



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

**EVOLUCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS  
RESPONSABLES DE LA MADURACIÓN DEL  
QUESO DE ARMADA, VARIEDAD SOBADO**

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

**M<sup>a</sup> EUGENIA TORNADIJO RODRÍGUEZ**

**León, 1995**

ROBERTO MARTÍN SARMIENTO Y FRANCISCO JAVIER CARBALLO GARCÍA, CATEDRÁTICO Y PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LAS UNIVERSIDADES DE LEÓN Y VIGO RESPECTIVAMENTE

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "Evolución e identificación de los microorganismos responsables de la maduración del queso de Armada, variedad Sobado" de la que es autora Dña. M<sup>a</sup> Eugenia Tornadijo Rodríguez, Licenciada en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Biología.

León, Noviembre de 1995

Fdo. Roberto Martín Sarmiento

Fdo. Francisco Javier Carballo García

---

Para llevar a cabo esta Memoria, la autora fue beneficiaria de una Beca de Investigación concedida por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León durante los años 1991/92, 1992/93 y 1993/94.

---

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Profesor D. Roberto Martín Sarmiento, por la confianza que depositó en mí al permitirme formar parte de su Grupo de Investigación y por la codirección de esta Memoria.

Al Dr. Francisco Javier Carballo García, por su dedicación, paciencia y críticas constructivas, así como por sus enseñanzas y motivación.

A las Dras. Ana Bernardo Álvarez y Josefa González Prieto por sus acertados consejos.

A mi más que compañero José María Fresno Baro, por su estímulo, comprensión y ayuda, sin los cuales este trabajo de investigación no hubiera tenido para mí el mismo significado.

A mis padres y hermanos porque mis causas son también las suyas.

A todos los miembros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, especialmente al grupo que ha compartido conmigo la labor de tipificación de quesos.

Y en definitiva a todos aquellos que me han acompañado a lo largo de este período, de los que he recibido valiosas sugerencias tanto personales como profesionales.

---

Incompleta fuera la labor del científico si se contrajera exclusivamente a actuar sobre las cosas; opera también sobre las almas.

Santiago Ramón y Cajal, Recuerdos de mi vida (1923).

---

A Tomás y a Elena, mis padres.

A Chema.

---

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.- Origen y situación actual de las explotaciones caprinas. Producción de leche y queso .....	11
2.- Situación actual del queso de Armada .....	14
3.- Tipificación del queso de Armada.....	15
3.1.- Procedimiento de elaboración .....	16
3.2.- Composición química del queso de Armada y de la leche utilizada en su elaboración .....	17
3.3.-Principales fenómenos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración del queso de Armada ..	18
3.4.- Características microbiológicas .....	20
4.- Justificación y objetivos de esta Tesis .....	20
5.- Bibliografía.....	22
<b>CAPÍTULO I.- EVOLUCIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA.....</b>	<b>25</b>
I.1.- Introducción .....	25
I.2.- Material y métodos.....	29
I.2.1.- Material de laboratorio.....	29
I.2.2.- Quesos.....	30
I.2.3.- Recuento de los diferentes grupos microbianos durante la elaboración y maduración .....	31
I.2.3.1.- Toma de muestras.....	31
I.2.3.2.- Homogeneización de las muestras y preparación de diluciones ..	31
I.2.3.3.- Recuento de los diferentes grupos microbianos .....	31
I.2.3.3.1.- Flora aerobia mesófila total.....	31
I.2.3.3.2.- Flora aerobia psicrotrofa total .....	32
I.2.3.3.3.- Flora acidoláctica.....	32
I.2.3.3.4.- Enterococos .....	33
I.2.3.3.5.- Micrococcaceae .....	33
I.2.3.3.6.- Enterobacteriaceae .....	33
I.2.3.3.7.- Mohos y levaduras.....	34

---

I.2.4.- Determinación de parámetros físico-químicos.....	34
I.3.- Resultados.....	34
I.3.1.- Evolución de los recuentos de los diferentes grupos microbianos durante la elaboración y maduración .....	34
I.3.2.- Evolución de los parámetros físico-químicos más relevantes.....	42
I.3.3.- Correlación entre los recuentos microbianos y los parámetros físico-químicos durante la elaboración y maduración .....	43
I.4.- Discusión.....	45
I.5.- Bibliografía .....	49

## **CAPÍTULO II.- ESTUDIO DE LA FLORA ACIDOLÁCTICA DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA..... 55**

II.1.- Introducción .....	55
II.1.1.- Metabolismo del citrato en las bacterias acidolácticas.....	57
II.1.2.- Capacidad proteolítica y lipolítica de las bacterias acidolácticas y acción inhibitoria sobre microorganismos patógenos y alterantes.....	58
II.1.2.1.- Papel en la proteólisis .....	58
II.1.2.2.- Actividad peptidasa .....	59
II.1.2.3.- Papel en la lipólisis.....	60
II.1.2.4.- Acción inhibitoria sobre microorganismos patógenos y de deterioro.....	61
II.2.- Material y Métodos .....	61
II.2.1.- Material de laboratorio.....	61
II.2.2.- Métodos.....	61
II.2.2.1.- Aislamiento de las cepas.....	61
II.2.2.2.- Adscripción a género.....	62
II.2.2.3.- Adscripción a especie .....	64
II.3.- Resultados.....	67
II.4.- Discusión .....	75
II.5.- Bibliografía .....	79

