa, maltosa, manitol,  $\alpha$ -L-ramnosa, sacarosa y D-xilosa).

### IDENTIFICACIÓN

Básicamente se utilizó el esquema de Jones y Seeliger (1992) e información recogida de la última edición de “The Prokaryotes” (Balows *et al.*, 1992).

## RESULTADOS

La evolución cuantitativa de la flora psicrotrofa en el chorizo de Cantimpalos elaborado en la industria B se presenta en la Tabla 1 donde también se recogen los datos de pH y  $a_w$ .

Los grupos, géneros y especies a los que pertenecían las 62 cepas aisladas de agar para Recuento en Placa (incubación a 7°C durante 14 días) se dan en la Tabla 2. En cuanto

a la actividad proteolítica y lipolítica de esta población, sólo una cepa, identificada como *Bacillus*, utilizaba todos los substratos ensayados (lecitina, Tween 80, gelatina y caseína). Una cepa adscrita a *Kurthia* era lipolítica, y tres de *Bacillus*, un pediococo, un estafilococo y dos no identificadas eran proteolíticas. En conjunto el 14,5% de las cepas presentaba una y/u otra actividad.

La Tabla 3 recoge la sucesión de géneros de bacterias psicrotrofas durante la fabricación del chorizo de Cantimpalos en la industria B.

En la Tabla 4 se muestra la evolución de los recuentos de *Aeromonas* en las dos fabricaciones en la industria A. Los patrones bioquímicos de las 10 cepas de *Aeromonas* aisladas durante las fabricaciones anteriores, el número de cepas que los presentaban y la fenoespecie a la que pertenecían se recogen en la Tabla 5.

Ninguna de las cepas sospechosas de pertenecer al género *Listeria* aisladas del producto final en el medio selectivo de *Listeria* según la formulación *Oxford* (Unipath, capítulo 2) se confirmó como tal. La Tabla 6 presenta las especies o los géneros a los que pertenecían.

## DISCUSIÓN

**TABLA 1.** Evolución de la flora psicrotrofa en chorizo de Cantimpalos (industria B)

		Día de elaboración-maduración				
Parámetro		1	3	6	15	21
Lote I	Población	ND <sup>a</sup>	5,03 <sup>b</sup>	6,39	7,73	7,09
	PH	5,83	6,01	6,18	5,11	5,00
	A <sub>w</sub>	0,957	0,952	0,919	0,901	0,893
Lote II	Población	ND	6,40	6,05	7,65	7,23
	PH	6,10	6,20	5,70	5,01	4,91
	A <sub>w</sub>	0,961	0,975	0,921	0,914	0,901

<sup>a</sup>ND, no determinado; <sup>b</sup>, log<sub>10</sub> ufc/g

El examen de la Tabla 1 pone de manifiesto que los niveles de psicrotrofos en el lote I aumentaban hasta el día 15, descendiendo *ca.* 0,6 unidades logarítmicas/g en las muestras tomadas a los 21 días. Un comportamiento semejante en la última fase se aprecia en el lote II pero en los dos muestreos anteriores se observaron oscilaciones (descenso en el día 6 e incremento en el día 15). No es fácil explicar el comportamiento de la flora psicrotrofa en los dos lotes estudiados aunque podría estar relacionado con la evolución del pH. Así, en el lote I se aprecia un incremento del mismo en el día 6; mientras que en el lote II se produce un descenso de 0,5 unidades (de pH). Uno de los factores que determina el comportamiento de la flora psicrotrofa en carne y productos cárnicos es el pH. En general, al disminuir éste, las bacterias suelen precisar para multiplicarse temperaturas más elevadas y valores más altos de  $a_w$  (Kraft, 1986). Sin embargo, en ambos lotes se produce un incremento notable de los psicrotrofos entre los días 6 y 15 (mayor en el lote II) coincidiendo con un descenso tanto del pH como de la  $a_w$ .

**TABLA 2.** Géneros y especies a los que se adscribieron las 62 cepas de bacterias psicrotrofas aisladas (agar para Recuento en Placa) durante la fabricación de dos lotes de chorizo de Cantimpalos en la industria B

	<b>Grupo/género</b>	<b>Especie</b>	<b>cepas<sup>a</sup></b>	<b>%</b>	
<b>GRAM- POSITIVOS</b>	<i>Bacillus</i>	<i>B. firmus</i>	17	27,41	
		<i>B. thuringiensis</i>	6	9,67	
		<i>B. larvae</i>	1	1,61	
		<i>Bacillus</i> spp.	4	6,45	
	<i>BAL</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	5	8,06	
		<i>L. curvatus</i>	5	8,06	
		<i>Carnobacterium piscicola</i>	3	4,83	
		<i>Pediococcus</i> spp.	4	6,45	
		<i>Kurtia</i>	<i>Kurtia</i> spp.	6	9,67
		<i>Brochrothrix</i>	<i>Brochrothrix</i> spp.	2	3,22
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	1,61	
	NI <sup>b</sup>		1	1,61	
<b>GRAM- NEGATIVOS</b>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	4	6,45	
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i> spp.	1	1,61	
	NI		2	3,22	

<sup>a</sup>, núm. de cepas, <sup>b</sup>NI, no identificadas

Como era de esperar, dadas las características del producto estudiado, la mayoría (88,70%) de las cepas psicrotrofas aisladas eran bacterias Gram-positivas que pertenecían al género *Bacillus* (45,16%) y al grupo de las bacterias acidolácticas -BAL- (27,41%), siendo menor la presencia de *Kurthia* (9,67%), *Brochothrix* (3,22%) y *Staphylococcus* (1,61%). Únicamente se detectaron siete cepas de bacterias Gram-negativas (11,30%) adscritas a los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Tabla 2).

Si consideramos la sucesión de estos géneros a lo largo del proceso de elaboración (Tabla 3), apreciamos que, en ambos lotes, tanto *Bacillus* como BAL estaban presentes en la masa de tres días de reposo, aumentaban durante las fases intermedias y tendían a disminuir, e incluso desaparecer, en el producto final. *Kurthia* y *Brochothrix* se aislaban principalmente al final del proceso, detectándose la única cepa de *Staphylococcus* al principio.

**TABLA 3.** Evolución de los géneros de bacterias psicrotrofas aisladas durante la fabricación de chorizo de Cantimpalos (industria B)

		Día de elaboración-maduración			
Género		3	6	15	21
Lote I	<i>Bacillus</i>	4 <sup>a</sup> (57,1) <sup>b</sup>		5 (50)	2 (20)
	BAL	2 (28,6)		5 (50)	
	<i>Pseudomonas</i>				3 (30)
	<i>Kurthia</i>				2 (20)
	<i>Brochothrix</i>				1 (10)
	NI <sup>c</sup>	1 (14,2)			2 (20)
	Lote II	<i>Bacillus</i>	7 (70)	8 (72,7)	2 (22,2)
BAL		1 (10)		7 (72,8)	2 (40)
<i>Pseudomonas</i>		1 (10)			
<i>Staphylococcus</i>		1 (10)			
<i>Kurthia</i>			2 (18,2)		2 (40)
<i>Aeromonas</i>			1 (9,1)		
<i>Brochothrix</i>					1 (20)

<sup>a</sup>, núm. de cepas; <sup>b</sup>, % correspondiente en ese punto de muestreo; <sup>c</sup>NI, no identificada

La presencia de *Bacillus* en la masa destinada a la fabricación de embutidos es un hallazgo común que se ha asociado a la contaminación aportada por hierbas aromáticas, especias y tripas (Riha y Solberg, 1970; Lücke, 1985). También la propia materia prima

puede contener estas bacterias. Así, Gill y Bryant (1992) encontraron que *Bacillus* podía constituir hasta el 10% de la flora superficial de las canales de porcino. La capacidad de muchas de las cepas de este género aisladas de carne y productos cárnicos para multiplicarse, en condiciones ideales, a temperaturas de refrigeración (5°C) y a valores bajos de pH y  $a_w$  (4,5 y 0,90-0,95, respectivamente) ha sido señalada por Holzapfel (1998), pudiendo esto explicar su considerable incidencia entre la flora psicrotrofa obtenida en las fases iniciales de fabricación. Sin embargo, el efecto negativo de la combinación de estos parámetros y el bajo potencial de oxido-reducción (Eh) parece ser definitivo para el control de *Bacillus* spp. en embutidos fermentados (Neumayr *et al.*, 1983) como lo demuestra el hecho de su escasa incidencia (lote I) o no detección (lote II) en el producto final, observados en este estudio.

La importancia de *L. curvatus* y *L. sakei* en la obtención de embutidos es bien conocida (Kröckel, 1995) como también lo son sus propiedades (crecimiento a bajas temperaturas, tolerancia a la sal y a los valores bajos de Eh, etc.), por ello, era esperable su detección entre la población aislada. *Pediococcus* parece ser menos competitivo a bajas temperaturas aunque su temperatura mínima de crecimiento es del orden de 8°C. Finalmente, *Carnobacterium* también está presente en carne y productos cárnicos, viéndose favorecida su multiplicación en estos sustratos por las bajas temperaturas (Dainty y MacKey, 1992). En los dos lotes estudiados por nosotros, se apreció que la incidencia de BAL disminuía en el producto final, detectándose, en los embutidos listos para el consumo de este lote I, por primera vez, otros géneros Gram-positivos como *Kurthia* y *Brochothrix*. Ambos están constituidos por bacterias no esporuladas presentes tanto en carne y productos cárnicos como en las propias industrias (Dainty y MacKey, 1992; Keddie y Jones, 1992). *B. thermosphacta*, que crece a 0°C y es anaerobio facultativo, se aísla frecuentemente de carne de cerdo, especialmente de tejido adiposo, llegando a constituir hasta el 19% de la población presente en este sustrato, siendo menor su incidencia en la piel (Gill y Bryant, 1992). También se aísla de emulsiones grasas y del equipo, utensilios y ambiente tanto en mataderos como en las industrias donde se elaboran embutidos (McLean y Sulzbacher, 1953; Gardner, 1981). Encinas (1993) estudió el comportamiento de *B. thermosphacta* durante la fabricación de diversos tipos de embutidos, observando que en el producto final la población podía llegar a ser del orden de 5-6 log<sub>10</sub> ufc/g. *Kurthia*, cuya temperatura

mínima de crecimiento es 5°C, se ha aislado de jamones, embutidos y otros productos cárnicos elaborados con carne de cerdo (Ingram, 1952; Dowell y Board, 1971; Shaw y Keddie, 1983).

En cuanto a las bacterias Gram-negativas, se detectaron *Pseudomonas* en el producto final (lote I). Aunque estas bacterias disminuyen durante el proceso, Encinas (1993) señaló que su comportamiento se ve afectado por diversos parámetros y que el nivel medio en producto final es de *ca.* 2 log<sub>10</sub> ufc/g. La cepa de *Aeromonas* aislada a los 6 días en el lote II no pudo adscribirse a ninguna fenoespecie descrita pero presentaba características (p. ej., β-hemólisis) asociadas a la virulencia.

La escasa actividad proteolítica y lipolítica de la población de psicrotrofos estudiada no coincide con los datos obtenidos por Encinas (1993) y sugiere que estos microorganismos no desempeñan un papel importante ni beneficioso ni como alterantes en la fabricación del chorizo de Cantimpalos.

**TABLA 4.** Evolución de la población de *Aeromonas* en el chorizo de Cantimpalos (industria A)

	Parámetro	Día de elaboración-maduración			
		1	2	9	16
Lote I	Población	2,47 <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	A	A
	pH	5,61	5,55	5,19	5,00
	% ác. láctico	0,37	0,35	0,52	0,51
	% NaCl	2,55	2,46	2,84	2,59
Lote II	Población	A	A	A	A
	pH	6,11	6,10	5,52	4,99
	% ác. láctico	0,26	0,31	0,32	0,41
	% NaCl	3,06	2,57	2,80	3,16

<sup>a</sup>, log<sub>10</sub> ufc/g; <sup>b</sup>, ausencia

Aunque *Aeromonas* es una bacteria de origen acuático, se aísla frecuentemente de diversos hábitats, incluida la carne de cerdo. Gill y Jones (1995) demostraron que, en el matadero, *A. hydrophila* y *A. caviae* pueden multiplicarse activamente en los restos acumulados en ciertos equipos, pasando a contaminar el agua. La Tabla 4 muestra que, en el chorizo elaborado en la industria A, la masa del lote I contenía una población de *Aeromonas* de 2,47 log<sub>10</sub> ufc/g pero que éstas desaparecían en el segundo muestreo (día 2).

Encinas (1993) también apreció la rápida inactivación de estas bacterias durante la elaboración de embutidos fermentados españoles aunque en su caso, dejaron de detectarse el día 11. El citado autor comprobó que los niveles de *Aeromonas* en la masa recién preparada variaba con la industria y que dependía de la higiene de las instalaciones y del proceso.

De las 10 cepas de *Aeromonas* aisladas, 6 pudieron identificarse como *A. hydrophila* y una (patrón 4, Tabla 5) se consideró próxima a esta especie aunque fue incapaz de producir acetilmetilcarbinol a partir de glucosa. Las cepas de los patrones bioquímicos 2 y 3 no pudieron adscribirse a ninguna de las 13 especies descritas o propuestas (Tabla 5). Las dificultades para identificar un porcentaje considerable de cepas de aeromonas aisladas de alimentos ha sido señalada también por otros autores (González-Serrano, 1996; Kirov, 1997). Es de destacar que todas las cepas mostraban carácter hemolítico.

**TABLA 5.** Propiedades relevantes de las 10 cepas de *Aeromonas* aisladas de chorizo de Cantimpalos

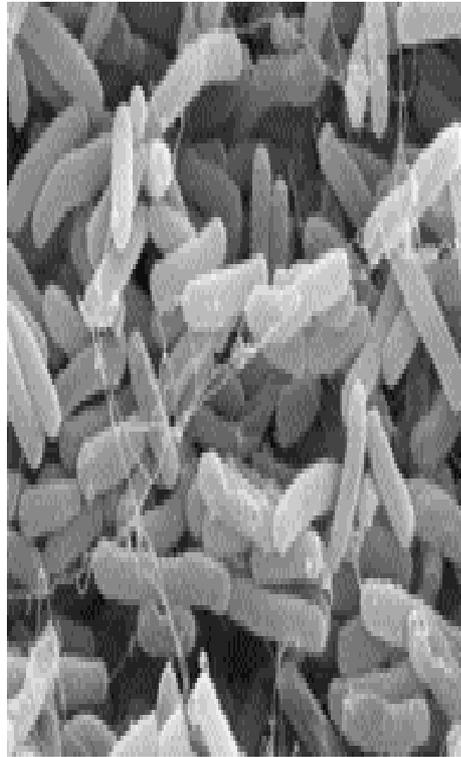
Prueba	Patrones bioquímicos			
	1	2	3	4
O/129	R	R	R	R
Indol	+	+	+	+
Glucosa (gas)	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	-	+	-
Ornitina	-	-		
Lisina	+	-	+	+
Ácido de:				
L-arabinosa	+	+	+	+
Sacarosa	+			+
<i>mio</i> -inositol	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+
Salicina	+	-	-	+
Esculina	+	-	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
β-hemólisis	+	+	+	+
Elastasa	+	+	+	+
Nº cepas	6	1	2	1
Fenoespecie	<i>A. h</i> <sup>a</sup>	NI	NI	Próx. <i>A. h</i>

<sup>a</sup>*A.h.*, *Aeromonas hydrophila*; NI, no identificada; Próx. *A.h.*, falla una propiedad de *A. hydrophila*

La presencia de *Listeria monocytogenes* en embutidos fermentados, generalmente a niveles bajos, ha sido observada en buen número de trabajos (Johnson *et al.*, 1988; Karches y Teufel, 1988; Schmidt *et al.*, 1988; Glass y Doyle, 1989; Junttila *et al.*, 1989; Trüssel y Jemmi, 1989; Encinas, 1993). En este estudio, ninguna de las cepas aisladas del medio *Oxford* se confirmó como perteneciente a este género. La presencia de *L. monocytogenes* en embutidos españoles listos para la venta es inferior al 5% (Encinas, 1993) y semejante a la hallada en otras variedades similares (Farber, 1991). El primero de estos investigadores (Encinas, 1993) encontró que el medio *Oxford* era satisfactorio para el aislamiento de *Listeria* en muestras de embutidos fabricados artesanalmente pero que permitía el crecimiento de muchos “falsos positivos” cuando se analizaban muestras de embutidos industriales. En nuestro caso (Tabla 6), las cepas sospechosas de pertenecer al género *Listeria* pertenecían mayoritariamente al género *Brochothrix*, con una menor incidencia de otras bacterias Gram-positivas (*Micrococcaceae*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*), detectándose, incluso, una cepa Gram-negativa que se identificó como *Serratia*.

**TABLA 6.** Identificación de 59 cepas de “presuntas” listerias aisladas de chorizo de Cantimpalos (producto final) en el medio Oxford

	Nº de cepas	%
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	36	61
<i>Micrococcaceae</i>	17	28,8
<i>Enterococcus</i>	3	5
<i>Lactobacillus</i>	2	3,4
<i>Serratia</i>	1	1,7



## **CAPÍTULO 9.-**

### **BACILOS AEROBIOS ESPORULADOS**



## INTRODUCCIÓN

Hasta no hace mucho tiempo, todos los bacilos esporulados aerobios se adscribían al género *Bacillus*, sin embargo, estudios de la secuencia génica de la fracción 16S del ARN ribosomal han permitido identificar 10 grupos filogenéticos diferentes (Ash *et al.*, 1991, 1993; Farrow *et al.*, 1992; Wisotzkey *et al.*, 1992; Ash *et al.*, 1993, Nielsen *et al.*, 1994; Rainey *et al.*, 1994; Suzuki y Yamasato, 1994; Shida *et al.*, 1996; Spring *et al.*, 1996) y cinco de ellos se han propuesto como nuevos géneros: *Alicyclobacillus* (Wirotzkey *et al.*, 1992) con tres especies, *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993) que incluye 22 especies y dos subespecies, *Halobacillus* (Suzuki y Yamasato, 1994) compuesto por tres especies, *Brevibacillus* (Shida *et al.*, 1996) con 10 especies, y *Aneurinibacillus* (Shida *et al.*, 1996) con tres especies. En 1998, Heyndrickx *et al.* (1998) han descrito el género *Virgibacillus*, con una única especie: *V. pantothenicus* (antes *B. pantothenicus*). En la actualidad, en el género *Bacillus* se incluyen 74 especies.

Este heterogéneo grupo de bacterias se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, aislándose de suelo, vegetales, agua, aire y de muchos alimentos tanto crudos como procesados (ICMSF, 1983). Las bacterias pertenecientes al mismo se caracterizan por ser formas bacilares alargadas y rectas, capaces de producir endosporas (aunque su formación está influenciada por la temperatura de crecimiento, el pH del medio, la aireación y la presencia de minerales y compuestos carbonados o nitrogenados). Todos esporulan en agar nutritivo suplementado con sales de manganeso (Charney *et al.*, 1951) y crecen en aerobiosis, si bien algunas especies y/o cepas pueden hacerlo en anaerobiosis en condiciones experimentales (Claus y Berkeley, 1986). Son catalasa positivos (excepto *B. larvae*, *B. popillae*, *B. lentimorbus* y algunas cepas de *B. stearothermophilus*) y móviles (excepto *B. anthracis* y *B. cereus* subsp. *mycoides*). La mayoría de las especies son Gram-positivas y otras Gram-variable (Smith *et al.*, 1952; Gordon *et al.*, 1973) y, a veces, pueden producir cápsulas (de dextrano, levano o ácido poliglutámico) y pigmentos (negro, amarillo, rojo o anaranjado).

Debido a la gran resistencia de sus esporos, son capaces de sobrevivir en condiciones adversas y por ello este grupo no se puede adscribir a un ecosistema. Así, se

han aislado *Bacillus* termófilos obligados de sedimentos marinos obtenidos a grandes profundidades. Tampoco es infrecuente que se detecten recuentos muy elevados de esporos en una muestra concreta, lo que indica una activa multiplicación previa de las formas vegetativas en el ambiente de donde procedía. Con la excepción de dos especies, *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *B. marinus* (Claus y Berkeley, 1986), se asume que el hábitat primario de la mayoría de los bacilos esporulados es el suelo, considerándose parte de la flora zimógena del mismo y participante en la degradación y metabolismo de polímeros y otros compuestos químicos, participando así en los ciclos del carbono y nitrógeno en el suelo.

Todas las especies, con excepción de *B. stearothermophilus* y algunas cepas de otras especies, son mesófilas. Sin embargo, algunas son capaces de crecer y esporular a temperaturas bajas siendo esta característica importante desde el punto de vista de la alteración de los alimentos refrigerados. El papel alterante está relacionado con su capacidad para sintetizar enzimas que pueden actuar sobre diversos sustratos (Katz y Demail, 1977; Priest, 1977).

*Bacillus* y otros esporulados aerobios también tienen importancia desde el punto de vista sanitario. Se han descrito especies patógenas para animales vertebrados, insectos y también para el hombre (Midura *et al.*, 1970; Kramer *et al.*, 1982; Johnson, 1984; Doyle *et al.*, 1985; Turnbull y Kramer, 1991). Así, *B. cereus* es un agente de intoxicación alimentaria, ocasionando dos síndromes: el diarreico, asociado con alimentos proteicos, y el emético, asociado con alimentos ricos en almidón (Granum, 1997), aunque no está totalmente aclarado si el tipo de toxina es específico de especie, alimento o depende de factores medioambientales (Johnson, 1984). Los alimentos más comúnmente implicados en el síndrome diarreico son carne y productos cárnicos, pudines, sopas y ciertos platos preparados mantenidos en condiciones inadecuadas, mientras que los responsables del síndrome emético son el arroz y en menor medida productos derivados de los cereales. Otros miembros del grupo que pueden ser agentes causantes de intoxicación alimentaria son: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *Virgibacillus pantothenicus*, *Paenibacillus alvei* y *Brevibacillus laterosporus* (Bonde, 1975; Pennington *et al.*, 1976; Sugar y McCloske, 1976; Gilbert *et al.*, 1981; Kramer *et al.*, 1982).

Gilbert *et al.* (1981) revisaron un total de 87 casos de intoxicación alimentaria atribuidos a especies del género *Bacillus*, encontrando que en el 69% de los mismos, los alimentos implicados fueron embutidos y que *B. subtilis* era la especie más frecuente, aunque también estaba representado *Brevibacillus brevis*. La incidencia de brotes era especialmente alta en los Países Bajos, Finlandia, Canadá y Hungría (carnes muy especiadas). En estudios posteriores, se apreció un importante incremento de las infecciones alimentarias asociadas a *Bacillus* en el Reino Unido entre 1986 y 1988 (Lund, 1991). En los brotes asociados con *B. subtilis*, el proceso se manifiesta con un síndrome emético, mientras que cuando el responsable es *B. licheniformis* el cuadro clínico es similar al presentado por *Clostridium perfringens*. En la revisión de Gilbert *et al.* (1981), solamente en cinco casos se involucró a *B. pumilus*, siendo los alimentos responsables diversos platos conteniendo carne.

Las cepas psicrotrofas de las especies patógenas anteriormente citadas no difieren fenotípicamente de las cepas patrón de referencia. En alimentos refrigerados, el número de esporos de estas especies suele ser bajo y su capacidad de supervivencia se ve afectada por diversos factores (Mossel *et al.*, 1967; Puleo *et al.*, 1970; Trimble y Ehrlich, 1970). Estos autores (Trimble y Ehrlich, 1970) han evaluado, asimismo, la posibilidad de que estas cepas psicrotrofas se multipliquen en alimentos y en las propias industrias alimentarias.

En los embutidos fermentados crudos curados, la principal fuente de *Bacillus* la constituyen las hierbas aromáticas y especias empleadas en su elaboración, siendo la especie aislada con mayor frecuencia *B. subtilis* (Goto *et al.*, 1971; Müller, 1981; Encinas, 1993). En relación con la alteración, éste y otros bacilos esporulados aerobios se han asociado con el agriado (Amo, 1980; Bacus, 1984). También poseen propiedades, como la intensa actividad proteolítica, que podrían influir negativamente en la calidad de estos productos pero cuya importancia práctica parece escasa (Newmayr *et al.*, 1983). Finalmente, se ha demostrado (Gerigk y Gossling, 1981; Encinas, 1993) que en estos embutidos la tasa de esporos de *B. subtilis* se mantiene estable durante todo el proceso de maduración y secado y que, si la maduración y el secado son prolongados, el nivel de formas vegetativas se reduce notablemente, ya que son inhibidas por los valores reducidos de pH, Eh y  $a_w$ .

Entre los aspectos beneficiosos tenemos el hecho de que algunos miembros del género *Bacillus* son capaces de sintetizar compuestos con actividad antimicrobiana, bacteriocinas y/o compuestos similares a bacteriocinas (BLIS), que actúan frente a bacterias alterantes y patógenas. Novotny y Perry (1992) aislaron y caracterizaron dos bacteriocinas termoestables producidas por *B. stearothermophilus* SII y NR-9. Éstas son activas frente a cepas de su especie y frente a *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *Branhamella catarrhalis*, entre otros. También se ha aislado y caracterizado otra bacteriocina producida por *B. cereus* (Granum, 1997) con capacidad para inhibir diversas bacterias Gram-negativas de interés sanitario. Asimismo, cepas de *Bacillus* pueden producir antibióticos, como bacitracina, polimixina, tirotricina, gramicidina, etc. En la mayoría de los casos, la producción parece estar relacionada con el proceso de esporulación, siendo liberado el antibiótico cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria y después de comenzar la fase de esporulación. Otro aspecto interesante es su capacidad para producir enzimas de interés tecnológico como neutrasa (*B. amyloliquefaciens*) y alcalasa (*B. licheniformis*) utilizadas en la hidrólisis parcial de proteínas (p. ej., de soja),  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) utilizada en las industrias cervecera, panadera y de jarabes,  $\beta$ -amilasa (EC. 3.2.1.2) (*Paenibacillus polymixa* y *B. cereus*), o  $\beta$ -glucanasa (EC. 3.2.1.-) (*B. subtilis*, Melendo Lidón, 1997). Algunas cepas de ciertas especies como *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* se han propuesto como microorganismos útiles para el control biológico de insectos (moscas y mosquitos) (Priest, 1992), y otras parecen eficaces para controlar el crecimiento de determinados mohos, al menos en condiciones de laboratorio.

Los objetivos del presente capítulo han sido: 1) caracterizar e identificar las cepas de bacilos esporulados presentes en el chorizo de Cantimpalos, 2) evaluar la utilidad de distintos sistemas de identificación, 3) determinar la actividad toxigénica de las cepas de *Bacillus* aisladas mediante el sistema inmunológico BCET RPLA (Unipath) y un método citotoxicológico, 4) conocer el efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la toxinogénesis, y 5) investigar la posible actividad inhibidora de cepas esporuladas aisladas por nosotros frente a *B. cereus*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CEPAS

El estudio se realizó con 70 cepas de bacilos aerobios esporuladas obtenidas de distintos medios. De ellas, 29 se aislaron del medio agar de Baird-Parker (BP, Unipath) (Capítulo 4); 24 de agar para Recuento en Placa (PCA, Unipath) (Capítulo 8); 14 de agar Bilis Glucosa Rojo Neutro Cristal Violeta (VRBGA, Unipath) (Capítulo 7), y 3 de agar Sal Manitol (MSA, Unipath) (Capítulo 4).

En los medios selectivos citados, las colonias presentaban características propias de las familias que se investigaban en cada caso.

La purificación de las cepas se llevó a cabo por pases alternativos en agar Nutritivo y caldo Nutritivo n° 2 (Unipath). La incubación se realizó a 30°C durante 24 horas.

En la realización de las pruebas clásicas y en los métodos miniaturizados de identificación que se señalan más adelante se utilizaron las siguientes cepas de colección como patrones internos:

*B. cereus* NR 5323

*B. cereus* NCDO 1771

*B. cereus* ATCC 14579

*B. cereus mycoides* ATCC 11778

*B. licheniformis* ATCC 7830

*B. brevis* AB 293

*B. alvei* AB 8

*B. subtilis* ATCC 6633

*B. subtilis* ATCC 9524

*B. thuringiensis* ATCC 10792

### CARACTERIZACIÓN

Las pruebas a las que se sometieron las cepas aisladas y purificadas para su caracterización y adscripción a especie fueron las siguientes:

**Tinción de Gram.** Se realizó por el método de Jensen (Cruickshank, 1965), anotándose la coloración Gram, la morfología y el tipo de agrupamiento.

**Producción de catalasa.** Se investigó directamente en placas de agar Nutritivo (Unipath) con cultivos jóvenes (24 horas), depositando unas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v). Se adicionó al medio 1% de glucosa para evitar las falsas reacciones positivas debidas a

la producción de pseudocatalasas (Whittenbury, 1964). El método utilizado es una modificación del descrito por Cowan (1974).

**Producción de oxidasa** Se determinó en cultivos procedentes de un medio carente de glucosa y nitratos (Harrigan y McCance, 1976).

**Morfología y tamaño de las colonias.** Estas características se investigaron en agar Nutritivo (Unipath), incubándose las placas a 30°C y realizándose las lecturas a las 24 y 48 horas.

**Esporas.** Para detectar la presencia de esporas y anotar las características de posición, forma, tamaño del esporangio, así como otros datos recomendados por Gordon *et al.* (1973), las cepas se sembraron en agar nutritivo suplementado con 50 mg/l de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, incubándose durante 48 horas a 30°C y manteniendo las placas otros tres días a temperatura ambiente. La tinción se realizó de acuerdo a las indicaciones de Schleiffer y Fulton (Cowan, 1974).

**Crecimiento en anaerobiosis.** Para la realización de esta prueba se siguieron dos técnicas: a) crecimiento en medio semisólido con tioglicolato (Schleifer y Kloos, 1975), y b) siembra de un cultivo joven (procedente de caldo Nutritivo incubado a 30°C/18h) en placas de agar *Columbia Blood Base* (Unipath) suplementado con sangre desfibrinada de caballo (Unipath) al 5%. La incubación a 30°C se realizó en jarras para anaerobiosis (Unipath), durante 48 horas.

**Producción de β-galactosidasa.** Las cepas se sembraron en agar Nutritivo (Unipath) suplementado con 1% de lactosa, incubándose a 32°C durante 24 horas para inducir la producción del enzima. Posteriormente, se tomaron colonias de estas placas, se resuspendieron en 1 ml de solución salina fisiológica y se añadió un disco impregnado de orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (ONPG, Unipath). Las lecturas se llevaron a cabo a los 15 minutos y a las 4 horas. Se anotó como reacción positiva la aparición de coloración amarilla.

**Producción de acetilmetil-carbinol (Prueba de Voges-Proskauer).** Para la realización de esta prueba las cepas se sembraron en tubos con 5 ml de caldo MR-VP (Unipath), incubándose a 30°C durante 3 días (Claus y Berkeley 1986).

**pH del caldo Voges-Proskauer.** Este se midió con un pHmetro "CRISON micropH 2001" y un electrodo combinado convencional.

**Actividad nitrato-reductasa.** La capacidad de reducción de nitratos a nitritos se investigó en caldo para la Reducción de Nitratos (Difco) (Norris *et al.*, 1981).

**Capacidad desnitrificante.** Se empleó el medio propuesto por Norris *et al.* (1981) para la reducción de nitratos con campana de Durham.

**Crecimiento a diferentes temperaturas.** El medio utilizado y las condiciones de incubación, tiempo y temperatura fueron las señaladas por Claus y Berkeley (1986). Las temperaturas ensayadas fueron: 5, 10, 30, 37, 45, 50, 55 y 65°C.

**Crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.** Las concentraciones estudiadas fueron 5, 7 y 10% de NaCl (Claus y Berkeley, 1986).

**Crecimiento en presencia de lisozima.** La concentración elegida fue de 0,001% (p/v), el medio y las condiciones de incubación fueron las señaladas por Claus y Berkeley (1986).

**Crecimiento en presencia de azida sódica.** La concentración final en el medio de cultivo fue de 0,02% (p/v) (Claus y Berkeley, 1986).

**Producción de ácido a partir de hidratos de carbono.** El medio base utilizado fue el descrito por Claus y Berkeley (1986). La siembra se llevó a cabo partiendo de cultivos jóvenes (24 horas a 30°C) en agar Nutritivo nº2 (Unipath). Se emplearon placas de microtítulo y un multiinoculador (AM80-Dynatech) con cabezal de 96 agujas. Los substratos investigados se esterilizaron por filtración utilizando filtros Millipore con un diámetro de poro de 0,22 µm; la concentración final del substrato en el medio fue del 0,5% (p/v). Los compuestos investigados fueron los siguientes: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, adonitol, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, manosa, sorbosa, ramnosa, dulcitol, *mio*-inositol, manitol, sorbitol, α-metil-D-manósido, melibiosa, sacarosa, trealosa, inulina, melecitosa, rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, gentibiosa, D-turanosa, D-tagatosa, L-fucosa, D-arabitol, gluconato, 2-ceto-gluconato, α-metil-D-glucósido y N-acetil-glucosamina.

**Hidrólisis del almidón.** Se sembraron placas de agar Nutritivo (Unipath) suplementado con 1% (p/v) de almidón soluble (Panreac). Las placas se incubaron a 30°C durante 5 días. La prueba se reveló con solución yodo-yodurada (Harrigan y McCance, 1976). Se consideró reacción positiva la aparición de un halo azul oscuro alrededor de la colonia y/o la aparición de aclaramiento en la zona de crecimiento después de retirar la colonia con un asa de vidrio.

**Hidrólisis de la tirosina.** Se siguieron las recomendaciones de Claus y Berkeley (1986).

**Licuefacción de la gelatina.** El medio utilizado fue Gelatina Nutritiva (Difco) distribuido en tubos de ensayo en volúmenes de 5 ml e incubándose a 30°C durante 14 días. Se consideró reacción positiva desde una ligera licuefacción hasta una licuefacción total después de mantener los tubos en refrigeración durante 1 hora.

**Utilización del citrato como única fuente de carbono.** El medio utilizado fue el agar Citrato de Simmons (Unipath). Se prepararon tubos en pico de flauta y se inocularon con un cultivo joven, incubándose a 30°C durante 14 días.

**Producción de ureasa.** Para la realización de esta prueba se empleó el medio agar Base para Urea de Christensen (Unipath), suplementado con una solución comercial de urea (40%) (Difco). El medio se distribuyó en pico de flauta en tubos de ensayo, incubándose a 30°C durante 5 días (Harrigan y McCance, 1976).

**Hidrólisis de la caseína.** El medio utilizado, las condiciones de incubación y la interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo con Cowan (1974).

**Hidrólisis de la esculina.** Se utilizó el caldo esculina (Cowan, 1974), empleándose placas de microtítulo y un multiinoculador (AM80-Dynatech) con cabezal de 96 agujas. Las placas se sembraron por duplicado.

**Crecimiento a pH 7.** Para la realización e interpretación de esta prueba se siguieron las indicaciones de Claus y Berkeley (1986).

**Desaminación de la fenilalanina.** Se investigó en la forma descrita por Koneman *et al.* (1989).

**Actividades arginina dehidrolasa (ADH), ornitina descarboxilasa (ODC) y lisina descarboxilasa (LDC).** Se utilizó el medio de Base para la Descarboxilación de Moeller (Difco) adicionado del correspondiente aminoácido (forma L) al 1% (p/v). El medio se distribuyó en tubos de hemólisis (3 ml), se colocó un tapón de vaselina estéril y la incubación se realizó a 30°C durante 7 días.

**Producción de indol.** Se prepararon tubos de ensayo con agua de peptona y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Se empleó el reactivo de Kovacs para el indol (Cowan, 1974).

**Prueba de la oxidación-fermentación de la glucosa.** Se utilizó el medio de Hugh y Leifson (Difco) conteniendo 1% (p/v) de glucosa. Las condiciones de incubación fueron 30°C durante 5 días.

**Prueba del rojo de metilo.** Se llevó a cabo en el caldo MR-VP (Unipath), siguiendo las recomendaciones de Cowan (1974).

**Movilidad.** Esta prueba se realizó en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de agar *GI medium* (Difco). Las cepas se inocularon por picadura y las condiciones de incubación fueron de 30°C durante 3 días.

**Producción de SH<sub>2</sub>.** La producción de este compuesto se investigó en el medio SIM (Unipath). La incubación se realizó a 30°C durante 3 días.

**Actividad lecitinasas.** La comprobación de esta actividad enzimática se llevó a cabo de tres formas diferentes: a) en placa, en la forma descrita por Harrigan y McCance (1976), b) en tubo, siguiendo las recomendaciones de Claus y Berkeley (1986), y c) en placa, utilizando el medio agar Selectivo para *Bacillus cereus* (PEMBA, Unipath) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. En este último caso, se empleó el medio sin suplemento de polimixina B.

**Producción de ácido y gas de glucosa.** Para la realización de esta prueba se siguieron las indicaciones de Norris *et al.* (1981).

**Actividad hemolítica.** La actividad hemolítica de las cepas estudiadas se determinó en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. En condiciones de aerobiosis, se utilizó el medio agar Sangre (Unipath) suplementado con un 5% de sangre desfibrinada de caballo (Unipath). La lectura de la prueba se llevó a cabo a las 24 horas, 2 y 4 días de incubación a 30°C. En condiciones de anaerobiosis, se utilizó el medio agar Columbia Base (Unipath) suplementado con sangre desfibrinada de caballo (Unipath) al 5%. Las placas se incubaron a 30°C durante 4 días.

## IDENTIFICACIÓN

### PROCEDIMIENTO CLÁSICO

Inicialmente, se procedió a establecer la subdivisión propuesta por Gordon *et al.* (1973), que permite diferenciar tres grupos morfológicos de acuerdo con el aspecto del esporangio (hinchado o no) y la forma y posición de la spora. La adscripción a género se realizó utilizando los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas, fisiológicas y de cultivo descritas anteriormente. Finalmente, para la caracterización y adscripción a especie se utilizaron los esquemas y claves de identificación propuestos por Gordon *et*

*al.* (1973); Norris *et al.* (1981); Kramer *et al.* (1982), Claus y Berkeley (1986); Priest *et al.* (1987 y Norris *et al.* (1992).

#### SISTEMA MINIATURIZADO

Un total de 44 cepas (32 mesófilas y 12 psicrotrofas) se inocularon en sistema miniaturizado API (API 50CHB y API 20E) (API System, Biomérieux, Vercieu, Francia) siguiendo las indicaciones de Logan y Berkeley (1984). Asimismo se sometieron a este sistema miniaturizado las 10 cepas patrón señaladas con anterioridad. La identificación se llevó a cabo mediante un programa desarrollado en BASIC (Prieto, 1990) ejecutado en un ordenador personal Compaq Deskpro 386s.

#### TAXONOMÍA NUMÉRICA

Treinta y dos cepas aisladas de chorizo de Cantimpalos y las 22 de referencia que se citan a continuación se examinaron en base a las 79 características morfológicas (macroscópicas y microscópicas), bioquímicas y fisiológicas descritas anteriormente. Los 79 caracteres examinados en las 54 cepas fueron codificados como: 0 (negativo), 1 (positivo) y 2 (dudoso). Se usó el coeficiente  $S_{SM}$  de Sokal y Michener (1958) y las cepas se agruparon mediante el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). El análisis se realizó en un ordenador Silicon 486/SX, utilizando el programa NTSYS-pc Ver. 1.80 (Applied Biostatistics, Inc. 1993).

Las cepas de referencia consideradas en el análisis de taxonomía numérica fueron las siguientes: *B. amyloliquefaciens* (CECT 4939), *B. badius* (CECT 17T), *B. brevis* (CECT 5T), *B. cereus* (CECT, 148T, CECT 193, CECT 4387), *B. licheniformis* (CECT 20T, CECT 4320, CECT 959), *B. megaterium* (CECT 4313T, CECT 4096, CECT 370), *B. mycoides* (CECT 4128T, CECT 4123, CECT 4126), *B. pumilus* (CECT 29T, CECT 152), *B. subtilis* (CECT 39T, CECT 365, CECT 4002) y *B. thuringiensis* (CECT 39T, CECT 996)

#### PATOGENICIDAD DE *Bacillus* spp.

#### CEPAS

Un total de 31 cepas aisladas a partir de las muestras de chorizo de Cantimpalos e identificadas mediante los sistemas miniaturizados API 50CHB y API 20E, así como

mediante esquemas clásicos e incluidas en el análisis de taxonomía numérica, fueron examinadas para detectar la producción de indicadores de patogenicidad.

#### PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS

Las cepas a ensayar para la producción de toxina se sembraron en 10 ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Unipath) y se incubaron a 36°C durante 24 h. A partir de este caldo de cultivo se tomaron 250 µl, que se inocularon en un matraz erlenmeyer de 100 ml con 25 ml de caldo BHI (Unipath) estéril. Los matraces se incubaron a 30°C/24h y en agitación (200 rpm). A continuación, los cultivos se centrifugaron (10.000 rpm/4°C/20 min.) y filtraron (0,45µm de diámetro de poro).