## **CAPÍTULO III.- ESTUDIO DE LOS ENTEROCOCOS AISLADOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA ..... 87**

III.1.- Introducción.....	87
III.2.- Material y Métodos .....	90
III.2.1.- Material de laboratorio .....	90
III.2.2.- Métodos .....	91
III.2.2.1.- Aislamiento de las cepas .....	91
III.2.2.2.- Adscripción a género.....	91
III.2.2.3.- Identificación a nivel de especie .....	93
III.3.- Resultados .....	94
III.4.- Discusión .....	99
III.5.- Bibliografía.....	100

---



**CAPÍTULO IV.- ESTUDIO DE *ENTEROBACTERIACEAE* AISLADAS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA ..... 105**

IV.1.- Introducción.....	105
IV.2.- Material y Métodos.....	107
IV.2.1.- Material de laboratorio .....	107
IV.2.2.- Métodos .....	108
IV.2.2.1.- Aislamiento de las cepas .....	108
IV.2.2.2.- Identificación de las cepas.....	108
IV.3.- Resultados .....	109
IV.4.- Discusión.....	113
IV.5.- Bibliografía.....	115

**CAPÍTULO V.- ESTUDIO DE *MICROCOCCACEAE* AISLADAS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA..... 119**

V.1.- Introducción.....	119
V.2.- Material y Métodos .....	121
V.2.1.- Material de laboratorio .....	121
V.2.2.- Métodos .....	121
V.2.2.1.- Aislamiento de las cepas .....	121
V.2.2.2.- Identificación de las cepas.....	121
V.2.2.3.- Ensayo de la producción de enterotoxinas producidas por las cepas de estafilococos .....	126
V.3.- Resultados .....	126
V.4.- Discusión .....	132
V.5.- Bibliografía.....	135

**CAPÍTULO VI.- ESTUDIO DE LAS LEVADURAS AISLADAS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA..... 141**

VI.1.- Introducción.....	141
VI.2.- Material y Métodos.....	145
VI.2.1.- Material de laboratorio .....	145
VI.2.2.- Métodos .....	145
VI.2.2.1.- Aislamiento de cepas .....	145
VI.2.2.2.- Identificación de las cepas.....	145
VI.2.2.3.- Ensayo de algunas propiedades de interés tecnológico en las cepas identificadas .....	152
VI.3.- Resultados .....	152
VI.4.- Discusión.....	163
VI.5.- Bibliografía.....	166

**CAPÍTULO VII.- ESTUDIO DE LOS MOHOS AISLADOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA..... 169**

VII.1.- Introducción .....	169
VII.1.1.- Papel de los mohos en la maduración de los quesos Actividad proteolítica y lipolítica .....	169
VII.1.2.- Importancia de los mohos y sus toxinas en el queso .....	171

---

VII.1.3.- Factores que afectan al crecimiento de los mohos y a la producción de micotoxinas.....	174
VII.1.3.1.- Condiciones de desarrollo de los mohos.....	176
VII.1.3.2.- Condiciones de producción de micotoxinas.....	177
VII.2.- Material y Métodos.....	177
VII.2.1.- Material de laboratorio.....	178
VII.2.2.- Métodos.....	178
VII.2.2.1.- Aislamiento de las cepas.....	178
VII.2.2.2.- Identificación de las cepas.....	179
VII.2.2.2.1.- Identificación a nivel de género.....	179
VII.2.2.2.2.- Identificación a nivel de especie.....	185
VII.3.- Resultados.....	209
VII.4.- Discusión.....	209
VII.4.1.- Metodología de identificación.....	212
VII.4.2.- Especies de mohos presentes en el queso de Armada y su papel en la maduración.....	214
VII.5.- Bibliografía.....	221

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>225</b>
---------------------------	------------

<b>APÉNDICE .....</b>	<b>225</b>
-----------------------	------------

Medios y reactivos empleados en el aislamiento e identificación de:

1.- Bacterias acidolácticas .....	225
2.- Enterococos .....	229
3.- <i>Enterobacteriaceae</i> .....	231
4.- <i>Micrococcaceae</i> .....	233
5.- Levaduras .....	239
6.- Mohos .....	239
7.- Bibliografía.....	248

# INTRODUCCIÓN

## 1.- ORIGEN Y SITUACIÓN ACTUAL DE LAS EXPLOTACIONES CAPRINAS. PRODUCCIÓN DE LECHE Y QUESO

La cría de ganado caprino y ovino se remonta a las primeras civilizaciones humanas asentadas en el área mediterránea. El hombre comenzó a explotar estos animales para obtener piel, carne y leche.

Las cabras tienen gran resistencia y capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas lo que hizo que fuesen animales muy apreciados por el hombre y que en torno a ellos se organizaran determinadas formas de vida (pastoreo).

Con las primeras elaboraciones de queso el hombre encontró una excelente forma de conservación de la leche. Si unimos esta característica a las cualidades organolépticas que posee, se puede explicar que haya representado un alimento de gran consumo, ligado a diferentes culturas. Es lógico suponer que el queso haya tenido un origen totalmente fortuito, bien porque un día se dejó la leche al aire libre con lo que ésta se acidificó y coaguló o porque el cuajar de los rumiantes se utilizara para fabricar envases donde almacenar y transportar la leche lo que igualmente conduciría a la coagulación de ésta.

También parece probable que el queso surgiera en diferentes y alejadas civilizaciones y que no lo hiciera de modo simultáneo en todas ellas. Algunos autores señalan que los pueblos que se asentaban a las orillas de los ríos Tigris, Ganges, Eúfrates e Indo 6000 ó 7000 años a.C. podrían haber sido unos de los primeros en utilizar la leche para la fabricación de mantequilla y queso (Battistotti y col., 1985; Cenzano, 1992). Cada civilización desarrollaría métodos propios de elaboración de quesos que irían siendo intercambiados y mejorados con el tiempo, obteniendo una tecnología cada vez más avanzada que, junto con el desarrollo industrial, ha permitido obtener productos de excelente calidad cuyas técnicas de elaboración se encuentran inexorablemente ligadas a la propia historia del hombre.