#### MÉTODO INMUNOLÓGICO

El filtrado obtenido fue utilizado para la detección de toxina mediante el *kit* inmunológico OXOID BCET RPLA (*Reversed Passive Latex Agglutination*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Unipath).

#### MÉTODO CITOTOXICOLÓGICO

El ensayo citotoxicológico para la detección cualitativa de toxinas de *Bacillus* spp. se basó en la valoración colorimétrica con *3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) del estado metabólico de la línea celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*) después de ser expuesta a la acción de la toxina.

La línea celular CHO fue incubada durante 72 horas en presencia de diluciones de los sobrenadantes de cultivos de *Bacillus* spp. preparados según se ha indicado previamente. El estado metabólico de la línea celular se valoró en base a la reducción de la sal de tetrazolio (MTT). El sobrenadante se consideró tóxico para la línea celular cuando (diluido al cuarto) causaba una reducción del 20% en la actividad metabólica.

#### EFFECTO DEL pH Y DEL NaCl SOBRE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y LA PRODUCCIÓN DE LECITINASA

En estos ensayos se utilizaron tres cepas, una patrón de *B. cereus* (NCDO, 1771) y dos aisladas por nosotros: una de ellas identificada como *B. subtilis* cepa 21 y otra como *B. pumilus* cepa 24.

Los medios utilizados para tal fin fueron los siguientes: a) caldo BHI, b) agar Nutritivo, c) agar *Blood Base* adicionado de sangre desfibrinada de caballo al 5% (agar Sangre de Caballo), y d) agar Nutritivo adicionado de yema de huevo al 10%, todos ellos de la firma Unipath.

Las cepas se sembraron en caldo BHI y se incubaron a 36°C durante 18 horas. Inóculos de 0,5 ml se añadieron a volúmenes de 10 ml de caldo BHI con glucosa (esterilizada por filtración y a una concentración final del 0,05%, pH 7,0) contenidos en matraces erlenmeyer de 250 ml. A estos cultivos, que se incubaron con agitación (200 rpm/ 36,5°C/ 24 h), se les adicionó 0,1 ml de NaOH 0,1N a las 3,5 y 4,5 horas de incubación, y se emplearon para investigar la actividad hemolítica y lecitinasa (a partir de ahora, se les denominará como caldo CT). También se llevó a cabo otro experimento en las mismas condiciones de trabajo pero el pH del caldo de cultivo inicial se ajustó a 5,0.

Para comprobar la tasa de crecimiento microbiano en los caldos CT tras las 24h de incubación a 36,5°C, se hicieron diluciones decimales en agua de peptona tamponada que se sembraron en la superficie de placas de agar Leche (Unipath) y se incubaron a 30°C durante 24 horas.

Las cinco series de experimentos realizadas se describen a continuación:

**Experimento I.** Siembra de 10 µl de caldo CT en placas de agar nutritivo conteniendo 0,36, 3, 5, 7, 8, 9 y 10% de NaCl.

**Experimento II.** Siembra de 10 µl de caldo CT en placas de agar sangre de caballo sin cloruro sódico y con las mismas concentraciones de NaCl que en el experimento I.

**Experimento III.** Siembra de 10 µl de caldo CT en placas de agar nutritivo con yema de huevo al 10% y con idénticas concentraciones de cloruro sódico a las del experimento anterior.

**Experimento IV.** Se filtraron 2 ml de caldo CT a través de filtros Millipore de 0,45µm de diámetro de poro y volúmenes de 50 µl del filtrado se depositaron en pocillos practicados en placas de agar sangre y agar nutritivo-yema de huevo adicionados de las concentraciones de sal utilizadas en los experimentos anteriores.

**Experimento V.** Tratamiento térmico del filtrado (60°C/2 min) siguiendo las indicaciones de James (1991) para comprobar si los compuestos producidos eran

inactivados por el calor. Los filtrados (una vez enfriados) se ensayaron como en el experimento IV.

Todas las placas se incubaron a 36,5 °C durante 24 horas, anotándose los resultados obtenidos. Se repitió la lectura a las 48 horas en las mismas condiciones de incubación.

Se realizó otra serie paralela de experimentos en las mismas condiciones de trabajo con la única salvedad de que la temperatura de obtención del caldo CT y de la incubación de las placas fue de 15°C, que es la temperatura media habitual en los procesos de elaboración y maduración-secado del chorizo de Cantimpalos.

A la vista de los resultados obtenidos para la cepa *B. cereus* NCDC 1771 en estas series de experimentos, se planteó un segundo grupo de estudios con el objeto de comprobar inicialmente diferentes aspectos: a) la producción de hemolisina y fosfolipasa C a diferentes pHs y concentraciones de NaCl, b) la capacidad de producción y excreción al medio de estas enzimas en las concentraciones de sal, pH y temperatura que se observan en los embutidos, así como c) intentar cuantificar la actividad lecitinasasa en esas condiciones por técnicas indirectas de espectrofotometría. Para ello se siguieron los esquemas de producción y purificación del enzima para *Bacillus cereus* propuestos por Zwaal y Roelofsen (*Methods in enzymology*, Vol. 32, pp. 154-161) y Ottolenghi (*Methods in enzymology*, Vol. 14, pp. 188-197). La cepa *B. cereus* NCDC 1771, se hizo crecer en un medio líquido cuya composición por litro de medio fue la siguiente: tripticasa, 3,6g (Unipath); glucosa 3,6g (Unipath); NaCl 3,6g (Panreac), y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac) 3,6g. Este caldo base se ajustó a dos pHs diferentes, 7,0 y 5,0. Asimismo, se adicionó cloruro sódico hasta alcanzar las concentraciones que se emplearon en los experimentos anteriores (3, 5, 7, 8, 9 y 10%). El medio se distribuyó en volúmenes de 200 ml en matraces erlenmeyer de 500 ml. La cepa de *B. cereus* se cultivó previamente en caldo BHI a pH 7 durante 17 horas a 37°C, tomándose 0,1 ml de este cultivo como inóculo. Las condiciones de incubación fueron de 17 horas a 37°C, con agitación de 200 rpm.

El substrato utilizado para comprobar la actividad lecitinasasa fue yema de huevo preparada en fresco de acuerdo al esquema propuesto por Zwaal y Roelofsen (técnica de Schmidt *et al.*, 1956). La medida espectrofotométrica se hizo a 540 nm de longitud de onda.

La actividad hemolítica se comprobó colocando 50 µl de los caldos en pocillos practicados en las placas de Petri conteniendo el medio agar Sangre de Caballo al 5% e incubándose a 30°C durante 24 horas.

INTERACCIÓN ENTRE CEPAS DE *Bacillus* spp. AISLADAS DE CHORIZO DE CANTIMPALOS Y CEPAS DE *B. cereus*

Para realizar esta prueba se siguió, básicamente, la técnica descrita por Sutherland y Murdoch (1994). Cada una de las 32 cepas aisladas de chorizo de Cantimpalos y las cepas patrón de *B. cereus* relacionadas en el cuadro siguiente se incubaron a 30°C durante 24 horas en caldo Nutritivo (Unipath).

---

---

Cepas patrón de *B. cereus* empleadas en los ensayos de interacción

<b>Cepa</b>	<b>Clave</b>	<b>Cepa</b>	<b>Clave</b>
<i>B. cereus</i> HRM-1	A	<i>B. cereus</i> PM-24	E
<i>B. cereus</i> HRM-45	B	<i>B. cereus</i> HRM-62	F
<i>B. cereus</i> HRM-3	C	<i>B. cereus</i> HRM-4	G
<i>B. cereus</i> PI-1	D		

Alícuotas de 100 µl de los caldos correspondientes a las cepas de *B. cereus* se sembraron por extensión en superficie en placas de agar Leche (Unipath). Éstas se dejaron a temperatura ambiente hasta que su superficie estuvo totalmente seca y, a continuación, se depositaron 10 µl de cultivo sin diluir de las cepas a ensayar. Cuando las placas se encontraron secas de nuevo, se procedió a incubarlas a 30 y 21°C hasta que se observó un perfecto desarrollo de las colonias de las cepas aisladas de chorizo. En ese momento se procedió a la lectura e interpretación de los resultados (presencia-ausencia de halos de inhibición).

## RESULTADOS

Tanto las cepas mesófilas como las psicrotrofas pertenecían a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*, que estaban presentes en las muestras obtenidas en las fases iniciales del proceso de fabricación y en el producto listo para el consumo.

Las 32 cepas mesófilas aisladas de los medios MSA y BP pertenecían a los géneros y especies que se recogen en la Tabla 1.

Las 14 cepas aisladas de VRBGA presentaban las siguientes características: no crecían a temperaturas bajas (5 y 10°C) y tampoco lo hacían a 55 y 65°C, no eran halotolerantes (10% NaCl), reducían los nitratos a nitritos, hidrolizaban la lecitina pero no presentaban la reacción característica de *B. cereus*, hidrolizaban el almidón, la caseína y la gelatina, eran Voges-Proskauer y catalasa positivas y crecían en condiciones de anerobiosis. Estas propiedades así como su morfología, tamaño y otras características de las colonias permitieron encuadrarlas en el Grupo I-B de Gordon. Su identificación (por procedimientos clásicos) correspondió a *B. subtilis* (8 cepas) y *B. thuringiensis* (6 cepas). Estas cepas no se estudiaron con el sistema miniaturizado.

**TABLA 1.** Géneros y especies a los que pertenecían 32 cepas mesófilas de bacilos esporulados aisladas de medios selectivos para *Micrococcaceae* (BP y MSA)

Género	Especie	Sistema de identificación			
		Miniaturizado		Clásico	
		cepas	%	cepas	%
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	15 <sup>a</sup>	46	23 <sup>a</sup>	72
	<i>B. pumilus</i>	7	22	4	12
	<i>B. licheniformis</i>	4	12	1	3
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3	9		
	<i>B. megaterium</i>	2	6		
	<i>B. badius</i>			1	3
	Int. <i>B. pumilus</i> - <i>B. licheniformis</i> <sup>b</sup>			3	9
<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	1	3		

<sup>a</sup>, núm. de cepas, <sup>b</sup>, comparten propiedades de ambas especies

Las 24 cepas aisladas de agar para Recuento en Placa (PCA) eran psicrotrofas y pertenecían al Grupo I-B de Gordon. Las especies a las que se adscribieron según el sistema de identificación utilizado se presentan en la Tabla 2.

Las Tablas 3 y 4 muestran la comparación entre el patrón bioquímico y fisiológico de las cepas identificadas por nosotros y los de las cepas tipo descritas en la bibliografía.

En la Tabla 5 se dan las características de posible interés tecnológico que presentaban las cepas de *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* aisladas.

En la Tabla 6 se comparan los resultados obtenidos al identificar las 44 cepas consideradas por procedimientos distintos (API 50CHB-20E y sistemas clásicos), mientras que en la Tabla 7 se muestra el número de cepas y el grado de identificación hallado cuando se aplicó el sistema miniaturizado tanto a las cepas aisladas de chorizo de Cantimpalos como a las cepas patrón o tipo incluidas en este estudio. En la Tabla 8 se dan los porcentajes de correspondencia entre los resultados del sistema clásico y del miniaturizado para los azúcares incluidos en las galerías API 50CHB, y en la Tabla 9 información similar relativa a los “azúcares diferenciadores” (Logan y Berkeley, 1984; Priest *et al.*, 1987). La Tabla 10 recoge las pruebas bioquímicas que presentaron una correspondencia inferior al 60%.

**TABLA 2.** Especies a las que pertenecían las cepas de bacilos esporulados aerobios y psicrotrofos aislados de PCA (24 identificadas por el sistema clásico y 12 por el sistema API)

Género	Especie	Núm. de cepas	%
<b>Sistema miniaturizado API 50CHB-20E</b>			
<i>Bacillus</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	5	41,7
	<i>B. licheniformis</i>	2	16,7
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	16,7
	<i>B. circulans</i>	1	8,3
	<i>B. cereus</i>	1	8,3
	<i>B. megaterium</i>	1	8,3
<b>Sistema clásico</b>			
<i>Bacillus</i>	<i>B. firmus</i>	17	72
	<i>B. thuringiensis</i>	6	24
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	1	4

La Figura 1 recoge el dendrograma resultante del análisis de taxonomía numérica. En la Tabla 11 se recogen las principales características que definen los 5 grupos formados por las cepas aisladas de chorizo de Cantimpalos a un nivel de semejanza del 81% ( $S_{SM}$ ) con el método de agrupamiento UPMGA, y en la Tabla 12 la distribución de las cepas de *Bacillus* spp. en los grupos resultantes del análisis numérico.

Un 42% de las cepas ensayadas mediante cultivos celulares presentaron actividad biológica frente a los mismos. Sin embargo, no se detectaron resultados positivos cuando las mismas cepas fueron ensayadas con el *test* inmunológico (RPLA).

En las Tablas 13 y 14 se muestra la distribución en especies y en los grupos resultantes de la taxonomía numérica de las cepas estudiadas en las pruebas de patogenicidad, así como los resultados de estas pruebas. De las cepas toxigénicas, el 69,23% correspondieron a *B. subtilis* y el 30,76 *B. pumilus* (Tablas 13 y 14).

En las Tablas 15 a 22 se presentan los resultados de los experimentos correspondientes a la influencia de diversos factores (NaCl, pH y sus combinaciones) en la actividad hemolítica y en la producción de lecitinasa por las cepas utilizadas para estos estudios (*B. subtilis* 21, *B. pumilus* 24, y *B. cereus* NCDC 1771).

Finalmente, en la Tabla 23 se recogen los resultados de los estudios de inhibición de las cepas mesófilas de *Bacillus* aisladas de chorizo de Cantimpalos sobre cepas toxigénicas de *B. cereus*.

**TABLA 3.** Comparación entre los patrones bioquímicos de las cepas de *Bacillus* psicrotrofas aisladas del chorizo de Cantimpalos y los perfiles bioquímicos de las cepas patrón

Prueba	Especie				
	<i>B. firmus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B.pumilus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
catalasa	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
anaerobiosis	+	+	+	+	+
VP		-	-	-	-
ácido de:					
L-arabinosa	+				-/+
D-xilosa	-/+	-	-	-	-
Caseína	-/+		-/+	-/+	-/+
Gelatina	-	-	-	-	-
Almidón	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Citrato	-/+	-/+	-	-	-
Tirosina		+		+	+
Reducción KNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	

---

**Bacilos aerobios esporulados**

-, resultado no coincidente con el patrón; +, resultado coincidente; -/+, resultado variable, coincidente o no dependiendo de la cepa considerada

---

**TABLA 4.** Comparación entre los patrones bioquímicos de las cepas de *Bacillus* mesófilas aisladas del chorizo de Cantimpalos y los perfiles bioquímicos de las cepas patrón

Prueba	Especie			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
VP	-/+			
ácido de:				
glucosa	-/+			
L-arabinosa		-	-	-
D-xilosa	-	-	-	+
manitol	+			
almidón		-/+		
citrato	-	-/+	-	
lecitinasa	+	-/+		
reducción KNO <sub>3</sub>		-/+		

-, resultado no coincidente con la cepa patrón; +, resultado coincidente con la cepa patrón; +/-, resultado variable en función de la cepa considerada

**TABLA 5.** Características bioquímicas y fisiológicas de posible interés tecnológico en las cepas de *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* aisladas de chorizo de Cantimpalos

Propiedad	Cepas mesófilas	Cepas psicrotrofas
Lecitinasa	58,69 <sup>a</sup>	0
Hidrólisis de caseína	100	8
Nitrato reductasa	80,43	4
Hidrólisis de almidón	89,1	60
Crecimiento en 7% NaCl	73,91	100
Crecimiento en 10% NaCl	69,56	100

<sup>a</sup>, porcentaje de cepas que presentaban la característica o actividad

**TABLA 6.** Comparación de los resultados obtenidos al identificar las cepas de *Bacillus* mediante sistemas clásicos y miniaturizado

Cepas mesófilas			Cepas psicrotrofas		
Especie	Cepas	%	Especie	Cepas	%
<b>Sistemas clásicos</b>					
<i>B. subtilis</i>	23 <sup>a</sup>	71,9	<i>B. firmus</i>	17	72
<i>B. pumilus</i>	4	12,5	<i>B. thuringiensis</i>	6	24
Int. <i>B. pumilus-licheniformis</i>	3	9,4	<i>P. larvae</i>	1	4
<i>B. licheniformis</i>	1	3,1			
<i>B. badius</i>	1	3,1			
<b>Sistema API 50CHB-API 20E</b>					
<i>B. subtilis</i>	15	46,9	<i>B. stearoothermophilus</i>	5	41,7
<i>B. pumilus</i>	7	22,9	<i>B. licheniformis</i>	2	16,7
<i>B. licheniformis</i>	4	12,5	<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	16,7
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3	9,4	<i>B. circulans</i>	1	8,3
<i>B. megaterium</i>	2	6,2	<i>B. cereus</i>	1	8,3
<i>Brevibacillus brevis</i>	1	3,1	<i>B. megaterium</i>	1	8,3

<sup>a</sup>, núm. de cepas adscritas a especie

**TABLA 7.** Número de cepas identificadas en cada grado de identificación al aplicar el sistema miniaturizado API 50CHB-API 20E para la adscripción a especie de cepas de *Bacillus*

Grado de identificación	Cepas		
	mesófilas <sup>a</sup>	psicrotrofas <sup>a</sup>	patrón
1 (0,999)	5	1	3
2 (0,990)	3	1	-
3 (0,900)	13	5	3
4 (<0,900)	11	5	4

<sup>a</sup>, aisladas de chorizo de Cantimpalos

**TABLA 8.** Correspondencia entre el sistema clásico y el sistema miniaturizado API 50CHB para los azúcares ensayados

Correspondencia (%)	Cepas		
	mesófilas <sup>a</sup>	psicrotrofas <sup>a</sup>	patrón
>80	28 <sup>b</sup>	32	33
60-80	7	4	7
<60	14	13	9

<sup>a</sup>, aisladas de chorizo de Cantimpalos; <sup>b</sup>, núm. de azúcares

**TABLA 9.** Porcentaje de semejanza para los azúcares diferenciadores (Logan y Berkeley, 1984; Priest *et al.*, 1987)

Azúcar	Cepas		
	mesófilas <sup>a</sup>	psicrotrofas <sup>a</sup>	patrón
Galactosa	70 <sup>b</sup>	91,6	63,6
Sorbitol	74,2	70	90,9
Inulina	67,7	75	100
Ramnosa	92,8	91,6	90,9
NAG	100	18,2	90,9
D-tagatosa	93,1	90,9	100

NAG, N-acetilglucosamina; <sup>a</sup>, aisladas de chorizo de Cantimpalos; <sup>b</sup>, porcentaje de cepas que presentaban el mismo resultado en el sistema clásico y en el miniaturizado

**TABLA 10.** Porcentaje de correspondencia entre los sistemas clásicos y el sistema miniaturizado API para pruebas con <60% de correspondencia

Prueba	Cepas		
	mesófilas <sup>a</sup>	psicrotrofas <sup>a</sup>	patrón
Amigdalina	50 <sup>b</sup>	11,1	50
Celobiosa			27,3
Salicina	56		54,5
Arbutina			20
2-KG <sup>c</sup>		0	9,09
D-xilosa	30	55,6	
MDG <sup>c</sup>	30	40	
Lactosa	44		
Glicina		25	10
L-arabinosa	33	41,7	
Ribosa		57,1	
Inositol	47,6	27,3	
Melibiosa	29,6	36,3	
NAG <sup>c</sup>		18,8	
ODC <sup>c</sup>			11,1
ADH <sup>c</sup>		37,5	
L-citrato			44,4
Ureasa		27,3	44
VP <sup>c</sup>	50	36,4	0

<sup>a</sup>, aisladas de chorizo de Cantimpalos; <sup>b</sup>, porcentaje de cepas que presentaban el mismo resultado en el sistema clásico y en el miniaturizado; <sup>c</sup>, 2KG, 2 ketogluconato; MDG, metil-D-glucósido; NAG, N-acetilglucosamina; ODC, ornitina descarboxilasa; ADH, arginina dehidrolasa; VP, prueba de Voges-Proskauer

**TABLA 1 1 .** Principales características que distinguen los grupos formados por las cepas aisladas de chorizo de Cantimpalos a un nivel de semejanza del 81% ( $S_{SM}$ ) con el método de agrupamiento UPGMA