---

A pesar de que el ganado caprino había sido de vital importancia para el hombre, sobre todo en las poblaciones situadas en el área mediterránea, a medida que se fueron imponiendo formas de vida alternativas el pastoreo fue perdiendo importancia, se empezó a asociar la cría de ganado caprino con una economía más precaria y se fue sustituyendo por ganado bovino y ovino de más fácil explotación. Entre otras causas de este cambio podemos señalar que la leche de cabra destinada al consumo directo fue paulatinamente disminuyendo dedicándose en su mayor parte a la elaboración de quesos, se necesitaba un mayor censo caprino para equiparar la producción lechera a la del ganado bovino, se contaba con pocas instalaciones que garantizaran higiene y comodidad en la producción y además la estacionalidad en ésta impedía mantener un suministro más o menos constante a lo largo del año.

Sin embargo, desde hace unos pocos años parece haber resurgido el interés por la cría y aprovechamiento del ganado caprino y la C.E. contempla subvenciones para desarrollar un programa de mejora de la explotación de estos pequeños rumiantes ya que representan un recurso tradicional de determinadas áreas en desarrollo y una fuente de productos de gran calidad. El queso que se elabora con leche de cabra destaca por su carácter "propio", muy tradicional y de gran calidad nutritiva. España podría beneficiarse al respecto ya que ocupa un lugar importante en el censo de ganado caprino y en la producción de leche de cabra.

El creciente interés en Europa por productos elaborados con leche de cabra podría deberse a la tendencia a consumir productos tradicionales, a las características organolépticas que presentan estos quesos y a las características diferenciales respecto al resto. El desarrollo del mercado de los productos lácteos caprinos en Europa está ligado a una mejor protección e identidad de los productos que afecte tanto a los productos tradicionales como a los nuevos productos industriales que son los responsables de ofrecer al consumidor una mayor diversificación en la producción (Le Jaouen y Toussaint, 1993). Además, desde el punto de vista nutricional la leche de cabra posee dos ventajas sobre la de vaca, la ausencia de reacciones alérgicas que muestran ciertos individuos a antígenos específicos de la leche de vaca, y su mayor digestibilidad (Parkash y Jenness, 1968; Juárez y Martín-Hernández, 1989).

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A.) en el Anuario de Estadística Agraria de 1991, (publicado en mayo de 1994) hace referencia al censo de ganado caprino y a la producción de leche de cabra. Según la fuente de consulta el censo de ganado caprino en Europa comprendía en 1989 aproximadamente el 3% del ganado caprino mundial, África el 31,5% y Asia el 58%. La C.E. contaba con el 78% del ganado caprino europeo, siendo los países mediterráneos los que contribuyen de modo más importante (Grecia, el 37%, España el 19%, Italia y Francia el 8%).

La C.E. tiene un total de 12.355.000 cabezas, de las que 2.972.000 pertenecen a España, sólo por detrás de Grecia. Grecia, España, Italia y Francia abarcan el 92% del total de efectivos caprinos de la C.E.

---

En Castilla y León el censo de ganado caprino en 1991 era de 214.847 cabezas, situándose en 4ª posición en el análisis por Comunidades Autónomas detrás de Andalucía, Castilla-La Mancha y Extremadura. En León el número de efectivos era de 36.709. Según los datos publicados por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, el censo de ganado caprino en España en el año 1992 abarcaba un total de 2.836.703 cabezas y de éstas 196.165 correspondían a Castilla y León.

Entre las razas predominantes en Castilla y León figuran la Serrana, Murciano-Granadina, Canaria y Pirenaica. También existe un número de efectivos muy alto que se incluye en cruces y "otras razas" de los que muchos son difíciles de situar en entidades étnicas concretas.

Por lo que respecta a la producción de leche de cabra referente al año 1991, África y Asia abarcaron el 76% del total mundial, con el 22% y el 54% respectivamente, Europa representó el 18% y la C.E. el 16%.

La producción mundial de leche de cabra en 1991 fue de 10.079.000 Tm. La C.E. produjo 1.600.000 Tm; del total de la producción comunitaria Grecia contribuyó con el 29%, Francia con el 32,5%, España con el 26% e Italia con el 8%, de modo que tres países (Grecia, España y Francia ) reúnen casi el 88% de la producción comunitaria de leche de cabra.

Según datos del M.A.P.A. que figuran en el Anuario de Estadística Agraria de 1991 (publicado en 1994) España produjo 290.473.000 litros, de los que 15.354.000 litros corresponden a Castilla y León y 483.000 litros fueron producidos en la provincia de León. Del total de leche de cabra producida en España en 1991, 234.948.000 litros se destinaron a Centrales e Industrias Lácteas, 25.661.000 litros a la fabricación artesanal de queso y el resto al consumo humano directo.

En los países industrializados el consumo directo de leche de cabra ha venido disminuyendo, mientras que está aumentando la proporción destinada a la elaboración de quesos, tanto artesanales como industriales y en particular quesos de mezcla con otras leches. A este respecto hay que señalar que, excepción de lo que ocurre en Francia, se han identificado muy pocos quesos que sean fabricados únicamente con leche de cabra. Francia posee 6 Denominaciones de Origen entre aproximadamente 50 variedades de quesos de cabra (Le Jaouen y Toussaint, 1993).

La producción mundial de quesos en 1992 representó aproximadamente 15 millones de Tm y la de la C.E. fue de unos 5,2 millones de Tm, es decir más de 1/3 de la producción mundial. La producción comunitaria de quesos ha registrado un incremento incesante en los últimos años, registrando un alza del 21% desde 1983 hasta 1991 y del 2% entre 1991 y 1992.