Característica	Cluster					IS
	IA	IB	IC	II	III	
Microaerofilia	v	-	v	+	+	2
Lecitinasa	v	v	+	v	-	1
Crecimiento a 65°C	+	-	-	-	-	4
Ácido de:						
L-arabinosa	v	-	v	-	+	2
Ribosa	v	+	-	+	+	3
Sorbitol	+	+	v	-	-	4
Salicina	+	-	v	v	+	2
Rafinosa	v	+	-	v	v	1
Glucógeno	+	+	v	v	-	2
Hidrólisis de almidón	+	+	v	v	-	2
Hidrólisis de esculina	+	-	-	+	v	4

IS, Índice de Separación, resultado de multiplicar el número de grupos con resultados positivos por aquellos con resultados negativos (Sneath, 1978b). +, resultados positivos en >85% de las cepas; -, resultados positivos en <15% de las cepas; v, porcentaje de cepas con resultados positivos entre 15% y 85%

**TABLA 12.** Distribución de las cepas de *Bacillus* aisladas de chorizo de Cantimpalos (identificadas por métodos clásicos y sistema API) y las cepas patrón en los grupos formados en el análisis numérico a un nivel de similaridad del 81% ( $S_{SM}$ ) con el método de agrupamiento UPGMA

Cluster	Nº	Identificación			
		clásica	API	Siguiente API <sup>a</sup>	
I	IA	1	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
		2	<i>B. subtilis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. badius</i>
		11	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		21	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		29	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		30	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
		32	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
		10	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
		31	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
		I	IB	3	<i>B. subtilis</i>
25	<i>B. subtilis</i>			<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
5	<i>B. subtilis</i>			<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>
22	<i>B. subtilis</i>			<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
23	<i>B. subtilis</i>			<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>
I	IC	4	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
		16	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>
		9	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
		17	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>
		19	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
		20	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		6	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. licheniformis</i>
		7	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. megaterium</i>
		14	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>
II		15	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
		8	<i>B. licheniformis/B. pumilus</i> *	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>
		26	<i>B. licheniformis/B. pumilus</i> *	<i>B. pumilus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		12	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>
		24	<i>B. licheniformis/B. pumilus</i> *	<i>B. pumilus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		28	<i>B. licheniformis/B. pumilus</i> *	<i>B. pumilus</i>	<i>B. licheniformis</i>
III		27	<i>B. licheniformis/B. pumilus</i> *	<i>B. pumilus</i>	<i>B. licheniformis</i>
		13	<i>B. licheniformis/B. pumilus/B. subtilis</i> *	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>
Cepas patrón		18	<i>B. licheniformis/B. pumilus</i> *	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
		IV	<i>B. amyloliquefaciens</i> (1), <i>B. brevis</i> (1), <i>B. pumilus</i> (2)		
		V	<i>B. subtilis</i> (3)		
		VI	<i>B. cereus</i> (3), <i>B. thuringiensis</i> (2), <i>B. mycoides</i> (3)		
		VII	<i>B. megaterium</i> (3)		
VIII	<i>B. licheniformis</i> (3)				
IX	<i>B. badius</i> (1)				

<sup>a</sup>, siguiente identificación más próxima; \*, intermedio entre dos especies; (), núm. de cepas

**TABLA 13.** Formación de toxina por *Bacillus* spp. aislados de chorizo de Cantimpalos

Especie	Cepas ensayadas	% aislamientos positivos	
		Citotoxicidad	RPLA
<i>B. subtilis</i>	23	39	0
<i>B. pumilus</i>	7	57	14
<i>B. badius</i>	1	0	0

**TABLA 14.** Distribución de las cepas toxigénicas de *Bacillus* spp. en el dendrograma generado en los estudios de taxonomía numérica

Especie	Grupo			
	IA	IB	IC	II
<i>B. subtilis</i>	10 <sup>a</sup> , 30, 32	5, 22, 23	14, 16, 20	
<i>B. pumilus</i>				12, 24, 27, 28

<sup>a</sup>, identificación de la cepa (véase Tabla 12)

**TABLA 15.** Estimación de las poblaciones ( $\log_{10}$  ufc/ml) en los caldos CT en diferentes condiciones de trabajo

Cepa	Recuento log ufc/ml	
	CT pH 5 <sup>a</sup>	CT pH 7 <sup>a</sup>
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	8,89	8,30
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	8,89	9,10
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	9,50	9,14

<sup>a</sup>, crecimiento de las cepas en caldo BHI incubado a 200rpm/36,5°C/24h

**TABLA 16.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en el crecimiento de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 7,0)

Cepa	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	1 <sup>a</sup>	1	1	1	1	1	1
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	1	1	1	1	1	1
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	1	1	1	1	1	1

<sup>a</sup>, crecimiento o reacción positiva en las condiciones ensayadas

**TABLA 17.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en la actividad lecitinasas de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 7,0)

Cepa	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	1 <sup>a</sup>	1	1	0 <sup>b</sup>	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	1	1	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	1	1	1	0	0	0

<sup>a</sup>, reacción positiva; <sup>b</sup>, no crecimiento o reacción negativa en las condiciones ensayadas

**TABLA 18.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en la actividad hemolítica de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 7,0)

Cepas	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	1	1	1	2	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	0	1	1	0	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	1	2	2	0	0	0

0, no se desarrolla hemólisis; 1, hemólisis total; 2, hemólisis parcial

**TABLA 19.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en el crecimiento de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 5,0)

Cepa	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	1 <sup>a</sup>	1	1	1	1	0 <sup>b</sup>	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	1	1	1	1	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	1	1	1	1	1	0

<sup>a</sup>, crecimiento o reacción positiva en las condiciones ensayadas; <sup>b</sup>, no crecimiento o reacción negativa en las condiciones ensayadas

**TABLA 20.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en la actividad lecitinasas de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 5,0)

Cepa	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	1 <sup>a</sup>	1	1	0 <sup>b</sup>	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	1	1	1	1	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	1	1	1	1	1	1

<sup>a</sup>, reacción positiva; <sup>b</sup>, no crecimiento o reacción negativa en las condiciones ensayadas

**TABLA 21.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en la actividad hemolítica de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 5,0)

Cepa	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	1 <sup>a</sup>	1	1	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	1	0	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	1	1	1	1	1	1

0, no se desarrolla hemólisis; 1, hemólisis total; 2, hemólisis parcial

**TABLA 22.** Efecto de la concentración de cloruro sódico en las actividades hemolítica y lecitinasas de filtrados procedentes de *Bacillus* precultivados en caldo CT (pH 5,0)

Cepa	Concentración de NaCl (%)						
	0	3	5	7	8	9	10
<b>Actividad lecitinasas (filtrados calentados y no calentados)</b>							
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	0	0	0	0	0	0	0
<b>Actividad hemolítica en filtrado no tratado térmicamente</b>							
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	1	0	0	0	0	1	1
<b>Actividad hemolítica en filtrado tratado térmicamente</b>							
<i>B. cereus</i> NCDC 1771	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i> (cepa 21)	1	0	1	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i> (cepa 24)	0	0	0	0	0	0	0

0, no se desarrolla hemólisis o actividad lecitinasas; 1, hemólisis total; 2, hemólisis parcial

**TABLA 23.** Antagonismo entre las cepas mesófilas de *Bacillus* aisladas de chorizo de Cantimpalos y cepas tipo psicrotrofas de *B. cereus*

Especies	Cepa patrón de <i>B. cereus</i>						
	A	B	C	D	E	F	G
<i>B. subtilis</i> (16) <sup>a</sup>	9 <sup>b</sup>	9	9	11	11	12	15
<i>B. pumilus</i> (7)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brevi. brevis</i> (1)	1	1	1	1	1	1	1
<i>B. amyloliquefaciens</i> (3)	1	2	3	2	2	3	3
<i>B. megaterium</i> (2)	1	1	1	1	1	1	2
<i>B. licheniformis</i> (3)	1	2	2	3	2	2	3

<sup>a</sup>, número de cepas adscritas a especie; <sup>b</sup>, núm de cepas con actividad antagonica; A, HRM-1; B, HRM-45; C, HRM-3; D, PI-1; E, PM-24; F, HRM-62; G, HRM-4

## **DISCUSIÓN**

Los resultados hallados por nosotros ponen de manifiesto que la incidencia de bacterias aerobias esporuladas (*Bacillus* y otros géneros) presentes en chorizo no es despreciable (20% de los aislamientos de enterococos; 17,20% de los aislamientos de *Enterobacteriaceae*; 11,55% de los recuentos de bacterias acidolácticas; 22,83% de los aislamientos en agar de Baird Parker y 40% de la flora psicrotrofa), siendo además interesante el hecho de que a diferencia de lo señalado por Amo (1980) y Bacus (1984) en embutidos fermentados, las características organolépticas y sensoriales de los productos no indicaron en ningún momento modificaciones organolépticas indeseables.

Los trabajos dedicados al recuento y caracterización de este grupo de microorganismos en productos cárnicos no son abundantes. Ubach *et al.* (1988) citan el aislamiento de estos microorganismos, pero no proporcionan datos sobre los recuentos y especies a las que se adscriben. Otros autores como Sazanova (1988) y Libelt (1983, 1984) estiman la población de estos microorganismos en embutidos para extender entre

0,48 y 2,30 ( $\log_{10}$  ufc/g), no encontrando diferencias significativas entre las distintas estaciones del año ni entre fabricaciones. Berkel y Hadlok (1976) identificaron las especies de *Bacillus* aisladas de embutidos de hígado (alemanes), señalando a *B. subtilis*, con una incidencia de 37,6%, como la especie dominante, seguida en importancia por *B. pumilus* y *B. licheniformis*, datos que coinciden con los nuestros en cuanto a las especies aisladas e identificadas y al predominio de las mismas (grupo de cepas mesófilas). Palumbo *et al.* (1975) encontraron que *B. subtilis* era la especie mayoritaria en las especias mientras que Lat (1969) obtuvo niveles de entre 4 y 8  $\log_{10}$  ufc/g en salchichas enlatadas, señalando también a *B. subtilis* (74,3%) y *B. pumilus* (3,5%) como las especies dominantes.

En un trabajo más reciente, Encinas *et al.* (1996) estudiaron la evolución de este grupo microbiano durante la elaboración de chorizo y salchichón, identificando también a *B. subtilis* como la especie dominante a lo largo de todo el proceso y apreciando que existía un comportamiento característico en la relación y evolución de las formas vegetativas y las esporuladas.

Si las referencias bibliográficas acerca de las especies mesófilas de este género en carne y productos cárnicos son limitadas, aún es más reducida la información relativa a la flora esporulada psicrotrofa, que sin embargo ha sido y está siendo objeto de atención creciente en leche y productos lácteos (García Armesto *et al.*, 1994, 1996a; Rodríguez-Pérez *et al.*, 1994a, 1994b, 1994c, 1995; Sutherland y Murdoch, 1994; Rodríguez-Pérez, 1995; Bettie y Williams, 1999). En los análisis y estudios llevados a cabo por nosotros es importante destacar que las especies psicrotrofas fueron las mismas que las especies mesófilas, aunque su capacidad para utilizar diversos substratos (p. ej., caseína, gelatina, almidón, tirosina, lecitina) y para reducir los nitratos fue notablemente inferior.

En relación con su posible aptitud tecnológica en los embutidos fermentados crudos-curados, como ya se ha señalado en la introducción de este capítulo la bibliografía no aporta muchos datos, únicamente Redel *et al.*, (1969) señalan que se inocula "*B. mesenteroides niger*" con el fin de incrementar la actividad de las bacterias acidolácticas. Fayet (1991), en experimentos con leche, observó como determinados metabolitos (aminoácidos, péptidos de bajo peso molecular y enzimas) procedentes de filtrados de cultivos de *B. circulans* potenciaban la actividad acidificante de

“estreptococos” lácticos y de otras bacterias acidolácticas. Encinas *et al.* (1993) sugieren el potencial tecnológico de este grupo microbiano en la elaboración de embutidos fermentados crudos curados por razones tales como los altos recuentos que se alcanzan en las fases finales del proceso madurativo, su actividad proteolítica y lipolítica, su capacidad para reducir los nitratos a nitritos y para metabolizar hidratos de carbono complejos y otros compuestos, su resistencia a altas concentraciones de NaCl y su efecto beneficioso en relación con la actividad natural de las especias. Por otra parte, los autores citados (Encinas *et al.*, 1993) no apreciaron defectos en ninguna de las muestras estudiadas aunque el nivel de *Bacillus* fuera muy elevado.

A pesar de la escasa atención prestada a estas bacterias en productos cárnicos, la utilización de especies de *Bacillus* con diferentes fines tecnológicos en la obtención de otros alimentos y piensos está bien documentada. Así, algunas cepas se han empleado o recomendado como cultivos iniciadores para la elaboración de productos vegetales fermentados: *fufu* y *ogi* (Adegoke y Babalola, 1988; Mulyowidarso *et al.*, 1990). “*B. natto*”, cepa de *B. subtilis*, se utiliza como cultivo iniciador en la elaboración del *natto* (germen de soja fermentado). Otras cepas de *B. subtilis* se han seleccionado para la elaboración del *iru* en Nigeria (Aderibidge y Odunfa, 1990), y en las industrias panadera, cervecera y de alcoholes, jarabes y chocolates se utilizan enzimas como  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa,  $\beta$ -glucanasa, neutrasa o alcasa, que también tienen aplicación en la obtención de dulces y caramelos (Castro *et al.*, 1992; Melendo Lidón, 1997). Finalmente, *B. licheniformis* ha sido empleado en la elaboración de harinas de plumas para la alimentación de aves (Williams y Shih, 1989).

Las cepas aisladas por nosotros presentaron algunas propiedades degradativas (capacidad nitrato reductasa, actividad proteolítica y lipolítica, Tabla 5) que sugieren su posible participación en los fenómenos que tienen lugar en embutidos fermentados crudos-curados durante su proceso de elaboración y maduración-secado, ya que tanto la reducción de los nitratos como la actividad proteolítica y lipolítica son interesantes. Esta última podría contribuir a la aparición de compuestos más sencillos que, a su vez, podrían ser utilizados por otros microorganismos como las bacterias acidolácticas o las micrococáceas y que participarían en el buqué del producto final. Por otra parte, la importancia de la reducción de nitratos es bien conocida. En este estudio, el 80,43% de las cepas mesófilas redujeron activamente los nitratos, el 100% hidrolizaron la caseína,

el 89,1% el almidón y el 58,69% la lecitina (Tabla 5). Las cepas aisladas por Encinas (1993), mayoritariamente mesófilas, poseían mayor actividad, ya que el 90% redujeron los nitratos rápidamente, el 97,1% hidrolizaron el almidón y la totalidad de las cepas hidrolizaron la yema de huevo. El autor mencionado también sugiere el interés tecnológico de sus cepas aunque matizando que sería preciso investigar si estas propiedades detectadas en condiciones experimentales se mantienen en los procesos de fabricación.

En nuestro caso, es interesante recordar que si bien las cepas psicrotrofas manifestaron un patrón hidrolítico menos activo, eran muy halotolerantes ya que todas ellas crecían en presencia de concentraciones elevadas de sal (7 y 10%). Como en el caso de Encinas (1993), pensamos que se podría considerar la posible utilización de ciertos bacilos aerobios esporulados como cultivos iniciadores en la elaboración del chorizo de Cantimpalos, aunque es evidente que previamente se debería comprobar su actividad en situaciones reales, siendo, además, imprescindible proceder a la caracterización e identificación fiable de las cepas seleccionadas y comprobar que éstas carecen de poder patógeno por sí mismas o sus productos. Finalmente, sería necesario determinar la concentración de células vegetativas y/o esporos necesarios para conseguir un producto uniforme y de calidad.

Otro de los objetivos de este trabajo fue la comparación de sistemas de identificación/clasificación: clásicos, miniaturizados API 50CHB y API 20E, y taxonomía numérica. Es conocida la dificultad que entraña la clasificación de este grupo debido a su carácter heterogéneo. Asimismo, muchas de las especies están pobremente definidas y hay una considerable variación fenotípica, incluso entre las cepas de especies bien establecidas (Sullivan *et al.*, 1987). Esta diversidad se pone de manifiesto en la variación del contenido en G+C de su ADN (entre el 32 y 69%), así como en la variedad de fenotipos intermedios entre distintas especies (Wisotzkey *et al.*, 1992).

Se han propuesto y utilizado un gran número de pruebas, tablas y claves para caracterizar e identificar las cepas de *Bacillus*, pero en muchas ocasiones es difícil la adscripción a una especie concreta y, con frecuencia, los resultados obtenidos al aplicar varios sistemas no son comparables. Entre las claves y tablas basadas en propiedades fenotípicas investigadas por técnicas convencionales tenemos las de Gordon *et al.* (1973), Kramer *et al.* (1982), Norris *et al.* (1981), Claus y Berkeley (1986) y Priest *et al.*

(1987). También se han recomendado métodos rápidos como los descritos por Logan y Berkeley (1984). En este caso se trata de la utilización conjunta de dos sistemas miniaturizados, API 50CHB y API 20E (API System, Biomérieux, Vercieu, Francia). Del primero se utilizan los 49 azúcares incluidos y del segundo sólo 12 pruebas bioquímicas. Asimismo, se han recomendado métodos rápidos instrumentales como el Biochemical Card Vitek (Vitek System, Saint Louis, Missouri, USA).

En muchas ocasiones el empleo de claves dicotómicas pueden originar resultados erróneos. Así Logan y Berkeley (1982) coinciden con Sneath y Sokal (1973) al indicar que en estudios taxonómicos de cepas fenotípicamente muy relacionadas, como es el caso del grupo *B. subtilis*-*B. megaterium*, no es adecuado utilizar claves dicotómicas y polivalentes. Además, hay que recordar la variedad intraespecífica previamente mencionada. Tratando de evitar, en lo posible, estos problemas se han llevado a cabo estudios de taxonomía numérica (Gil *et al.*, 1986, Fritze *et al.*, 1990) y de biología molecular (Ash *et al.*, 1991). Precisamente, la diversidad observada y los dendrogramas obtenidos a partir de los estudios del material genético han sido decisivos a la hora de proponer nuevos géneros como *Alycyclobacillus*, cuyas especies también se diferencian por otras propiedades como es su composición específica en lípidos  $\omega$ -alicíclicos.

En la Tabla 6 se presentan las especies halladas por nosotros al identificar las cepas mediante pruebas y esquemas clásicos y aquéllas que resultaron de la utilización de los sistemas miniaturizados (Logan y Berkeley, 1984). Como puede apreciarse en la Tabla 7, sólo cinco de las cepas mesófilas presentaron, de acuerdo con los datos del sistema miniaturizado, un grado de identificación 1 (0,999 de semejanza) y se adscribieron a *B. pumilus*, tres se identificaron como *B. subtilis* con un grado de identificación 2 (0,990) y las restantes presentaban grados inferiores de identificación. En el caso de las cepas psicrotrofas, sólo una obtuvo el máximo grado de identificación y se adscribió a *B. stearothermophilus*, mientras que otra, con grado de identificación 2, lo fue a *B. amyloliquefaciens*. Las puntuaciones del resto fueron inferiores. Cuando el sistema de identificación se aplicó a las cepas patrón, los resultados fueron sorprendentes, ya que únicamente tres de las diez cepas incluidas en el estudio alcanzaron un grado de identificación 1 (Tabla 7). Este último hallazgo podría explicar las discrepancias observadas al identificar nuestras cepas por ambos métodos (Tabla 6),

siendo la diferencia especialmente llamativa en el caso de las cepas psicrotrofas (Tablas 2 y 6). Las Tablas 8, 9 y 10 ponen de manifiesto que, aunque en algunas de las pruebas (especialmente en la utilización de ciertos hidratos de carbono como tagatosa y ramnosa) los resultados eran coincidentes para un porcentaje elevado de las cepas, en otros, como la producción de acetoina, las diferencias llegaban a ser muy importantes, especialmente en el grupo de las cepas patrón. Datos similares fueron hallados por Encinas *et al.* (1996) en cepas aisladas de diferentes embutidos españoles.

Cuando se realizó el análisis de taxonomía numérica de las 32 cepas de *Bacillus* spp. y las 22 cepas de referencia (Figura 1, Tabla 12), se observó como el dendrograma generado estaba constituido por nueve grupos considerando un nivel de similaridad del 80% ( $S_{SM}$ ). De éstos, los denominados I, II y III corresponden a las cepas aisladas de chorizo de Cantimpalos, y el resto a las cepas de referencia. Ninguna de éstas quedó incluida en los grupos de las cepas aisladas de chorizo. Por otra parte dentro del grupo más numeroso (I), a un nivel de semejanza del 81% se forman tres subgrupos (IA, IB y IC).