La C.E. produce unas 100.000 Tm de queso puro de cabra, de 150.000 a 200.000 Tm de queso puro de oveja y aproximadamente 200.000 Tm de queso de mezcla que tiene gran importancia en países como Grecia y España, (Herrero, 1993).

La C.E. es una verdadera potencia quesera en la que los principales productores son Francia (30%), Alemania (24%), Italia (14%), Países Bajos (13%) y Reino Unido (7%) (Weber, 1993). El incremento anual de la producción se sitúa en un 2% (Cenzano, 1992).

La tendencia de la producción quesera presenta notables diferencias según los países y, mientras en Dinamarca, Francia, Holanda, Portugal, Inglaterra e Irlanda la producción desciende o bien se mantiene estable, en Alemania y sobre todo en España se incrementa (Weber, 1993).

Si consideramos todas las variedades de quesos, la producción quesera en España es de aproximadamente 200.000 Tm al año (un 3% de la producción comunitaria) incluyendo producción industrial y artesana, ocupando el 8º puesto en la C.E. lejos de Francia y Alemania que producen más de un millón de Tm anuales (Herrero, 1993). En España la leche de cabra que llega a las industrias se destina en su mayor parte a la elaboración de quesos de mezcla, siendo los quesos de cabra principalmente de elaboración artesanal.

El consumo de queso en España, a pesar de haberse incrementado de 3,6 Kg/habitante/año en 1980 a 6 Kg/habitante/año en 1990 (Herrero, 1993), sigue resultando muy bajo si se compara con el de Francia o Grecia con 22 Kg/habitante y año.

En el "Catálogo de quesos de España" (M.A.P.A., 1992) se recogen 81 variedades de quesos tradicionales: 25 quesos puros de cabra, 19 quesos puros de vaca, 14 quesos puros de oveja, 7 quesos de mezcla oveja y cabra, 3 quesos de mezcla de vaca y cabra, 6 quesos de mezcla de vaca y oveja y 10 quesos de mezcla vaca, oveja y cabra. Como se puede apreciar la leche de cabra es empleada en la elaboración de la mayoría de las variedades de quesos.

En Castilla y León se elaboran 4 variedades de quesos de cabra: los de Babia y Laciana, Valdeteja, Armada (a veces elaborado con mezcla de leche de cabra y vaca) y Valdeón (elaborado fundamentalmente con leche de cabra aunque a veces lleva mezcla de leche de vaca).

## **2.- SITUACIÓN ACTUAL DEL QUESO DE ARMADA**

El queso de Armada se elabora en el Noroeste de la provincia de León, inicialmente en los pueblos de Armada, Vegamián, Lodaes y Camposolillo (hoy inundados por el pantano del Porma); actualmente los principales núcleos de elaboración son las localidades de Primajas y Viego.

---

En el Catálogo de quesos de España (M.A.P.A., 1992) se describe como "un queso madurado de semicurado a curado, de pasta compactada y esporádicamente con la corteza y el interior enmohecidos, elaborado con leche calostrada de vaca, cruda y entera, de forma artesanal, extragraso. Tiene forma de prisma cuadrangular y un peso de 1 a 1,5 kg".

Aunque antiguamente se empleaba para su elaboración leche calostrada cruda de vaca, más recientemente se utiliza leche cruda y entera de cabra y vaca o únicamente de cabra, y se sigue elaborando exclusivamente de modo artesanal.

Se conocen tres variedades (Sobado, Mortera y Quemón), la variedad Sobado es la más difundida y apreciada y se elabora casi exclusivamente con leche de cabra.

### **3.- TIPIFICACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

La Tipificación, Especificidad o Caracterización de un producto se puede definir como la originalidad que lo distingue de otro. Para identificar el producto se le da una Denominación de Origen (D. O.) y se le incluye en un tipo, protegiéndole así de posibles imitaciones y adquiriendo valor comercial.

La tipificación de un producto hace referencia también a la "zona de elaboración", por lo que también adquiere importancia la vegetación y la raza lechera propias de cada zona (Linden y Chamba, 1994).

La caracterización de un queso se realiza en base a unos estudios bioquímicos, físico-químicos y microbiológicos, con el objeto de que conociendo a fondo el proceso de fabricación, las características reológicas y organolépticas, la composición química, la evolución que sufren los parámetros composicionales y físico-químicos del queso así como el comportamiento o evolución de la flora microbiana, sea posible realizar la fabricación a nivel industrial, consiguiendo así un producto con garantías higiénico-sanitarias, uniforme y con unas características propias que permitan su diferenciación. Es decir, un producto de calidad que sea competitivo en el mercado.

Con la caracterización del queso de Armada (variedad Sobado), así como la de otros quesos de nuestra comunidad autónoma, se intenta recuperar la elaboración artesanal, iniciando a su vez la industrial en aquellos quesos que pueden llegar a tener una buena aceptación en los mercados si se logra poner a punto un sistema de elaboración que permita la obtención de un producto homogéneo (el problema de la falta de homogeneidad es, juntamente con la falta de control sanitario, el principal obstáculo para la difusión de estas variedades) que conserve los atributos de calidad de los mejores quesos artesanos.

---

### 3.1.- PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN

El queso de Armada, variedad Sobado, se elabora de forma totalmente artesanal, comprendiendo el proceso de elaboración una serie de operaciones de carácter general con pequeñas particularidades dependiendo del artesano elaborador.

#### - Selección y preparación de la leche:

Se parte de leche cruda y entera de cabra recién ordeñada, adicionada de una pequeña cantidad de suero procedente de fabricaciones del día anterior. La leche se mantiene a temperatura ambiente o bien se somete a un calentamiento a 30°C (en función de la época del año). A continuación se añaden 15 ml de cuajo de fuerza 1/10.000 por cada 100 l. de leche.

#### - Coagulación:

La coagulación transcurre en aproximadamente 1 hora, se trata de una coagulación mixta (ácido-enzimática) ya que la temperatura y el volumen de cuajo empleado permiten el crecimiento de la flora láctica. El gel formado posee unas características intermedias entre un coágulo ácido (friable, poroso y desmineralizado) y otro enzimático (elástico, firme y poco permeable).

#### - Desuerado:

Finalizada la coagulación se realizan sobre la cuajada 3 cortes radiales y se deja 1 hora en reposo. Transcurrido ese tiempo la cuajada se corta en trozos más pequeños y se transfiere a lienzos de tela haciendo fardeles que se cuelgan dejándolos desuerar durante 48 horas, a continuación se deshacen los fardeles y la cuajada se somete al primer sobado (que consiste en un amasado intenso a mano), se ata en lienzos limpios y se cuelga durante 72 horas más para que el goteo de suero continúe. Al cabo de estos tres días se vuelve a someter la cuajada a un segundo sobado.

Si la cuajada tiene consistencia suficiente se procede al moldeado, si no fuera así se trasladaría a un nuevo lienzo y se dejaría desuerar 24 horas más, dándole luego un tercer sobado.

#### - Salazonado:

En el queso de Armada el salazonado se realiza espolvoreando sal gruesa en la cuajada, durante el segundo sobado de la cuajada. Como el salazonado no se realiza de modo normalizado el contenido en sal varía bastante de unos quesos a otros.

---



### - Moldeado:

El moldeado en la elaboración del queso de Armada se realiza a mano, dándole una forma de prisma cuadrangular. Tras el moldeo los quesos se dejan en un plato durante unos 7 días a 20°C y baja humedad relativa (H.R.) para que adquieran consistencia (secado).

### - Maduración:

La maduración de este queso se realiza en fardeles de lienzo, colgados del techo en habitaciones en las que se hizo un seguimiento de la temperatura y humedad relativa, oscilando entre 15-20°C y 65-75% de Tª y H.R. respectivamente, en los meses de verano y 4-10°C y 80-85% de Tª y H.R. respectivamente, en otoño. Los fardeles se descuelgan periódicamente y los quesos se envuelven en lienzos nuevos, volviéndolos a colgar. La duración de la maduración varía entre 2 meses y 1 año y se obtienen piezas de queso con un peso entre 1 y 1,5 Kg.

## 3.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL QUESO DE ARMADA Y DE LA LECHE UTILIZADA EN SU ELABORACIÓN

El queso de Armada (producto final) y la leche empleada para su elaboración presentan en sus parámetros composicionales y físico-químicos más relevantes los valores siguientes (Fresno, 1994):

	E.S.	Proteína	Grasa	Lactosa	Ceniza	NaCl	pH	Aw	Acidez titul.
<b>Leche</b> (% p/p)	15,81	4,35	5,58	4,83	0,87	0,10	6,59		0,17
<b>Queso</b> (% E.S.)	78,85	37,14	56,66	N.D.	3,74	2,18	4,96	0,88	1,75

N.D. : No detectada.

Atendiendo a la clasificación que hace el Código Alimentario (B.O.E., 1991), el queso de Armada se encontraría formando parte del grupo denominado "Extragraso" (>45% grasa/E.S), si bien estaría próximo al grupo de los denominados "Dobles grasos" (>60% grasa/E.S.). De acuerdo con la clasificación dada por Favier y Dorsainvil (1987), basada en la Reglamentación Francesa, se incluiría dentro del grupo de los "Quesos secos" (52,1-61,9% grasa/E.S. y <35% de humedad).

### **3.3.- PRINCIPALES FENÓMENOS BIOQUÍMICOS QUE TIENEN LUGAR DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA (Fresno, 1994):**

El desarrollo de la textura, sabor y aroma va a venir determinado por cambios bioquímicos y microbiológicos que transcurren durante la elaboración y maduración del queso. Los principales procesos bioquímicos que tienen lugar son la proteólisis, glucólisis y lipólisis que determinan que unos compuestos se vayan transformando en otros que a su vez serán degradados y cuyo origen puede tener lugar también por vías diferentes. Esta formación y degradación de compuestos que ocurre en la totalidad de los quesos difiere en unos y otros en la intensidad con que se producen, factor que pasará a determinar las características del producto final. Los agentes responsables de estas reacciones bioquímicas son el cuajo residual, las enzimas nativas de la leche y las enzimas de origen microbiano.

La lactosa, en el queso de Armada, sufre una rápida degradación durante los 7 primeros días de maduración y desaparece completamente a los 15 días, esta disminución se corresponde con un aumento en el contenido en ácido D y L-láctico y en la acidez titulable y con un descenso del pH. El rápido descenso de la lactosa puede deberse a un intenso desuerado y acentuado crecimiento de la flora acidoláctica en las primeras fases de la maduración (condicionado por el momento en que se realiza el salazonado, 5 días después de la coagulación).

En la cuajada predomina el ácido L-láctico debido al intenso crecimiento microbiano (los lactococos transforman la lactosa en L-lactato), a partir de la primera semana de maduración aumenta la concentración en D-lactato como consecuencia probablemente del desarrollo de lactobacilos y de las reacciones de racemización, al final de la maduración ambas formas se encuentran en concentraciones similares (0,73 y 0,79 g/100 g E.S. para los ácidos L- y D-láctico, respectivamente).