Es interesante destacar que las cepas aisladas de chorizo identificadas como *B. pumilus* (sistema API) quedan englobadas en el grupo II, salvo una que se agrupa en el III, mientras que el grupo IB recoge únicamente cepas de *B. subtilis*. Los otros tres grupos englobaban cepas aisladas de chorizo de diferentes especies.

Los grupos del IV al IX agrupan a las cepas patrón. Los denominados grupos V, VII, VIII y IX agrupan a una única especie, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. badius*, respectivamente. Sin embargo, el análisis numérico no fue capaz de separar las cepas de referencia correspondientes a *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides* en las condiciones de nuestro estudio.

En relación con la patogenicidad de las cepas de *Bacillus* spp. analizadas es preciso señalar que el ensayo de citotoxicidad fue el método más sensible para la detección de toxinas (Tabla 13), y aproximadamente un 42% de las cepas ensayadas mediante cultivos celulares presentaron actividad biológica frente a los mismos. Sin embargo, no se detectaron resultados positivos cuando las mismas cepas fueron ensayadas con el *test* inmunológico. Esta circunstancia también fue señalada por Chistianson (1993) en estudios sobre la producción de toxina por *B. cereus* en leche, observando la ausencia de correlación entre el contenido en toxina y la citotoxicidad.

De las cepas de *B. subtilis* y *B. pumilus* ensayadas, el 39 y 57% respectivamente, fueron toxigénicas. Estos resultados indican que una proporción significativa de cepas de *Bacillus* spp. distintas de *B. cereus* presentan en alguna medida carácter patógeno, siendo interesante en un futuro profundizar en el estudio de los factores que inciden sobre la expresión de este carácter en las condiciones habituales de elaboración y maduración de estos derivados cárnicos. Las cepas de *B. subtilis*, se reparten por igual entre los tres subgrupos del estudio numérico correspondientes a dicha especie (Tabla 14).

Los estudios de Beattie y Williams (1999) también ponen de manifiesto el porcentaje importante de cepas toxigénicas de *B. subtilis* (70%), y Griffiths (1990), usando el *test* RPLA, demostró el carácter toxigénico de otras especies de *Bacillus* como *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. polymyxa* y *B. carotarum*.

La toxigenicidad de *B. cereus* y de otras especies de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus* está bien demostrada (Tabla 24), habiéndose purificado y caracterizado total o parcialmente algunos de los compuestos responsables de esta actividad.

**TABLA 24.** Toxinas producidas por algunas especies de bacilos esporulados aerobios (Granum, 1997)

<b>Especie</b>	<b>Toxina</b>
<i>Paenibacillus alvei</i>	Alveolisina
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Laterosporolisina
<i>B. anthracis</i>	Toxina del anthrax
<i>B. pumilus</i>	Citotoxina
<i>B. sphaericus</i>	Toxina larvicida
<i>B. subtilis</i>	Surfactina

En este estudio no se aisló ninguna cepa de *B. cereus* ya que la identificada como tal por el sistema API no se confirmó al emplear sistemas convencionales. Sin embargo, sí se detectaron cepas de otros géneros y especies que podrían tener importancia en salud pública. Considerando que ciertas propiedades como la actividad hemolítica y la producción de fosfolipasa C se han asociado con patogenicidad (Varnam y Evans, 1991), se ha investigado el efecto de diversos factores (pH, concentración de

NaCl y temperatura) sobre ambos caracteres, tanto en dos cepas aisladas por nosotros (*B. subtilis* 21 y *B. pumilus* 24) como en una cepa patrón de *B. cereus* (NCDC 1771).

Como puede apreciarse en las Tablas 16 a 18, a pH 7, concentraciones de hasta el 10% NaCl no impedían el crecimiento de las cepas de *Bacillus* aunque sí afectaban a la actividad hemolítica, que, salvo en el caso de *B. pumilus* era inhibida por concentraciones superiores al 7%, y a la producción de lecitinasa, que lo era a concentraciones del 5-7%. A pH 5, la presencia de sal era algo más inhibidora para el crecimiento, afectando de manera distinta, según la cepa, a las propiedades investigadas. En general, la cepa de *B. pumilus* fue menos afectada por estas condiciones (Tablas 19 a 21). En cuanto a la actividad lecitinasa (fosfolipasa C) debemos señalar que el aspecto de la reacción era diferente según se tratase de *B. cereus* o de las otras cepas estudiadas. Así, en estas últimas, se manifestaba por un único halo mientras que en la primera se producían dos halos concéntricos, siendo el interior opaco y el exterior de aclaramiento completo.

En el caso de los filtrados, ninguno mostró actividad lecitinasa lo que sugiere que esta propiedad no es extracelular y todos poseyeron actividad hemolítica aunque sólo en el caso de *B. pumilus* era termoestable (Tabla 22).

En las condiciones en las que se realizó la segunda serie de experimentos para comprobar la influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y la producción de hemolisina y lecitinasa por la cepa de *Bacillus cereus* NCDC 1771 se comprobó que fue capaz de crecer en el rango de concentraciones de NaCl estudiadas (entre 0,36 y 10% de NaCl), pero solamente produjo o manifestó actividad lecitinasa detectable en concentraciones inferiores al 3%. La misma cepa sólo fue capaz de crecer a pH 5 en concentraciones de cloruro sódico inferiores al 3% y únicamente desarrolló actividad lecitinasa en ausencia de NaCl. En los ensayos realizados sobre filtrados de esta cepa, solamente en el filtrado procedente del crecimiento en caldo con 9% de NaCl y pH 7,0 presentó una hemólisis  $\alpha$  parcial, mientras que desarrolló hemólisis  $\beta$  total en presencia del 0,36% de cloruro sódico y a pH 5,0. En ninguno de los filtrados se observó actividad lecitinasa.

Otro de los objetivos fue comprobar el efecto antagónico entre las cepas mesófilas de *Bacillus* y las cepas psicrotrofas del mismo género. Para ello se siguieron los esquemas de trabajo descritos por Sutherland y Murdoch (1994) en estudios

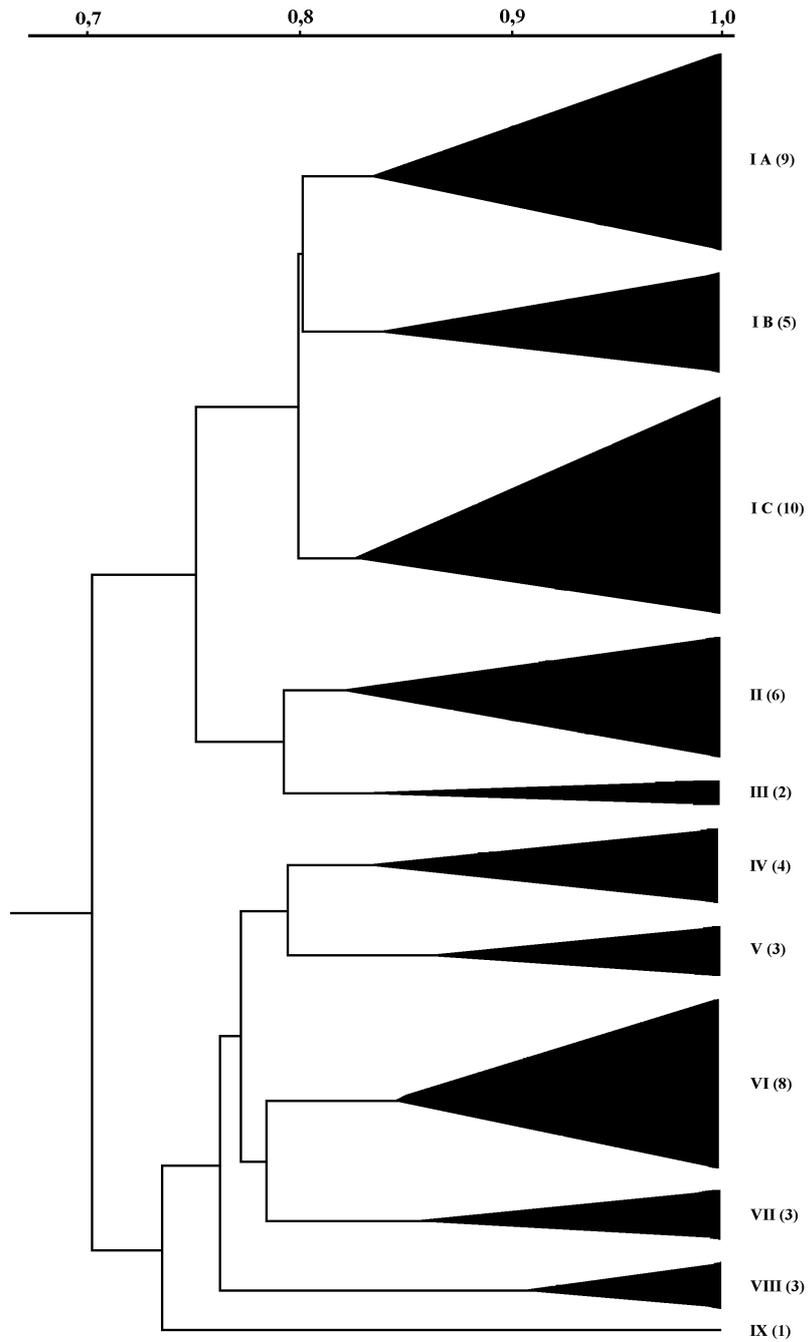
realizados sobre especies aisladas de leche cruda. Este estudio se consideró, a pesar de que ninguna de las cepas aisladas se adscribió definitivamente a *B. cereus*, (que, sin embargo, es un contaminante habitual de las especias, Gerhardt, 1975), a la vista de que en leche cruda Sutherland y Murdoch (1994) habían comprobado el mencionado efecto antagónico entre algunas de las especies de *Bacillus*. Además, en los lotes por nosotros estudiados, la masa permanecía un tiempo variable en condiciones de refrigeración (hasta 4 días en la industria B). En estas condiciones las especies o cepas psicrotrofas de *B. cereus* podrían multiplicarse. Si bien directamente no se investigó específicamente la presencia de *B. cereus*, sí es cierto que en el estudio al azar no se aisló ninguna cepa de esta especie. Encinas (1993), que investigó la presencia de *Bacillus* spp y *B. cereus* en chorizo, tampoco detectó cepas de *B. cereus*.

De las 32 cepas ensayadas en el estudio antagónico solamente 7 no manifestaron ningún efecto sobre las cepas de referencia utilizadas. Estas cepas correspondían a la especie *B. pumilus*. Tres cepas identificadas como *B. subtilis* y una como *B. amyloliquefaciens* sólo manifestaron efecto antagónico frente a *B. cereus* HRM-4; 13 cepas presentaron efecto antagónico frente a la totalidad de las cepas consideradas y el resto (8 cepas) mostraron un efecto inhibitor variable (Tabla 23). Es preciso señalar que de las 7 cepas de *B. subtilis* que presentaron efecto citotoxigénico, sólo cinco cepas (5, 16, 20, 22 y 23) presentaron efecto antagónico. Ello se traduce en que el 78,12% de la población de *Bacillus* mesófilos aislados de chorizo de Cantimpalos tiene efecto antagónico y el 40,62% de la misma población es citotóxica. Dos de las cepas de *B. licheniformis* (14 y 32) manifestaron efecto antagónico y citotoxigénico.

Los resultados expuestos coinciden con los señalados por Sutherland *et al.* (1994) en estudios de leche cruda, que señalaron que *B. subtilis* presenta mayor efecto antagónico que *B. licheniformis*. Ello es importante si se tiene en cuenta que esta especie (*B. subtilis*) fue la mayoritaria dentro de este grupo en los embutidos estudiados y también en otros embutidos fermentados crudos curados (Encinas, 1993). La naturaleza de los factores responsables de este efecto antagónico se desconoce, si bien se sabe que *B. subtilis* produce metalo y serin proteasas y el antibiótico *mycobacillin* (Priest, 1989). *B. licheniformis* también produce el antibiótico bacitracina y proteasas (Katz y Demain, 1977; Priest, 1989). Estos factores y otros no descritos o caracterizados podrían

contribuir al control de *B. cereus* y otras especies de *Bacillus* u otros microorganismos patógenos o alterantes no deseables.

**FIGURA 1.** Dendrograma resultante del análisis numérico de 32 cepas de *Bacillus* aisladas de chorizo de Cantimpalos y 22 cepas patrón del mismo género. El agrupamiento se realizó mediante el método UPGMA (coeficiente de semejanza  $S_{SM}$ )



( ), núm. de cepas incluidas en el grupo

### Conclusiones

Primera. El chorizo de Cantimpalos,...

Segunda. Los parámetros...

Tercera. *Lactobacillus curvatus* subsp  
*curvatus*...

Cuarta. La evolución cuantitativa

Quinta. Las levaduras presentes ...

Sexta. Las enterobacterias

Septima

Novena...

## CAPÍTULO 10.

## CONCLUSIONES



**PRIMERA.-** El chorizo de Cantimpalos comercializado en España presenta una composición química en cuanto a parámetros mayoritarios equivalente a la mayor parte de los chorizos curados comercializados en nuestro país, situándose entre los de mayor contenido en grasa.

**SEGUNDA.-** Combinaciones de parámetros relacionadas con el grado de desecación, la calidad y la cantidad de las proteínas, el contenido en carne y el contenido en sal permiten diferenciar con gran claridad los distintos modos de elaborar el chorizo de Cantimpalos.

**TERCERA.-** *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* y, en menor medida, *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus* constituyen la flora acidoláctica responsable de la obtención del chorizo de Cantimpalos. Cepas de ambas especies y de *Pediococcus* son capaces de inhibir, en condiciones experimentales, bacterias patógenas tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Puesto que en los ensayos de inhibición se eliminaban los efectos debidos al ácido y al peróxido de hidrógeno, cabe la posibilidad de que su actividad antimicrobiana esté relacionada con la producción de metabolitos secundarios del tipo de los “compuestos inhibidores similares a bacteriocinas”.

**CUARTA.-** La evolución cuantitativa de las micrococáceas, especialmente en las primeras fases, no se ajustó al patrón generalmente observado en embutidos artesanales fermentados a bajas temperaturas. Este hecho no parecía estar relacionado con el comportamiento de las BAL ni con el desarrollo de la acidez. Sin embargo, a pesar de la gran heterogeneidad de la flora presente en la masa, los géneros y especies presentes al final de la maduración sí que mayoritariamente correspondían a los implicados en la obtención de estos productos.

**QUINTA.-** Las levaduras presentes en el chorizo de Cantimpalos pertenecen mayoritariamente a la especie *Candida zeylanoides* y, en menor medida, a *Debaryomyces hansenii*. Salvo por su falta de actividad proteolítica, la población aislada se caracterizó por poseer propiedades de presumible interés tecnológico.

**SEXTA.-** En chorizo de Cantimpalos, las enterobacterias disminuyen cuantitativamente durante el proceso de elaboración, asociándose este hecho al descenso del pH y de la  $a_w$ . Sin embargo, el mantenimiento de la masa durante tres días a 1°C parece favorecer su multiplicación posiblemente debido a valores altos de pH y a la capacidad de las cepas de origen cárnico para multiplicarse a bajas temperaturas. La elevada capacidad descarboxilante de las cepas estudiadas no aconseja esta práctica. Desde el punto de vista sanitario, las condiciones en las que se realiza la fabricación del chorizo de Cantimpalos parecen ser suficientemente eficaces para garantizar la ausencia de *Enterobacteriaceae* patógenas como *Salmonella* y *Yersinia*. Por otra parte, la metodología analítica para la investigación de *Enterobacteriaceae* y la detección de *Yersinia* y *Salmonella* en este tipo de productos es susceptible de importantes mejoras, ya que una gran variedad de microorganismos presentes en el chorizo y no pertenecientes a estos grupos microbianos se desarrolla en los medios habitualmente empleados.

**SEPTIMA.-** Los enterococos no se multiplican activamente durante la fabricación de chorizo de Cantimpalos. Tampoco las especies dominantes en la masa (*Enterococcus casseliflavus*) son las asociadas habitualmente con los alimentos de origen animal aunque al avanzar el proceso, tienden a desaparecer y, al menos en algunos casos, son sustituidas por *Enterococcus faecium*. La capacidad de cepas de esta especie para producir compuestos inhibidores de *Listeria* se han confirmado en este trabajo aunque su posible utilidad como cultivos protectores debe ser cuidadosamente evaluada teniendo en cuenta su capacidad descarboxilante y su potencial virulencia.

**OCTAVA.-** La flora psicrotrofa que se desarrolla durante la elaboración y maduración de chorizo de Cantimpalos está casi exclusivamente constituida por bacterias Gram-positivas pertenecientes, mayoritariamente, al género *Bacillus* y al grupo de bacterias acidolácticas. Otros géneros de bacterias Gram-positivas asociadas con carne y productos cárnicos como *Kurthia* y *Brochothrix* están también presentes, especialmente en el producto final. La escasa actividad proteolítica y lipolítica de esta población sugiere que su participación en la alteración o en ciertos fenómenos beneficiosos es muy poco probable. En la vertiente sanitaria, nuestros resultados indican que el proceso de

elaboración del chorizo de Cantimpalos parece eficaz para inactivar ciertas bacterias patógenas psicrotrofas como *Aeromonas* y *Listeria*.

**NOVENA.-** Durante los procesos de elaboración de chorizo de Cantimpalos la población de *Bacillus* constituye una proporción muy estimable de la flora mesófila y psicrotrofa, siendo *Bacillus subtilis* la especie mayoritaria. Tanto sus propiedades enzimáticas y fisiológicas como su carácter antagónico frente a cepas de *Bacillus cereus* sugieren la posible utilidad tecnológica de algunas cepas. Sin embargo, el carácter citotóxico de buena parte de las cepas, así como el desarrollo de la actividad lecitinasa y hemolítica en condiciones de pH y NaCl propias de este embutido obligan a una caracterización patogénica previa a su empleo.



### BIBLIOGRAFÍA

Anónimo (1977). aditivos alimentarios...

Acton, J.C. and Dick, R.L. (1976)...

Bacus, J.N. (1984)...

Baird-Parker, A.C. (1979)...

Campbell-Platt, G. (1987). Fermented foods of the World...

Doyle, B.M. (1989). Foodborne bacteria pathogens...

Gordon *et al.*, (1973). The genus *Bacillus*...

Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria...

## BIBLIOGRAFÍA



- Adegoke, G.O. and Babalola, A.K. (1988). Characteristics of microorganisms of importance in the fermentation of fu-fu and ogi -two: Nigerian foods. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 449-453.
- Aderibigbe, Y.E. and Odunfa, S.A. (1990). Growth and extracellular enzyme production by strains of *Bacillus* species isolated from fermenting African locust bean, iru. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 662-671.
- Aguirre, M. and Collins, M.D. (1992). Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 401-405.
- Alexander, E.R., Boose, J., Davis, M., Kirchner, L., Osaki, C. and Tanino, T. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami-Washington and California, 1994. *Morb. Mortal. Weekly Rep.*, **44**, 157-160.
- Alonso-Calleja, C. (1991). "Estudio microbiológico del queso de cabra de Valdeteja (León). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones. Universidad de León. León.
- Amo, A. (1980). "Industria de la carne, salazones, chacinera". Aedos. Barcelona.
- Anónimo (1979). Métodos de análisis de productos cárnicos. *B. O. E.*, **207**, 20233-20240.
- Anónimo (1980). Norma de calidad para los productos cárnicos embutidos crudos-curados en el mercado interior. *B. O. E.*, **70**, 6280-6285.
- Anónimo (1983). "Catálogo de embutidos de España". M.A.P.A. Secr. Gen. Téc. del M.A.P.A.. Madrid.
- Anónimo (1983). Agricultura Canada. Meat hygiene manual curing 4.9.3. *Food Production and Inspection Branch, Ottawa, Ontario*
- Anónimo (1984). "Standard methods for the microbiological examination of foods" 2nd. American Public Health Association (APHA). American Public Health Association (APHA). Washington, D.C..
- Anónimo (1984a). UV-methods for the determination of L-lactic acid in foodstuffs and other materials. In "Methods of enzymatic food analysis". 33-34. Anonymous. Boehringer Mannheim. Mannheim.
- Anónimo (1986). Lista positiva de aditivos y otros productos para uso en la elaboración de los productos cárnicos embutidos crudos-curados y para tratamiento de superficie de los mismos. *B. O. E.* **38**,

Anónimo (1987). Baird-Parker agar. Pharmacopoeia of culture media for food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **5**, 197-199.

Anónimo (1989). "Iso-Grid<sup>R</sup> methods manual". Iso-Grid. 3rd. Iso-Grid. Toronto.

Anónimo (1995a). Center for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O157: H7 outbreak linked to commercially distributed dry cured salami. Washington and California, 1994. *Morb. Mortal. Weekly Rep.* **44**, 157-160.

Anónimo (1995b). Center for Disease Control and Prevention. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111: MN South Australia 1995. *Morb. Mortal. Weekly Rep.* **44**, 550-551-550-557.

Anónimo (1997a). "Anuario de estadística Agraria". M.A.P.A. Secre. Gen Téc. M.A.P.A.. Madrid.

Anónimo (1997b). Lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (R.D. 145/1997). *B.O.E.*, **187**

Arihara, K., Cassens, R.G. and Luchansky, J.B. (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 123-134.

Armengol, M.R., Vilalta, N., Bota, E. and Sancho, J. (1994). Evolución de la flora microbiana del fuet de la comarca de Osona. *Alimentaria*, **noviembre**, 29-32.

Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D. (1991). Phylogenetic of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.*, **13**, 202-206.

Ash, C., Priest, F.G. and Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie von Leeuwenhoek.*, **64**, 253-260.

Askar, A. and Trepton, H. (1989). Biogenic amines in meat products. *Ernaehrung.*, **13**, 425-429.

Axelsson, L.P. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In "Lactic acid bacteria". 1-62. Salminen, S. and von Wright, A. Marcel Dekker, Inc.. New York.

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocina A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1676-1682.

Bacus, J.N. (1984). "Utilization of microorganisms in meat processing. A handbook for meat plant operators". Research Studies Press. Letchworth, England.

Bacus, J.N. (1986). Fermented meat and poultry products. In "Advances in meat research. Meat and poultry microbiology". 123-164. Pearson, A.M. and Dutson T.R. Macmillan Publishers Ltd.. Basingstoke.

Bacus, J.N. and Brown, W.L. (1981). Use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.*, **35**, 74-78.

Baird-Parker, A.C. (1979). Methods for identifying staphylococci and micricocci. In "Identification methods for microbiologists". 201 Skinner, F.A. and Lovelock, D.W. Academic Press. London.

Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M. and Schleifer, K.H. (1992). "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications". Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., and Schleifer, K.H. Springer Verlag. New York.

Banks, J.G. and Board, R.G. (1987). Yeasts and moulds from chilled foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **4**, 197-206.

Bantleon, A.D. (1987). "*Lactobacillus sake* und *Lactobacillus curvatus* als starterorganismen für die Rohwurstreifung. Tesis Doctoral". Universität Hohenheim. Hohenheim

Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (1985). "Yeasts identification program. Cambridge Micro software". Cambridge University Press. Cambridge, England.

Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (1990). "Yeasts: characteristics and identification" 2nd. Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D. Academic Press. New York.

Barranco, A. (1984). "Maduración del chorizo en condiciones naturales". Tesina de Licenciatura, Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba.

Battistotti, B., Bottazzi, V. and Vola, G. (1977). Impiego of *Streptococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e bacilli lattici nella caseificazione del fromaggio Fontina. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, **28**, 331-341.

Bauer, F., Seus, I., Paulen, P. and Valis, S. (1994). The formation of biogenic amines in meat and meat products. *Proc. 40th Int. Congress Meat Sci. and Technol.*, **25**, 1-3.

Beatti, S.H. and Williams, A.G. (1999). Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 221-225.

Bello, J. and Sánchez-Fuertes, M.A. (1995). Application of a mathematical model for the inhibition of *Enterobacteriaceae* and clostridia during sausage curing process. *J. Food Protect.*, **58**, 1345-1350.

- Berkel, H. and Hadlok, R. (1976). Differentiation and species distribution of bacteria on the genus *Bacillus* found in frankfurters and liver type sausages. *Fleischwirtschaft.*, **56**, 387-392.
- Bonde, G.J. (1975). The genus *Bacillus*. *Danish Med. Bull.*, **22**, 41-61.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L., and Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meats and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**, 103-120.
- Brenner, D.J. (1992). Introduction to the family *Enterobacteriaceae*. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications". 2673-2695. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. Springer Verlag. New York.
- Buncic, S. and Smiljanic, D. (1990). Biogenic amines in meat and meat products. *Technol. Mesa.*, **31**, 60-66.
- Buzzini, P. and Haznedari, S. (1995). Caratterizzazione di lieviti isolati da insaccati fermentati prodotti in Umbria. Valutazione preliminare della loro attivita proteolitica e lipolitica. *Industrie Alimentari.*, **30**, 620-625.
- Campbell-Platt, G. (1987). "Fermented foods of the World. A dictionary and guide". Butterworths. London.
- Campbell-Platt, G. (1995). Fermented meats, a world perspective. 39-52. En "Fermented meats". Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. Blackie Academic and Professional. Glasgow.
- Carry, W.E. (1916). The bacterial examination of sausages and its sanitary significance. *Amer. J. Pub. Health.*, **6**, 124-135.
- Cassens, R.G. (1990). "Nitrite-cured meat. A food safety issue in perspective" 1st. Cassens, R.G. Food and Nutrition Press, Inc.. Trumbull, Connecticut.
- Castro, G.R., Grcía, G.F. and Siñeriz, F. (1992). Extracellular isoamylase produced by *Bacillus circulans* MIR-137. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 520-523.
- Charney, J.C., Fischer, W.P. and Hegarty, C.P. (1951). Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J. Bacteriol.*, **62**, 145-148.
- Chen, M.T. and Guo, S.L. (1992). Studies on the microbial flora of Chinese-style sausage. 2. Action of selected organisms isolated from Chinese-style sausage on porcine muscle proteins. *Fleischwirtsch.*, **72**, 1126-1128.
- Christiansson, A. (1993). Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus*: a comparison of methods for toxin detection. *Bull. Int. Dairy Fed.*, **287**, 54-59.

- Cid, C., Iriarte, J., Astiasarán, I. and Bello., J. (1989). Estudio sobre la calidad nutritiva de la chistorra.. *Alimentaria*, **enero-febrero**, 39-41.
- Cintas, L.M., Rodríguez, J.M., Fernández, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernández, P.E. and Holo, H. (1995). Isolation and characterization of Pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2643-2648.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1982. In "Bergey's manual of systematic bacteriology". 1105-1139. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. The Williams and Wilkins Co.. Baltimore.
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbauks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group species. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 595-603.
- Comi, G., Manzano, M., Citterio, B., Bersani, C., Cantoni, C. and De Bertoldi, M. (1993). Handwerklich und industriell hergestellte italiensche salami. Physiologische charakterisierung und entwicklung von laktobazillen. *Fleischwirtsch.*, **73**, 1312-1318.
- Cook, P.E. (1995). Fungal ripening meat and meats products. In "Fermented meats". 110-129. Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. Blackie Academic and Professional. London.
- Coretti, K. (1977). Starterkulturen in der fleischwirtschaft. *Fleischwirtsch.*, **3**, 386-394.
- Cowan, S.T. (1974). "Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria" 2nd. Cowan, S.T.. Cambridge University press. Cambridge.
- Cowden, J.M., O'Mahony, M., Bartlett, C.L.R. et al. (1989). A national outbreak of *Salmonella typhimurium* DT 124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiol. Infect.*, **103**, 219-225.
- Cruickshank, R. (1965). "Medical Microbiology". E. and S. Livingstone. 14th. E. and S. Livingstone Ltd.. Edimburgh.
- D'Aoust, J.Y. and Evans, A. (1978). Suspect case of human salmonellosis from a dry meat product-Ontario. *Can. Dis. Weekly Rep.*, **4**, 27-28.
- Dainty, R.H. and Blom, H. (1995). "Fermented meats". 176-193, Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. Blackie Academic and Professional. London.
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M. and Ramantanis, S.V. (1986). Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. *J. App. Bact.*, **61**, 117-124.

Dainty, R.H. and MacKey, B.M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill stored meat and spoilage processes. *J. App. Bact. Symp. Suppl.*, **21**, 103S-114S.

Dallas, H.L., Sathyamoorthy, V., and Hitching, A.D. (1996). Purification of the anti-listerial bacteriocin-like inhibitory substance produce by *Enterococcus faecium*. *J. Food Safety.*, **16**, 183-199.

Daporta, P.M. (1988). "Microorganismos de interés tecnológico, con especial referencia a Micrococcaceae, en chorizos de las variedades "Ctimpalos" y "cerdo ibérico" (Guijuelo). Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones. Universidad de León. León.

De Man, J.C., Rogosa, M.E., and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135.

Deibel, R.H. and Niven, C.F.J. (1958). Microbiology of meat curing. I. The occurrence and significance of a motile microorganism of the genus *Lactobacillus* in ham curing brines. *Appl. Microbiol.*, **6**, 23

Delarras, C. and Laban, P. (1981). Distribution of the different *Staphylococcus* species according to their meat or dairy origin. *Zentralblatt Bakteriol. Hyg. J.*, **173**, 471-477.

Devriese, L.A., Laurier, L., de Herdt, P. and Haesebrouck, F. (1992). Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 29-31.

Dierick, N., Vandekerckove, P. and Demeyer, D. (1974). Changes in nonprotein compounds during dry sausage ripening. *J. Food Sci.*, **39**, 301-304.

Dillon, V.W. (1998). Yeasts and moulds associated with meat and meat products. In "The microbiology of meat and poultry". 85-117. Davis, A. and Board, R. Blackie Academic and Professional. London.

Dillon, V.W. and Board, R.G. (1991). Yeasts associated with red meats. *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 93-108.

Dominguez, M.C., Ferre, C. and Zumalacárregui, J.M. (1988). Aportaciones a la caracterización del chrizo elaborado en la provincia de Leon. parámetros químicos y fisico-químicos. *Alimentaria*, **12**, 19-23.

Dominguez, M.C., Mateo, J., Aguirrezabal, M.M. and Zumalacárregui, J.M. (1989a). Evolución de los aminoácidos libres durante la maduración del chorizo. *An. Fac. Vet. León*, **35**, 79-86.

Domínguez, M.C., Gutiérrez, L.M., López, A., Seco, F. and Zumalacárregui, J.M. (1989b). Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la maduración del chorizo de León. *Ailmentaria*, **26**, 11-15.

Dowell, M.J. and Board, R.G. (1971). The microbial association in British fresh sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, **34**, 317-337.

Doyle, B.M. (1989). "Foodborne bacterial pathogens". Doyle, B.M. Marcel Dekker Inc.. New York.

Doyle, R.J., Keller, K.F. and Ezzell, J.W. (1985). *Bacillus cereus*. 211-215. En "Manual of clinical microbiology". 4th. Lennette, E.H., Ballows, A., Hausler, W.J. and Shadomy, H.J.. ASM, Washington, D.C..

Drake, S.D., Evans, J.B. and Niven, C.F.J. (1958). Microbial flora of packaged frankfurters and their radiation resistance. *Food Res.*, **23**, 291

Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M. and Ramantanis, S.V. (1987). Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *J. App. Bacteriol.*, **63**, 427-434.

Eitenmiller, R.R., Wallis, J.W., Orr, J.H. and Phillips, R.D. (1981). Production of histidine decarboxylase and histamine by *Proteus morgani*. *J. Food Protect.*, **44**, 815-820.

El-Gendy, S.M. and Marth, E.H. (1981). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *J. Food Protect.*, **44**, 211-221.

El-Kahteib, T. And Abd-El-Rahman, H. (1987). Effect of garlic and *Lactobacillus plantarum* on growth of *Salmonella typhimurium* in Egyptian fresh sausage and beefburger. *J. Food Protect.*, **50**, 310-311.

Ellajosyula, K.R., Doores, S., Mills, E.W., Wilson, R.A., Ananteswaran, R.C. and Knabel, S.J. (1998). Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in Lebanon Bologna by interaction of fermentation pH, heating temperature, and time. *J. Food Protect.*, **61**, 152-157.

Encinas, J.P. (1993). "Identificación de riesgos microbiológicos y puntos críticos durante la elaboración y maduración de embutidos crudos fermentados. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones. Universidad de Leon. León.

Encinas, J.P., Sanz, J., García-López, M.L., García-Armesto, M.R. and Otero, A. (1996). Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausage. *Meat Sci.*, **2**, 127-131.

Encinas, J.P., Sanz, J.J., García-López, M.L. and Otero, A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *Int. J. Food Microbiol.*, **46**, 167-171.

Etheridge, M.E., Yolken, R.M. and Vanderfecht, S.L. (1988). *Enterococcus hirae* implicated as cause of diarrhoea in suckling rats. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 1131-1139.

Ewing, W.H. (1986). "Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*" 4th. Ewing, W.H. Elsevier. New York.

Facklam, R.R. and Washington II, J.A. (1991). *Streptococcus* and related catalase negative Gram positive cocci. In "Manual of clinical microbiology". Balows, A. ASM. Washington, D.C..

Farber, J.M. (1991). *Listeria monocytogenes*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 701-703.

Farmer, J.J.I., Arduino, M.J., and Hickman-Brenner, F.W. (1992). The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications". 3012-3028. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. Springer Verlag. New York.

Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D. (1992). Phylogenetic analysis of the genera *Planococcus*, *Marinococcus* and *Sporosarcina* and their relationship to members of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **93**, 167-172.

Fayet, E.O. (1991). Stimulation of lactic starters by *B. circulans*. *Ann. Agric. Sci.*, **2**, 509-516.

Fernández, L.B. and Díez-Fernández, V.A. (1992). Antibacterial activity of lactobacilli isolated from "chorizo". *Fleischwirtsch.*, **72**, 1005-1007.

Fey, H., Pfister, H. and Rüegg, O. (1984). Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 34-38.

Fischer, U. and Schleifer, K.H. (1980). Vorkommen von Staphylokokken und milkkokken in rochwurst. *Fleischwirtsch.*, **60**, 1046-1049.

Fleming, H.P., Etechells, J.L. and Costilow, R.N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Microbiol.*, **30**, 1040-1042.

Flores, J. (1977). Parámetros de calidad utilizados para la normalización o tipificación de los productos cárnicos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **17**, 444-450.

Flores, J. (1980). Control de calidad de los productos cárnicos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **20**, 180-188.

Flores, J. (1994). Problemática de la normativa de embutidos crudos-curados. *Eurocarne*, **23**, 49-58.

- Flores, J. and Alvarruiz, A. (1985). Evaluación de la calidad de productos cárnicos. II. Parámetros analíticos propuestos para embutidos curados. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **25**, 233-240.
- Flores, J. And Alvarruiz, A. (1986).Evaluación de la calidad de productos cárnicos. IV. Chorizos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **26**, 589-596.
- Franz, C.A.M.P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (1996). Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, **29**, 255-270.
- Fritze, D., Flossdorf, J. and Claus, D. (1990). Taxonomy of alkaliphilic *Bacillus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 92-97.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365-378.
- García, M.C., García, M.L., and Otero, A. (1991). Pathogenic microorganisms in cheese. *Rev. Esp. Lechería.*, **26**, 21-23-21-26.
- García-Armesto, M.R., Rodríguez, R., García-López, M.L., Beattie, S. and Williams, A.G. (1996). The seasonal incidence of *Bacillus spp.* in raw milk in Spain and Scotland. *Symp. Bacteriol. Quality of Raw Milk, Wolfpassig (Austria)*.
- García-Armesto, M.R., Rodríguez, R., Moreno, B., García-López, M.L. and Otero, A. (1994a). Incidence of *Bacillus spp.* in cows and milk in the farm. *7th Int. Cong. Bacteriol. Appl. Microbiol. Division, Praga*.
- García-Armesto, M.R., Sanz, J.J., Rodríguez, R., Otero, A., Beattie, S. and Williams, A. (1996). Patogenicidad de *Bacillus spp* aislados de embutidos crudos-curados. *X Congreso SEM*.
- García-López, M.L., Prieto, M. and Otero, A. (1998). The physiological attributes of Gram negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In "The microbiology of meat and poultry". 1-34. Davies, A. and Board, R. Blackie Academic and Professional. London.
- Gardner, G.A. (1981). *Brochothrix thermosphacta (Microbacterium thermosphactum)* in the spoilage of meats: a review. In "Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity". 139 Roberts, T.A., Hobbs, G.A., Christian, J.H.B. and Skougaard, N. Academic Press. London.
- Garriga, M., Calsina, M.D. and Monfort, J.M. (1988). Estudio de la proteólisis en la maduración de salchichones manufacturados con carne de porcino de buena calidad. *Anal. INIA*, **3**, 17-25.
- Garvie, E.I. (1960).The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Sci.*, **27**, 283-292.

- Gaya, P. and Otero, A. (1999). Supervivencia de microorganismos patógenos en alimentos fermentados. Ponencia presentada en el XVI Congreso de la Sociedad Española de Microbiología (celebrado en Granada) el día 19 de septiembre de 1999. Publicada en el libro de resúmenes del Congreso, 131.
- Gehlen, K.H. (1989). "Einfluss der technologie und die Rohwurstreifung mit *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus varians* und weiteren starterorganismen unter besonderer Berücksichtigung der nitratreduktion. Thesis Universität Hohenheim.
- Gerhardt, G. (1975). "Especias y condimentos" 1st. Gerhardt, G. Acribia, S.A.. Zaragoza.
- Gerigk, K. and Gossling, U. (1981). Bakteriologische und sensorische untersuchungen von rohwürsten mit verringertem nitritzusatz. *Fleischwirtsch.*, **61**, 1124-1128.
- Gil, M.C., de la Rosa, M.C., Mosso, M.A. and García Arribas, M.L. (1986). Numerical taxonomy of *Bacillus cereus* isolated from orally administered drugs. *J. Appl. Bacteriol.*, **61**, 347-356.
- Gilbert, R.J., Turnbull, P.C.B., Parry, J.M. and Kramer, J.M. (1981). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* genera species: their part in food poisoning and other clinical infection. In "The aerobic endosporeforming bacteria". 297-314. Berkeley, P.C.W. and Goodfellow, M. Academic Press. London.
- Gill, C.O. and Bryant, J. (1992). The contamination of prok with spoilage bacteria during commercial dressing, chilling and cutting of pig carcasses. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**, 51-62.
- Gill, C.O. and Jones, T. (1995). The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. *Food Microbiol.*, **12**, 135-141.
- Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.*, **12**, 291-299.
- Giraffa, G., Carminati, D. and Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dry products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Protect.*, **60**, 732-738.
- Glass, K.A. and Doyle, M.P. (1989). *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1565-1569.
- Gómez-Campillo, J.L., Domínguez-Fernández, M.C. and Zumalacárregui, J.M. (1999). Incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y productos cárnicos comercializados en Castilla y León. *Alimentaria*, **36** (303), 71-75.
- González-Fandos, M.E. (1992). "Control del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de la producción de enterotoxinas (A-D) en medios de cultivo y productos cárnicos

fermentados. Teis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones. Universidad de León. León.

González-Fandos, M.E., Sierra, M., García-López, M.L., García-Fernández, M.C. and Otero, A. (1999). The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo y salchichón). *Meat Sci.*, **52**, 411-419.

González-Serrano, C.J. (1996). "Asociaciones bacterianas alterantes y agentes de infecciones alimentarias en pescado de agua dulce almacenado a refrigeración. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones, Universidad de León. León.

Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H. (1973). "The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook nº 427". Agriculture Research Service, D. Agriculture Research Service, Department of Agriculture U.S.A.. Washington, D.C..

Gorospe, O., Astiasarán, I., Sánchez-Monge, J.M. and Bello, J. (1989). Estudio del desarrollo del color en derivados cárnicos crudos curados, valorado por medidas químicas y físicas. *Alimentaria*, **206**, 37-41.

Goto, A., Yamazaki, K. and Oka, M. (1971). Bacteriology of radiation sterilization of species. *Food Irradiat.*, **6**, 35-42.

Granum, P.E. (1997). *Bacillus cereus*. In "Food microbiology. Fundamentals and frontiers". 327-337. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. ASM Press. Washington, D.C..

Grazia, L., Suzzi, G., Romano, P. and Giudici, P. (1989). The yeasts of meat products. In "Yeast as a main protagonist of biotechnology". S495-S499. Martini, A. Vaughan Martini.

Griffiths, M.W. (1990). Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* species present in milk. *J. Food Protect.*, **53**, 790-792.

Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. and Marchetti, R. (1993). Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 329-341.

Gustavsson, P. and Borch, E. (1993). Contamination of beef carcasses by psychrotrophic *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* at different stages along the processing line. *Int. J. Food Microbiol.*, **20**, 67-83.