En cuanto a la evolución del pH, éste desciende en las primeras etapas del proceso madurativo. A partir de los 15 días de maduración, los valores se van incrementando paulatinamente, para al final alcanzar unos valores en torno a 5.

El pH es determinante en la textura del queso y los bajos pH que se aprecian en el queso de Armada ya desde los primeros momentos de la maduración son posiblemente responsables de la textura friable que le caracteriza.

El contenido en minerales (Ca, P y Zn) es superior al que presentan los quesos de cabra elaborados exclusivamente por coagulación ácida, pero inferiores a los elaborados por coagulación enzimática. En general, el descenso del contenido en calcio a lo largo de la maduración es superior al del fósforo, ya que, debido al tipo de enlaces que les une al resto de

---

componentes, el calcio es más susceptible a la acidificación y se solubiliza con mayor facilidad. Los valores finales medios son 5,69 g/Kg E.S. y 6,16 g/Kg E.S. para el Ca y P respectivamente y 29,65 mg/Kg E.S. para el Zn.

En cuanto a los fenómenos proteolíticos, el porcentaje de nitrógeno soluble total respecto al nitrógeno total, que se toma como índice de la maduración, es, al final del proceso madurativo, 9,68, valor que prácticamente se alcanzó ya al cabo de los primeros 7 días de maduración y es indicativo de la escasa proteólisis que sufre este queso. Se aprecian aumentos significativos en el nitrógeno no proteico en los primeros 7 días y desde los 2 meses de maduración hasta el final de la misma. Los incrementos más importantes se observaron en la evolución del nitrógeno amínico y el nitrógeno amoniacal que llegan a representar el 55,3% y el 19,1% del nitrógeno no proteico, respectivamente. El contenido en nitrógeno peptídico se incrementó significativamente durante los primeros 7 días de maduración y luego disminuyó significativamente entre los 7 y 60 días representando hacia el final del proceso madurativo el 25,6% del nitrógeno no proteico y el 1,88% del nitrógeno total. El descenso que sufre el contenido en nitrógeno peptídico está relacionado con el aumento que sufre el nitrógeno amínico y el nitrógeno amoniacal.

Estos resultados parecen corroborar que la proteólisis es llevada a cabo en dos etapas, la primera que se debe a la acción del cuajo sobre las  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$ -caseína, que las degrada a péptidos de gran tamaño y la segunda, debida a las bacterias acidolácticas (BAL) y a otros microorganismos que pueden degradar los macropéptidos a otros más pequeños y a aminoácidos.

En los estudios electroforéticos efectuados en geles de poliacrilamida se aprecia una débil degradación de las fracciones de caseína, principalmente de la fracción  $\alpha_s$ , que se traduce en un ligero incremento en la fracción pre- $\alpha_s$  durante los primeros días de la maduración. La  $\beta$ -caseína (principal sustrato de la plasmina) permanece prácticamente inalterada a lo largo de la maduración y este fenómeno se refleja también en la constancia de la fracción  $\gamma$ -caseína.

La acción del cuajo se ejerce principalmente sobre la  $\alpha_{s1}$ caseína y en menor medida sobre la  $\beta$ -caseína, pudiendo el pH ácido frenar la acción del cuajo sobre ambas fracciones de caseína (son inhibitorios pH < 5,8 para la  $\alpha_{s1}$  y pH < 6,4 para la  $\beta$ -caseína). El valor del cociente sal/humedad del queso también condiciona la acción del cuajo sobre las caseínas.

Por lo que respecta a los fenómenos lipolíticos, se observa una evolución similar en el índice de acidez de la grasa y en el contenido en ácidos grasos libres. Esta evolución se caracteriza por un incremento a lo largo de toda la maduración, más acusado a partir del primer mes.

El índice de acidez de la grasa aumenta de 1,20 en cuajada a 26,31 mg KOH/g de materia grasa al final de la maduración, lo que indica la gran intensidad de los procesos degradativos de la grasa. Los valores finales de este índice resultan muy similares a los que poseen las variedades de quesos azules y son superiores a los descritos para otros quesos de cabra estudiados. El contenido en ácidos grasos (A.G.) libres se incrementa aproximadamente 20 veces a lo largo de la maduración.

Al inicio de la maduración predominan los A.G. libres de cadena larga (C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>), seguidos de los de cadena media (C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub>) y los de cadena corta (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub>), con porcentajes del 33%, 28,6% y 19,3% respectivamente. Al final de la maduración los A.G. libres de cadena corta descienden (respecto a los ácidos grasos totales) a un 14,5%, mientras que los A.G. libres de cadena media y larga se mantienen con un 27% y un 32% respectivamente. Los A.G. libres insaturados (oleico) aumentan y pasan del 19% al 27%. El contenido en A.G. libres de cadena corta es más elevado en el queso de Armada que en otros quesos de cabra estudiados.

### **3.4.- CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS**

Hasta el momento actual no se ha realizado ningún estudio sobre las características microbiológicas de esta variedad, desconociéndose el tipo de flora que predomina en las distintas etapas del proceso madurativo, así como las especies microbianas más abundantes y que son en buena parte reponsables de los cambios bioquímicos que se operan en esta variedad a lo largo del afinado.

## **4.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS**

Podríamos considerar la leche como un ecosistema que alberga una población microbiana muy diversa. Con los cambios que se producen durante la transformación de la leche en queso unas poblaciones microbianas van sucediendo a otras en función de las condiciones del medio que son modificadas continuamente por varios factores, entre ellos el propio metabolismo microbiano.

La población microbiana más representativa en los productos lácteos y por tanto en el queso son las bacterias acidolácticas que utilizan la lactosa como fuente de carbono y energía y la transforman en ácido láctico, compuesto que ejerce un efecto selectivo ya durante la elaboración y en las primeras etapas de la maduración.

Los microorganismos intervienen en la maduración de los quesos a través de la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas que según su lugar de acción pueden ser extracelulares o intracelulares. Las enzimas extracelulares son liberadas por la célula al medio circundante y es entonces cuando ejercen su acción sobre los sustratos, las intracelulares no

---

son liberadas hasta que la célula muere o se lisa, por lo que hay que tener en cuenta que después de que una población microbiana haya desaparecido sus enzimas pueden seguir actuando.

Los enterococos son muy proteolíticos, el resto de las BAL participan en la proteólisis degradando péptidos y aminoácidos, si bien su efecto no es muy acentuado. Los micrococos y los mohos pueden también tener importancia en la degradación de las proteínas. La degradación de los lípidos es, fundamentalmente responsabilidad de los mohos, siendo los quesos azules los que presentan un índice de acidez de la grasa más elevado.

El queso de Armada, variedad Sobado, se elabora en la actualidad a partir de leche cruda, sin adición de cultivos iniciadores, con lo cual el proceso madurativo es efectuado únicamente por la flora autóctona de la leche. Esta situación unida a la ausencia de controles de la temperatura y de la humedad relativa de las atmósferas durante la maduración hace que la calidad y características del producto final sean muy heterogéneas. Esta falta de uniformidad limita su aceptabilidad y su difusión en los mercados. Por otra parte, aunque no existen noticias de que su consumo haya causado problemas de salud, es un producto potencialmente inseguro y podría causar en el futuro problemas si no se mejoran sus condiciones de producción.

La pasteurización de la leche destinada a su elaboración, la utilización de cultivos iniciadores propios y el control de las condiciones ambientales de maduración permitirían la elaboración de un producto sanitariamente seguro y de calidad uniforme.

La inexistencia de datos acerca de las características microbiológicas del queso de Armada (variedad Sobado) y la necesidad de conocer cuáles son las poblaciones microbianas de mayor influencia en la maduración de este queso nos llevó a plantear el estudio microbiológico de esta variedad.

El estudio de la evolución de las poblaciones microbianas a lo largo de la elaboración y maduración del queso de Armada (variedad Sobado) nos permitirá conocer qué microorganismos son los más abundantes durante estos procesos y cómo se van sucediendo unos a otros, pudiendo luego interrelacionar estos hechos con los cambios físico-químicos del queso a lo largo de la maduración. Se pretende a su vez identificar un número representativo de aislamientos de cada grupo microbiano, al objeto de conocer las especies mayoritarias y que presumiblemente son las responsables del proceso madurativo

La identificación de las especies microbianas presentes tendría como objetivo futuro la elaboración de un cultivo iniciador destinado a la fabricación a nivel industrial, partiendo de leche pasteurizada, de un producto uniforme que guardase la mayor similitud posible con el queso elaborado por procedimientos artesanales.

---

El estarter debe ser responsable de la producción de ácido láctico, digestión de la cuajada y desarrollo del aroma y la textura característica de la variedad. En una fase posterior del trabajo, ya fuera del ámbito de esta Tesis, se ensayaría la aptitud tecnológica de las especies seleccionadas, para, a la luz de los cambios bioquímicos acaecidos en el queso a lo largo de la maduración, poder determinar la responsabilidad de las distintas especies en el proceso madurativo.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

BATTISTOTTI, B., BOTTAZZI, V., PICCINARDI, A. y VOLPATO, G. (1985). Quesos del mundo. Elfos (Barcelona).

CENZANO, I. (1992). *Los quesos en España*. En Los quesos. AMV Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid. p. 23.

CÓDIGO ALIMENTARIO. (1991). Clasificación de los quesos. En el capítulo XV: Leches y derivados, p. 105-106. B.O.E. Madrid.

ECK, A. (1990). *El queso*. Omega. Barcelona.

FAVIER, J.C. y DORSAINVIL, E. (1987). Composition des fromages de chèvre. *Cah. Nutr. Diét.*, 22:117.

FRESNO, J.M. (1994). *Tipificación y estudio bioquímico del proceso madurativo del queso de Armada*. Tesis Doctoral.

HERRERO, L. (1993). Quesos de cabra y oveja: arcaísmo, tradición y futuro. *ILE*. N. 175:17-23.

JUÁREZ, M. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, M.C. (1989). Características de leche y quesos de cabra españoles. *Alimentación, equipos y tecnología*, Julio-Agosto:133-137.

LE JAOUEN, J.C. y TOUSSAINT, G. (1993). Le lait de chèvre en Europe. *Lait*, 73:407-415.

LINDEN, G. y CHAMBA, J.-F. (1994). La typicité des fromages: une réalité, un objectif. *Sciences des Aliments*, 14:573-580.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPA). (1992). *Catálogo de quesos de España*.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPA). (1994). *Anuario de estadística agraria de 1991*.

---

PARKASH, S. y JENNESS, R. (1968). The composition and characteristics of goat's milk: a review. Dairy Sci. Abstr., 30:67-87.

WEBER, F. (1993). El sector lácteo en Europa. Revista española de lechería. Mayo:38-42.





# **CAPÍTULO I. EVOLUCIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

El grupo microbiano de mayor importancia en la leche y los productos lácteos tanto desde el punto de vista cuantitativo como metabólico son las bacterias acidolácticas (BAL). Las BAL degradan la lactosa y producen ácido láctico, a través bien de la ruta de las hexosas difosfato (ruta de Embden-Meyerhof o Glucolítica) o de las pentosas-fosfato.