Hammes, W.P. and Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.*, **49**, **Supp. 1**, S125-S138.

Hammes, W.P., Weiss, N. and Holzappel, W.H. (1992). *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria:

ecophysiology, isolation, identification, applications". 1535-1594. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. Springer Verlag. New York.

Hammes, W.P.A., Bantleon, A. and Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **87**, 165-174.

Hammes, W.R. and Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.*, **49**, S125-S138.

Hardie, J.M. and Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol. Supp.*, **83**, 1S-11S.

Harrigan, W.E. and McCance, M.E. (1976). "Laboratory methods in food and dairy microbiology". Academic Press. London.

Hendrie, M.S. and Shewan, J.M. (1979). The identification of *Pseudomonas*. In "Identification methods for microbiologists". 1-14. Skinner, F.A. and Lovelock, D.W. Academic Press. London.

Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A. and Vidal-Carou, M.C. (1997). Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *J. Food Protect.*, **60**, 825-830.

Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G. and Logan, N.A. (1998). *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 99-106.

Hitchener, B.J., Egan, A.F. and Rogers, P.J. (1982). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.*, **52**, 31-37.

Hiu, S.R., Holt, R.A., Sriranganathan, N., Seidler, R.J. and Fryer, J.L. (1984). *Lactobacillus piscicola*, a new spice from salmonid fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 393-400.

Holley, R.A., Lammerding, A.M. and Tittiger, F. (1988a). Microbiological safety of traditional and starter-mediated processes for the manufacture of Italian dry sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **7**, 49-62.

Holley, R.A., Lammerding, A.M., and Tittiger, F. (1988b). Occurrence and significance of streptococci in fermented Italian type dry sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **7**, 63-72.

Holzappel, W.H. (1998). The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In "The microbiology of meat and poultry". 35-84. Davies, A. and Board, R. Blackie Academic and Professional. London.

Hoover, D.G. (1993). Bacteriocins with potential use in foods. In "Antimicrobials in foods". 409. Davidson, P.M. and Branen, A.L. Marcel Dekker. New York.

- Huerta, T., Quenol, A. and Hernández-Haba, J. (1988). Yeast of dry cured ham, qualitative and quantitative aspects. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **5**, 289-294.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. and Montfort, J.M. (1993). Biochemical characterisation of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**, 107-113.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.*, **49**, S139-S150.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. and Montfort, J.M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 322-330.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Coopman, R., Janssen, P., Gillis, M., and Kersters, K. (1997a). Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 1157-1164.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M. et al. (1997b). *Aeromonas popoffi* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 1165-1171.
- ICMSF. (1980). The spices. In "ICMSF Microbial ecology of foods. vol. 2. Food Commodities". Academic Press. New York.
- ICMSF. (1983). "Ecología microbiana de los alimentos. 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos". 1st. Acribia, S.A.. Zaragoza.
- ICMSF. (1996). "Microorganisms in foods. 5. Microbial specifications of food pathogens". ICMSF. Blackie Academic and Professional. London.
- Incze, K. (1998). Dry fermented sausages. *Meat Sci.*, **49**, S169-S177.
- Ingram, M. (1952). Internal bacterial taints ("bone taint" or "souring") of cured pork legs. *J. Hyg.*, **50**, 165-181.
- Ingram, M. and Simonsen, B. (1980). Meat and meat products. In "Microbial ecology of foods. Vol. 2. Food commodities". ICMSF. Academic Press. New York.
- Janda, J.M. (1991). Recent advances in the study of taxonomiy, pathogenecity and infections syndromes associated with de genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.*,
- Jay, J.M. (1978). Meat, poultry and seafoods. 155-173. En "Food and beverage micology". Beuchat, L.R.. AVI Publishing, New York.

Jayne-Williams, D.J. (1976). The applications of miniaturized methods for the characterization of various organisms isolated from the animal gut. *J. Appl. Bacteriol.*, **40**, 189-200.

Jessen, B. (1995). Starter cultures for meat fermentation. 130-159. In "Fermented meats". Campbell-Platt, G. And Cook, P.E.. Blackie Academic and Professional. Glasgow.

Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G. and Schoeni, J.L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and hard salami. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 497-501.

Johnson, K.M. (1984). *Bacillus cereus* foodborne illness an update. *J. Food Protect.*, **45**, 145-153.

Johnson, K.M. and Busta, F.F. (1984). Detection and enumeration of injured bacterial spores in processed foods. In "The revival of injured microbes. Society for Applied Bacteriology. Symposium series n° 12". 241-256. Andrew, M.H.E. and Russell, A.D. Academic Press. London.

Johnston, R.W., Green, S.S., Chiu, J., Pratt, M. and Rovira, J. (1982). Incidence of *Salmonella* in fresh pork sausage in 1979 compared with 1969. *J. Food Sci.*, **47**, 1369-1371.

Jones, D. and Seeliger, H.P.R. (1992). The genus *Listeria*. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications". 1595-1616. Balows, A., Trüpper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. Springer Verlag. New York.

Joosten, H.M.J.J. and Stadhouders, J. (1989). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1. Decarboxylative properties of starter bacteria. *Neth. Milk Dairry J.*, **41**, 247-258.

Junttila, J.R., Hirn, J., Hill, P., and Nurmi, E. (1989). Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *J. Food Protect.*, **52**, 158-161.

Kaper, J., Lockman, H., and Colwell, R.R. (1979). Medium for the presuntive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Applied Environ. Microbiol.*, **38**, 1023-1026.

Karches, H. and Teufel, P. (1988). *Listeria monocytogenes*. Incidence in minced meat and behaviour in fresh onion mettwurst. *Fleischwirtsch.*, **68**, 1388-91-1381420.

Katz, E. and Demain, A.L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, **41**, 449-474.

- Keddie, R.M. and Jones, D. (1992). The genus *Kurthia*. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications". Balows, A., Trüpper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. Springer Verlag. New York.
- Kielwein, G., Gerlach, R. and Johne, H. (1969). Untersuchungen über das vorkommen von *Aeromonas hydrophila* in rohmilch. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **34**, 8
- King, E.O., Ward, W.K. and Raney, D.E. (1954). Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, **44**, 301-307.
- Kirov, S.M. (1997). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In "Food microbiology, fundamentals and frontiers". 265-287. Doyle, M.P., Beuchat, C.R. and Montville, T.J. American Society for Microbiology. Washington, D.C..
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39-86.
- Kloos, W.E., Ballard, D.N., George C.G., Webster, J.A., Hubner, R.J., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fiedler, F. and Schubert, K. (1998a). Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equipercicus* sp. nov., *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 859-877.
- Kloos, W.E., Berkhoff, H.A., Muller, E., Bonnerman, T.L. and Ballard, D.N. (1992). Relationship between cutaneous persistence in natural populations of coagulase-negative staphylococci and their ability to produce catheter infections biofilm and polysaccharide adhesin. *92nd Gen Meet. ASM*, **B 240**, 66
- Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J.S., van Pelt, L., McKinnon, M.L., Zimmer, B.L., Muller, E., Weinstein, M.P. and Mirrett, S. (1998b). *Staphylococcus hominis* subsp. nov., a novel trehalose and N-acetyl-D-glucosamine negative, novobiocin and multiple-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 799-812.
- Kloos, W.E., Tornabene, T.G. and Schleifer, K.H. (1974). Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**, 79-101.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H. and Smith, R.F. (1976). Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**, 22-37.
- Knudtson, L.M. and Hartman, P.A. (1992). Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3027-3031.
- Knudtson, L.M. and Hartman, P.A. (1993). Enterococci in pork processing. *J. Food Protect.*, **56**, 6-9.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. and Sommers, H.M. (1989). "Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color". Panamericana. Madrid.

Kraft, A.A. (1986). Psychrotrophic organisms. In "Advances in meat research. Meat and poultry microbiology". 191-205. Pearson, A.M. and Dutson, T.R. Macmillan Publishers. Basingstoke.

Kramer, J.M., Turnbull, P.C.B., Munshi, G. and Gilbert, R.J. (1982). Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. In "Isolation and identification methods for food poisoning organisms". Corry, J.E.L., Roberts, D. and Skinner, F.A. Academic Press. London.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). "The yeasts - a taxonomic study". Kreger-van Rij, N.J.W. Elsevier Science. Amsterdam.

Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meats. In "Fermented meats". 67-109. Campbell-Platt and Cook, P.E. Blackie Academic and Professional. London.

Kurk, V., Madden, R.H. and Collins, M.A. (1996). Hygienic quality of raw pork and chorizo (raw pork sausage) on retail sale in Mexico city. *J. Food Protect.*, **59**, 141-145.

Kuri, F.W. (1921). Art of curing meat. *US. Patent.*, **1**, 380, 068

Kühl, H. (1910). Über ein vorkommen van hefe auf schmieriger wursthaut. *Zentrablatt Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, **54**, 5-16.

Lachica, R.V.F., Hoepflich, P.D. and Riemann, H.P. (1972). Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. *Appl. Microbiol.*, **23**, 994-997.

Lat, J. (1969). Softening of canned frankfurters. *Proc. European Meet. Meat Research Workers.*, **15**, 421-427.

Lányi, B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. In "Methods in microbiology. Vol. 19". 1-67. Academic Press. New York.

Ledward, D.A. (1985). Novel intermediate moisture meat products. In "Properties of water in foods". 447-450. Simatos, D. and Multon, J.L. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands.

Leistner, F. (1992). The essentials of producing stable and safe raw fermented sausages. In "New technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures. Muscle enzymology and meat ageing. Quality control systems". 1-18. Smulders, F.J.M., Toldrá, F., Flores, J. and Prieto, M. EC\CE\AMST. Utrecht.

Leistner, F. and Dressel, J. (1986). Die chinesischen rohwurst-eine andere technologie. *Mittel-Lungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung.*, **92**, 6919-6926.

- Leistner, L. and Rödel, W. (1975). The significance of water activity for microorganisms in meats. In "Water relations of foods". Duckworth, R.B. Academic Press. London.
- Lelliot, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology.*, **29**, 470-489.
- Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J. (1991). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1683-1688.
- Libelt, K. (1983). Characteristics and variation of microflora of steamed sausages during manufacture. *Polskie Archiwum Weterynaryjne.*, **23**, 73-76.
- Libelt, K. (1984). Characteristics and variability of microflora of ordinary steamed sausage during post-manufacture storage. *Polskie Archiwum Weterynaryjne.*, **24**, 51-64.
- Liepe, H.U. (1983). Starter cultures in meat production. In "Biotechnology. Vol. 5". 399-424. Rehm, H.J. and Reed, G. Verlag Chemie. Weinheim-Basel.
- Lindgren, S., Petterson, K., Jonsson, A., Lingrall, P., and Kaspersson, A. (1985). Silage inoculation. *Swedish J. Agric. Research.*, **15**, 9-18.
- Little, C.L., Monsey, H.A, Nichols, G.L. and de Louvois, J. (1998). The microbial quality of ready-to-eat dried and fermented meat and meat products. *Int. J. Environ Health Res.*, **8**, 277-284.
- Logan, N.A. and Berkeley, R.C.W. (1981). Classification and identification of members of the genus *Bacillus*. In "The aerobic endosporeforming bacteria". 105-140. Berkeley, P.C.W. and Goodfellow, M. Academic Press. London.
- Logan, N.A. and Berkeley, R.C.W. (1984). Identification of *Bacillus* strains using API system. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1871-1882.
- Lois, A.L., Gutierrez, L.M., Zumalacarregui, J.M. and López, A. (1987). Changes in several constituents during the ripening of "chorizo"-A Spanish dry sausage. *Meat Sci.*, **19**, 169-177.
- López-Díaz, T.M. (1993). "Estudio microbiológico y físico-químico del queso de Valdeón (León) para su tipificación y posible industrialización. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones, Universidad de León. León.
- Luchansky, J.B., Glass, K.A., Harsono, K.D., Degnan, A.J., Faith, N.G., Cauvin, B., Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Mauer, A.J. and Cassens, R.G. (1992). Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control of *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3053-3059.

- Lund, B.M. (1991). Foodborne diseases due to *Bacillus* and *Clostridium* species. In "Foodborne illness. A Lancet review". 86-96. Waiter, W.M. and Arbuthnott, J.P. Edward Arnold. London.
- Lücke, F.K. (1985). Fermented sausages. In "Microbiology of fermented foods". 41-81. Wood, B.J.B. Elsevier. Amsterdam.
- Lücke, F.K. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtsch.*, **66**, 1505-1509.
- Lücke, F.K. and Hechelmann, H. (1988). Cultivos starter para embutido seco y jamón crudo. Composición y efecto. *Fleischwirtsch. Esp.*, **1**, 38-48.
- Lücke, K.F. (1992). Prospects for the use of bacteriocins against meat-borne pathogens. In "New technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures. Muscle enzymology and meat ageing. Quality control systems". 37-52. Smulders, F.J.M., Toldrá, F., Flores, J. and Prieto, M. EC\CE/AMST. Utrecht.
- Marcos-Aguilar, D. (1991). "Embutidos crudos curados españoles". 1st. Ayala. Madrid.
- Marquina, P., Beltrán, J.A., Jaime, I., Peiró, J.M. y Roncalés, P. (1993). Caracterización y diferenciación físico-química de los tipos comerciales de la Longaniza de Aragón. *Rev. Esp. Cien. Tec., Alim.*, **33**, 631-650.
- Marth, E.H. (1963). Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.*, **46**, 869-890.
- Martin, F., Friedrich, K., Beyer, T. and Terplan, G. (1994). Influence of enterococci on the enrichment of *Listeria monocytogenes*. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **45**, 75-79.
- Martínez Solis, F., De Lecea, J., Sota, T. and Martínez, A. (1982). Estudio comparativo de la flora microbiana presente en embutidos fermentados. *Anal. Broamtol.*, **34-2**, 259-268.
- Masson, F., Talon, R. and Montel, M.C. (1996). Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 199-207.
- Mateo, J. (1994). El chorizo artesanal de la provincia de León (cuestionario). *Alimentaria*, **julio-agosto**, 19-25.
- Mateo, J. and Zumalacarregui, J.M. (1996). Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Sci.*, **44**, 255-273.
- McCarthy, J.A. and Damoglou, A.P. (1993). The effect of low dose gamma irradiation on yeasts of British fresh sausage. *Food Microbiol.*, **10**, 439-446.
- McKay, A.M. (1990). Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 15-17.

- McLean, R.A. and Sulzbacher, W.L. (1953). *Microbacterium thermosphactum*, spec. nov.; a nonheat resistant bacterium from fresh pork sausage. *J. Bacteriol.*, **65**, 267-273.
- Medwid, R.D. and Grant, D.W. (1980). Inactivation of staphylococcal thermonuclease by an enzyme-like factor produced by *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *J. Food Protect.*, **43**, 201-202-201-204.
- Melendo Lidón, J.A. (1997). "Utilización de un extracto lisosomal de bazo para mejorar la calidad sensorial de alimentos de origen muscular. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones, Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
- Mendoza, S., Flores, J. and Silla, H. (1983). Influencia de la temperatura de estufado sobre las características microbiológicas y químicas del chorizo. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, **23**, 86-96.
- Messina, M.C., Ahmad, H.A., Marchello, J.A., Gerba, C.P. and Paquette, M.W. (1988). The effect of liquid smoke on *listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.*, **51**, 629-631, 638.
- Midura, T., Gerber, M., Wood, R. and Leonard, A.R. (1970). Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Publ. Health Rep.*, **85**, 45-48.
- Mirvish, S.S., Karlowski, K., Cairner, D.A., Sams, J.P., Abraham, R. and Nielsen, J. (1980). Identification of alkylureas after nitrosation-denitrosation of a bonito fish product, crab, lobster and bacon. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1175
- Molin, G. and Terström, A. (1982). Numerical taxonomic of psychrotrophic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1249-1264.
- Moller, J.K.S., Hinrichsen, L.L. and Andersen, H.J. (1998). Formation of aminoacid (L-leucine, L-fphenylalanine) derived volatile flavour compounds by *Moraxella phenylpyruvica* and *Staphylococcus xylosus* in cured meat model systems. *Int. J. Food Microbiol.*, **42**, 101-117.
- Montel, M.C., Masson, F. and Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Sci.*, **49 Suppl. 1**, S111-S123.
- Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J.L. and Rousset-Akrim, S. (1996). Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.*, **13**, 489-499.
- Montel, M.C., Talon, R., Berdagué, J.L. and Cantonnet, M. (1993). Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of French dry sausages. *Meat Sci.*, **35**, 229-240.
- Montel, M.C., Talon, R., Cantonnet, M. and Fournaud, J. (1992). Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**, 73-77.

Morrison, D., Woodford, N. and Cookson, B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Supp.*, **83**, 89S-99S.

Mossel, D.A.A., Kleynen-Semmeling, A.M.C., Vicentie, H.M., Beerens, H. and Catsaras, M. (1970). Oxytetraciline-glucose-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 454-457.

Mossel, D.A.A., Koopman, M.J. and Jongericus, E. (1967). Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.*, **15**, 894-895.

Mossel, D.A.A. and Moreno, B. (1985). "Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos". 1st. Acribia, S.A.. Zaragoza.

Mulyowidarso, R.K., Fleet, G.H. and Buckle, K.A. (1990). Association of bacteria with fungal fermentation of soybean tempe. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 43-47.

Mundt, J.O. (1986). Streptococi. In "Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2". 1063-1065. Sneath, P.H., Mair, N.S. and Sharpe, M.E. Williams and Wilks Co.. Baltimore.

Muriana, P.M. and Luchansky, J.B. (1993). Biochemical methods for the purification of bacteriocins. In "Bacteriocins of lactic acid bacteria". 41-57. Hoover, D.G. and Steenson, L.R. Academic Press. San Diego.

Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**, 46-65.

Müller, G. (1981). "Microbiología de los alimentos vegetales". Müller, G. 1st. Acribia, S.A.. Zaragoza.

Nesbakken, T. (1988). Enumeration of *Yersinia enterocolitica* O:3 from porcine oral cavity, and its occurrence on cut surfaces of pig carcasses and the environment in a slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.*, **6**, 287-297.

Neumayr, L., Lücke, F.K., and Leistner, L. (1983). Fate of *Bacillus* from spices in fermented sausages. *Procc. 29th European Congress Meat Research Workers.*, 418-424.

Nielsen, P., Rainey, F.A., Outtrup, F.A., Priest, F.G. and Fritze, D. (1994). Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **117**, 61-66.

Niinivara, F.P. (1955). Über den Einfluss bakterien-reinkulturen auf die reifung und umrötung der rohwrurst. Thesis University of Helsinki. *Acta Agralia Fennica.*, **85**, 1-128.

- Niinivara, F.P. and Pohja, M.S. (1957). Erfahrungen über die herstellung von rohwurst mittels einer bakterienreinkultur. *Fleischwirtsch.*, **9**, 709-790.
- Niven, C.F. (1961). Microbiology of meats. *Am. Meat Inst. Found. Washington, D. C.* **Cir. núm. 68**,
- Niven, C.F., Jr., Deibel, R.H. and Wilson, G.D. (1958). Production of fermented sausage. *US Patent.*, **2**, 907, 661
- Noll, F. (1974). "Methods of enzymatic analysis". Bergmeyer. Bergmeyer. London.
- Norris, J.R. (1981). *Sporosarcina* and *Sporolactobacillus*, spp.. In "Classification and identification on the aerobic endosporeforming bacteria". 337-357. Berkeley, R.C.W. and Goodfellow, M.. Academic Press. London
- Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A. and O'Donnell, A.G. (1992). The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. Chapter 135. In "The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications". Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. Spring-Verlag. New York.
- Nortjé, G.L., Nel, L., Jordaan, E. and *et al.* (1990). A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. *J. Food Protect.*, **53**, 411-417.
- Novotny, J.R. and Perry, J.J. (1992). Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon utilizing species. *Appl. Environm. Microbiol.*, **58**, 2393-2396.
- Nurmi, E. (1966). Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. *Acta. Agra. Fennica*, **108**, 1-77.
- Nychas, G.J.E., Drosinos, E.H. and Board, R.G. (1998). Chemical changes in stored meat. In "The microbiology of meat and poultry". Davies, A. and Board, R. Blackie Academic & Professional. London.
- Nychas, J.S. and Arkoudelos, J.S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 167S-188S.
- Ordóñez, J.A. (1974). Microbiología y bioquímica del queso tipo "Ulloa" y preparación de un fermento a partir de leche pasteurizada. *An. Fac. Vet. León*, **20**, 225-403.
- Ordóñez, J.A., Asensio, M.A., García, M.L., Selgas, M.D. and Sanz, B. (1989). A reasonably aseptic method of monitoring the phenomena occurring during the ripening of dry fermented sausages. *Fleischwirtsch.*, **69**, 1023-1025.
- Palleroni, N.I. (1984). Genus *Pseudomonas*. In "Bergey's manual of systematic bacteriology". 141-199. Krieg, N.R. and Holt, J.G. Williams and Wilkins. Baltimore.

- Palumbo, S.A. (1986). Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens?. *J. Food Protect.*, **49**, 1003-1009.
- Palumbo, S.A., Rivenburgh, A.J., Smith, J.L. and Kissinger, J.C. (1975). Identification of *Bacillus subtilis* from sausages products and spices. *J. Appl. Bacteriol.*, **38**, 99-105.
- Palumbo, S.A., Zaica, L.L., Kissinger, J.C. and Smith, J.L. (1976). Microbiology and technology of the pepperoni process. *J. Food Sci.*, **41**, 12-17.
- Papa, F., Zambonelli, C., and Grazia, L. (1995). Production of Milano style salami of good quality and safety. *Food Microbiol.*, **12**, 9-12.
- Parente, E. and Hill, C. (1992a). Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.*, **55**, 497-502.
- Parente, E. and Hill, C. (1992b). Inhibition of *Listeria* in buffer, broth and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Protect.*, **55**, 503-508.
- Parente, E., Villani, F., Coppola, R. and Coppola, S. (1989). A multiple strain starter for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Lait*, **69**, 271-279.
- Pederson, C.S. (1971). "Microbiology of food fermentations". The AVI Publishing, C. 1st. The AVI Publishing, Co.. Connecticut, USA.
- Pennington, J.E., Gibbson, N.D., Strobeck, J.E., Simpson, G.L. and Myeronitz, R.L. (1976). *Bacillus* species infection patients with hematologia neoplasia. *J. Amer. Med. Ass.*, **235**, 1473-1477.
- Pérez-Cardenal, D., Sanz, J.J., Román, C., Otero, A., and García-López, M.L. (1992). Identificación de enterobacterias aisladas de botillo. *V Reunión Grupo Taxonomía SEM*.
- Pirone, G., Magnelli, E. and Diaferia, C. (1990). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from Naples-Type salami. *Industria conserve*, **65**, 33-35.
- Pivnick, H (1980). The spices. Chapter 24. En "ICMSF Microbial ecology of foods. Vol.2. Food commodities". ICMSF, Academic Press, New York
- Pohja, M.S. (1960). Micrococci in fermented meat products. Classification and description of 171 different strains. *Acta Agralia Fennica*, **96**, 1-80.
- Pollman, D.S., Danielson, D.M. and Peo, E.R. (1980). Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.*, **51**, 577-581.

- Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M.C., Ingianni, A., Cortis, G. and Dainelli, B. (1992). *Enterococcus flavescens* sp. nov. a new specie of enterococci of clinical origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 365-369.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzymes synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Reviews.*, **41**, 711-753.
- Priest, F.G. (1989). Products and applications. In "*Bacillus*". 293-320. Harwood, C.R. Plenum Press. New York.
- Priest, F.G. (1992). Biological control of mosquitoes and other bitinflyes by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 357-369.
- Priest, F.G., Goodfellow, M., Shute, L.A. and Berkeley, R.C.W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 69-71.
- Prieto, M. (1990). "Asociaciones microbianas que participan en la alteración de canales de ovino refrigeradas: taxonomía, evolución e influencia de diversos factores. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria". Servicio de Publicaciones. Universidad de León. Servicio de Publicaciones. Universidad de León.. León.
- Prieto, M. (1994). Integrated software for probabilistic identification of microorganisms. *Comp. Applic. Biosci.*, **10**, 71-73.
- Prieto, M., García-López, M.L., García-Armesto, M.R., Otero, A., López, T.M. and Moreno, B. (1993). Factors affecting spoilage microflora succession on lamb carcasses at refrigerated temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, 521-525.
- Probst, A.J., Hertel, C., Rihter, L., Wassill, L., Ludwig, W. and Hammes, W.R. (1998). *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy source mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer, 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bactriol.*, **48**, 651-658.
- Puig, P., Mora, J., Ciscar, J. and Estrades, M. (1989). Composición de la Sobrasada Mallorquina. *Alimentaria*, **26**, 37-40.
- Puleo, J.R., Oxborrow, G.S., Fields, N.D. and Hall, H.E. (1970). Quantitative and qualitative microbiological profiles of the Apollo I and II spacecraft. *Appl. Microbiol.*, **20**, 384-389.
- Rainey, F.A., Fritze, D. and Stackebrandt, E. (1994). The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **115**, 205-212.
- Ramantanis, S., Fassbender, C.P. and Wenzel, S. (1985). Formation of histamine, tyramine and tryptamine in dry sausage. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **36**, 9-11.

- Ramírez, C. and González, C. (1972). *Candida iberica* sp.nov. A new species isolated from Spanish sausages. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1778-1780.
- Ray, B. and Hoover, D.G. (1993). Pediocins. In "Bacteriocins of lactic acid bacteria". 181-206. Hoover, D.G. and Steenson, L.R. Academic Press. San Diego.
- Redel, Y., Altmeri, U.K., Erg, A.M., Yumanik, A.Y., Sarand, R.Y., Uudisaru, M.M., Voitk, K.Y. and Zakharova, T.P. (1969). *USSR, Patent*.
- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **2**, 55-68.
- Ricke, S.C. and Keeton, J.T. (1997). Fermented meat, poultry and fish products. In "Food microbiology. Fundamentals and frontiers". 610-628. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. ASM Press. Washington, D.C..
- Ridell, J. and Korkeala, H. (1997). Minimum growth temperature of *Hafnia alvei* and other *Enterobacteriaceae* isolated from refrigerated meat determined with a temperature gradient incubator. *Int. J. Food Microbiol.*, **35**, 287-292.
- Riha, W.E. and Solberg, M. (1970). Microflora of fresh pork sausage casings. 2. Natural casings. *J. Food Sci.*, **35**, 860-863.
- Rocca, M. and Incze, K. (1989). Antagonistic effect of some starter cultures on *Enterobacteriaceae* (*E. coli*). *Meat Sci.*, **25**, 123-131.
- Roccourt, J. and Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In "Food microbiology. Fundamentals and frontiers". 337-352. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. ASM Press. Washington, D.C..
- Rodríguez-Pérez, R. (1995). "A numerical taxonomy study of *Bacillus* species isolated from raw ewe's milk. (Master Dissertation submitted in partial fulfillment of the Grade of Master in Food Science". Anonymous. Katholieke University Leuven. Gent.
- Rodríguez-Pérez, R., García-Armesto, M.R., Otero, A., Sanz, J.J. and González, C.J. (1994a). Caracterización de diversas cepas de *Bacillus spp.* aisladas de leche cruda de oveja empleada en la elaboración de queso. *VI Reunión Científica Taxonomía Bacteriana SEM, Valencia*.
- Rodríguez-Pérez, R., García-Armesto, M.R., Sanz, J.J., González, C.J. and Otero, A. (1994b). Seasonal variation of spore-forming bacteria in raw ewe's milk used to cheesemaking. *7th Int. Cong. Bacteriol. Appl. Microbiol. Division, Praga*.
- Rodríguez-Pérez, R., Sanz, J.J., Encinas, J.P., Otero, A. and García-Armesto, M.R. (1994c). Influence of the temperature of storage and activation of the lactoperoxidase system on the evolution of *B.cereus* and other psychrotrophic microorganisms in milk. *7th Int. Cong. Bacteriol. Appl. Microbiol. Division, Praga*.

- Rodríguez-Rebollo, M. (1998). "Manual de industrias cárnicas". Pub. Técnicas Alimentarias, S.A.. Madrid
- Rodríguez, J.M., Sobrino, O.J., Moreira, W.L., Cintas, L.M., Casaus, M.F., Fernández, M.F., Sanz, B. and Hernández, P.E. (1994). Inhibition of *Yersinia enterocolitica* by *Lactobacillus sake* of meat origin. *Meat Sci.*, **37**, 305-314.
- Rogosa, J., Mitchell, J.A. and Wiseman, R.F. (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* **62**, 132-133.
- Rohm, H., Lechner, F. and Lechner, M. (1990). Evaluation of API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, **56**, 1290-1295.
- Roig-Sagües, A., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J. and Mora-Ventura, M.T. (1996). Histidine descarboxylase activity of bacteria isolated from raw ripened salchichón. A Spanish cured sausage. *J. Food Protect.*, **59**, 516-520.
- Román, C. (1997). "Queso Castellano. Caracterización y comportamiento de diversos grupos microbianos durante su fabricación y maduración". Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Servicio de Publicaciones. Universidad de León. Servicio de Publicaciones. Universidad de León. León.
- Sainz, R. (1974). "Chacinería práctica" 5th. Sinter, S.A.. Barcelona.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. and Metaxopoulos, J. (1994a). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 179-196.
- Samelis, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A. and Metaxopoulos, J. (1994b). Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiol.*, **11**, 447-460.
- Sanchez Villarraso, M.P. and León Crespo, F. (1989). Efecto del fosfato sobre al microflora total y los cambios degradativos en la maduración del chorizo tradicional. *Alimentaria*, **26**, 31-36.
- Santamaría, I., Lizarraga, T., Astiasarán, I. and Bello, J. (1992). Contribución al problema del desarrollo del color en el chorizo de Pamplona: comportamiento de nitritos, nitratos y pigmentos cárnicos. *Alimentaria*, **enero-febrero**, 23-26.
- Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I. and Rovira, J. (1998). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of "chorizo". *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 123-128.
- Santos-Buelga, C., Peña-Egido, M.J. and Rivas-Gonzalo, J.C. (1986). Changes in tyramine during chorizo-sausage ripening. *J. Food Sci.*, **51**, 518-519.

- Sanz, B., Selgas, M.D., Parejo, I. and Ordóñez, J.A. (1988) Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, **6**, 199-205.
- Sarasibar, B., Sánchez-Monge, J.M. and Bello, J. (1989). Influencia de nitratos y nitritos sobre la estabilidad del pimentón (*Capsicum annuum* L.) y el desarrollo del color en el chorizo de Pamplona. *Alimentaria*, **26**, 19-23.
- Sazanova, L.P. (1988). Microflora of meat and fish products. *Gigiena i Sanitariya*, **8**, 18-21.
- Schiemann, D.A. (1982). Development of a two-step enrichment procedure for the recovery of *Yersinia enteocolitica* from food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 14-27.
- Schiemann, D.A. (1989). *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*. In "Foodborne bacterial pathogens". Doyle, M.P. Marcel Dekker. New York.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.*, **4**, 199-208.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1901-1906.
- Schillinger, U., Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1993). Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *Int. J. Food Microbiol.*, **20**, 131-147.
- Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 31-34.
- Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approach to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, **10**, 1-19.
- Schleifer, K.H. and Kloos, W.E. (1975). A simple test for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.*, **1**, 337-338.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R. and Collins, M.D. (1985). Transfer *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**, 183-195.
- Schmidt, U., Seeliger, H.P.R., Glenn, E., Langer, B. and Leistner, L. (1988). *Listeria* findings in raw meat products. *Fleischwirtsch.*, **68**, 1313-1315.
- Seager, M.S., Banks, J.G., Blackburn, C. and Board, R.G. (1986). A taxonomic study of *Staphylococcus* spp. isolated from fermented sausages. *J. Food Protect.*, **51**, 295-297.

Seco Alvarez, F. (1987). "Estudio de los principales grupos de microorganismos durante la maduración del chorizo de León". Excma. Diputación Provincial de León e Institución Fray Bernardino de Sahagún. Excma. Diputación Provincial de León. León.

Selgas, M.D., Ordóñez, J.A. and Sanz, B. (1986). Selection of micrococci strains for their use as starter culturers for dry fermented sausages. *Proc. 32nd. European Meet. Meat Research Workers. Ghent, Belgium.*

Selgas, M.D., Sanz, B. and Ordóñez, J.A. (1988). Selected characteristics of micrococci isolated from Spanish dry fermented sausages. *Food Microbiol.*, **5**, 185-193.

Selgas, M.D., Sanz, B. and Ordóñez, J.A. (1989). Actual identity of six micrococcal strains selected as potential starter for dry fermented sausage production. *Microbiol. SEM*, **5**, 53-55.

Serrano-Moreno, A. (1979). Evolución de varias microfloras y su interdependencia con las condiciones fisico-químicas durante la maduración del salchichón. *Alimentaria*, **16**, 107-113.

Shaw, B.G. and Harling, C.D. (1984). A numerical taxonomy study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 25-40.

Shaw, S. and Keddie, R.M. (1983). A numerical taxonomic study of the genus *Kurthia* with a revised description of *Kurthia zopfii* and description of *Kurthia grobsonii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **4**, 253-276.

Shida, O., Takagi, H., Kodowaki, K. and Komagata, K. (1996). Proposal for two new genera *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 939-946.

Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **23**, 15-22.

Silla-Santos, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **29**, 213-231.

Silla-Santos, M.H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 227-230.

Singigaglia, M., Lanciotti, R. and Guerzoni, E. (1994). Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 54-59.

Smidt, G., Bessman, M.J., Hickey, M.D. and Thannhauser, S.J. (1956). *J. Biol. Chem.*, **233**, 1027.

Smith, N.R., Gordon, R.E. and Clark, F.E. (1952). "Aerobic sporeforming bacteria. U.S.A.. Department of Agriculture, Agriculture monograph n° 16". U.S.A.. Government Printing Office. Washington, D.C..

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). "Numerical taxonomy. The principles and practice classification". W.H. Freeman and Co.. San Francisco.

Sobrino, O.J., Rodríguez, J.M., Moreira, W.L., Fernández, M.F., Sanz, B. and Hernández, P.E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**, 1-10.

Sobrino, O.J., Rodríguez, J.M., Moreira, N.L., Cintas, L.M., Fernández, M.F., Sanz, B. and Hernández, P.E. (1992). Bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**, 215-225.

Solís, F.M., de Lecea, J.R., Esteras, T.S. and Bermudez, A.M. (1984). Localización de los microorganismos en embutidos fermentados. *Ana. Bromatol.*, **36**, 295-300.

Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M.C., Ventosa, A. and Schleifer, K. (1996). *Halobacillus* gen. nov. with description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus truperi* sp. nov. and transfer of *Sporosarcina halophilus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 492-496.

Stackebrandt, E., Koch, C., Grozdiak, O. and Schumann, P. (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov. and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 682-692.

Stiebing, A. and Rödel, W. (1991) Influencia del pH sobre el proceso de secado en embutidos secos. *Fleischwirtsch. Esp.*, **2**, 44-48.

Stiles, M.E. and Hastings, J.M. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, **2**, 247-251.

Stiles, M.E. and Hollzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1-29.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Protect.*, **54**, 460-470.

Sugar, A.M. and McCloskey, V. (1976). *Bacillus licheniformis* sepsis. *J. Amer. Med. Ass.*, **238**, 1180-1181.

Sullivan, N.M., Mills, D.C., Riemann, H.P. and Arnon, S.S. (1987). Evaluation of the Minitex system for characterization of *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2680-2683.

- Sulzer, G. and Busse, M. (1991). Growth-inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 287-296.
- Sutherland, A.D. and Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *Int. J. Food Microbiol.*, **21**, 279-292.
- Suzuki, T. and Yamasato, K. (1994). Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, **115**, 13-18.
- Talon, R., Labadie, J. and Larpent, J.P. (1980). Characterization of inhibitory power of *Lactobacillus* of meat origin. *Zentralblatt. Bakteriolog. Hyg.*, **1B 170**, 133-142.
- Taplin, T. (1982). *Salmonella newport* outbreak-Victoria. *Commun. Dis. Intell.*, **1**, 3-6.
- Tauxe, R.V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S.M., Goossens, V., DeMol, P., van Noyen, R. and Thiers, G. (1987). *Y. enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet*, **i**, 1129-1132.
- ten Brink, B., Damink, F., Joosten, H.M.L.J. and Huis in't Veld, J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **11**, 73-84.
- Tham, W. (1988). Histamine formation by enterococci isolated from home-made goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, **7**, 103-108.
- Thorneley, M.J. (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria of the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 37-52.
- Tiecco, G., Tantillo, G., Franciosa, E., Paparella, A. and De-Natale. (1985). Qualitative and quantitative determination of some biogenic amines in sausage during ripening. *Industria Alimentari*, **25**, 209-213.
- Tilden, J.J., Young, W., McNamara, A.M., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J. and Morris, J.G.J. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Pub. Health.*, **86**, 1142-1145.
- Torregrosa, A., Fagoaga, F., Moreno, P. and García, M. (1994). Incidencia de *Salmonella* spp. en productos cárnicos. *Alimentaria*, **julio-agosto**, 27-29.
- Torriani, S., van Reenen, C.A., Klein, G., Reuter, G., Dellaglio, F. and Dicks, L.M.T. (1996). *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* subsp. nov. and *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus* subsp. nov., new species of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagari, Kitahara and Fukami 1934 (Klein *et al.* 1996, emended descriptions), respectively. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **46**, 1158-1163.

- Trimble, R.B. and Erlich, H.L. (1970). Bacteriology of manganese nodules. *Appl. Microbiol.*, **19**, 966-972.
- Troeger, K. and Woltersdorf, W. (1989). Contaminación microbiana de canales de porcino por el agua de escaldado a través del sistema vascular. *Fleischwirtsch. Esp.*, **1**, 13-18.
- Trüssel, M. and Jemmi, T. (1989). The behaviour of *Listeria monocytogenes* during the ripening and storage of artificially contaminated salami and mettwurst. *Fleischwirtsch.*, **69**, 1586-1592.
- Turnbull, P.C.B. and Kramer, J.M. (1991). *Bacillus*. In "Manual of clinical microbiology". 296-303. Ballows, A., Hausler, W.J., Herrmann, H.D., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. A.S.M. Press. Washington, D.C..
- Ubach, M., Miguel, A. and Puig, P.M. (1988). Microflora de la sobrasada Mallorquina. *Ana. Bromatol.*, **40**, 155-161.
- van der Walt, J.P. and Yarrow, D. (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In "The yeasts, a taxonomic study". 45-104. Kreger Van Rij, N.J.W. Elsevier. Amsterdam.
- van Netten P., Moosdjik, A., Hoensel, P., Mossel, D.A.A. and Perales, I. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 73-79.
- Varnam, A.H. and Evans, M.G. (1991). "Foodborne pathogens. An illustrated text" 1st. Varnam, A.H. and Evans, M.G. Wolf. Aylesbury, England.
- Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. (1998). "Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología " 1st. Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. Acribia, S.A.. Zaragoza.
- Vignolo, G., Ruiz-Holgado, A.P. and Oliver, G. (1989). Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. *J. Food Protect.*, **52**, 787-791.
- Vignolo, G.M., Suriani, F., de Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 344-349.
- Viljoen, B.C., Dykes, G.A., Collis, M. and von Holy, A. (1993). Yeast associated with Vienna sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**, 53-62.
- von Rheinbaben, K.E. and Hadlok, R.M. (1981). Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agar. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, **47**, 41-51.

- Walbanks, S., Martínez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A. and Collins, M.D. (1990). 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 224-230.
- Walker, S.J. and Gilmour, A. (1986). A comparison of media and methods for the recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica-like* bacteria from milk containing simulated raw milk microflora. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 175-183.
- Wall, P.G., Morgan, D., Lamden, K., Ryan, M., Griffin, M., Threlfall, E.J., Ward, L.R. and Rowe, B. (1994). A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Commun. Dis. Rep.*, **4**, R130-R135.
- Whiteley, A.M. and D'Souza, M.D. (1989). A yellow discoloration of cooked cured meat products. Isolation and characterization of the causative organisms. *J. Food Protect.*, **52**, 392-395.
- Williams, C.M. and Shih, J.C.H. (1989). Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.*, **67**, 25-35.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, J.R.P., Fox, J.E., Deinhard, G. and Poralla, K. (1992). Comparative sequence analysis on the 16S (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 263-269.
- Wortberg, B. and Woller, R. (1982). Quality and freshness of meat and meat products as related to their content of biogenic amines. *Fleischwirtsch.*, **62**, 1457-1460-3.
- Yagüe, A. (1991). El chorizo de Cantimpalos debe tener Denominación de Origen. *Cárnica 2000*, **octubre**, 46-47.
- Zeuthen, P. (1995). Historical aspects of meat fermentation. In "Fermented meats". 53-68. Campbell-Platt and Cook, P.E. Blackie Academic and Professional. London.