Mediante la primera ruta (homoláctica) se obtiene como único producto de la degradación anaeróbica de la glucosa ácido láctico; ocurre en lactococos y lactobacilos homofermentadores. Los lactobacilos homofermentadores del grupo *Streptobacterium* se consideran homofermentativos facultativos, ya que aunque la degradación de las hexosas la llevan a cabo exclusivamente por la ruta de Embden-Meyerhof poseen también las enzimas de la vía de las Pentosas-fosfato y pueden fermentar pentosas y ácido glucónico, en cambio los lactobacilos del grupo *Thermobacterium* (homofermentadores obligados) no pueden llevar a cabo la asimilación de pentosas y del ácido glucónico por carecer de las enzimas de la vía de las pentosas-fosfato. La vía de las pentosas-fosfato o vía heterofermentativa o heteroláctica transcurre con la formación a partir de la glucosa de una mezcla equimolecular de lactato, etanol y CO<sub>2</sub>, se da en leuconostocs y en lactobacilos heterofermentativos. La principal diferencia entre las dos vías está en los rendimientos netos de ATP, dos moles de ATP por molécula de glucosa fermentada para la homoláctica y 1 mol de ATP para la heteroláctica.

Las BAL también difieren en el tipo de ácido láctico formado, producen isómeros D y L del lactato en función de que posean D-lactato deshidrogenasa o L-lactato deshidrogenasa o bien dos enzimas con distinta especificidad en cuyo caso se formaría ácido láctico racémico (Stanier y col., 1984):

---

Lactococos	L-lactato
Leuconostoc	D-lactato
Pediococos	DL-lactato
Lactobacilos homofermentativos (Streptobacterium)	L-, DL-lactato
Lactobacilos homofermentativos (Thermobacterium)	D-, L-, DL-lactato
Lactobacilos heterofermentativos	DL-lactato

Las BAL también poseen actividad proteolítica, degradan principalmente péptidos y aminoácidos y son los principales responsables de los cambios en el nitrógeno soluble, constituido por péptidos de cadena corta y aminoácidos. La formación de nitrógeno amínico y nitrógeno amoniacal parece deberse fundamentalmente a la acción de las bacterias lácticas (Gripon y col., 1975; Desmazeaud y col., 1976). Tienen sistemas enzimáticos complejos, constituidos por aminopeptidasas, dipeptidasas y tripeptidasas, siendo los lactobacilos especialmente ricos en exopeptidasas.

El sustrato principal de las BAL es la  $\alpha_{s1}$  caseína o su producto de degradación la  $\alpha_{s11}$  caseína (Desmazeaud y col., 1976). La acción de las bacterias lácticas es, por tanto complementaria a la del cuajo, éste libera péptidos de alto y bajo peso molecular que son luego degradados por las bacterias lácticas a aminoácidos y péptidos de cadena corta (Choisy y col., 1990; Olson, 1990).

Las bacterias lácticas poseen escasa actividad lipolítica, actuando más fácilmente sobre la materia grasa ya parcialmente hidrolizada (Choisy y col., 1990.). Cuando se encuentran en alto número y durante largo tiempo en contacto con el sustrato las bacterias lácticas pueden hidrolizar la grasa de la leche (Fryer y col., 1967; Kamaly y col., 1990). En lactococos y lactobacilos se han descrito sistemas lipásicos y esterásicos intracelulares (Harper y col., 1980), cuya acción está preferentemente dirigida hacia la liberación de ácidos grasos de cadena corta ( $C_{4:0}$  a  $C_{8:0}$ ) (Kamaly y Marth, 1989). La actividad lipasa de las BAL se manifiesta en un pH de 5 a 9 y parece ser más elevada a pH 7 (Kamaly y col., 1990).

Los enterococos que también se incluyen dentro de las bacterias lácticas por su capacidad para fermentar la lactosa y producir ácido láctico poseen ciertas diferencias que se traducen en un interés no sólo tecnológico (algunas especies son proteolíticas y/o lipolíticas

(Mucchetti y col., 1982; Carrasco de Mendoza y col., 1992)) sino también higiénico-sanitario (pudiendo ser indicadores de contaminación fecal y posibles patógenos).

La familia *Enterobacteriaceae* incluye géneros que indican una contaminación de origen fecal, algunos de los cuales pueden ser enteropatógenos para el hombre; estos microorganismos suelen desaparecer en las primeras etapas de la maduración de los quesos.

Las levaduras y mohos presentes ya en la leche se multiplican durante la maduración del queso y normalmente son los grupos microbianos de evolución más tardía y con recuentos más altos en las etapas finales de la maduración.

Las levaduras que abundan en la leche pertenecen principalmente al género *Candida* y son capaces en su mayoría de metabolizar la lactosa. Mientras unas levaduras se desarrollan en etapas tempranas de la maduración de los quesos, otras en cambio, lo hacen a lo largo de la maduración, utilizando el ácido láctico producido previamente por las bacterias lácticas y contribuyendo así a elevar el pH.

Determinados mohos, como *Geotrichum candidum* son muy frecuentes en los productos lácteos y pueden presentar recuentos elevados en las etapas tempranas de la maduración, mientras que los del género *Penicillium* aparecen en etapas más tardías.

Los mohos poseen un sistema proteolítico que libera péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos. *Penicillium* posee endopeptidasas exocelulares que degradan las caseínas  $\alpha_s$  y  $\beta$ , destaca asimismo la acción importante de la proteasa ácida sobre la  $\beta$ -caseína, así como también la acción de una metaloproteasa. Las exopeptidasas (carboxipeptidasa ácida, carboxipeptidasa alcalina, aminopeptidasa alcalina) degradan fuertemente los péptidos presentes y originan alta cantidad de aminoácidos. Algunas cepas de *Geotrichum candidum* son ricas en endopeptidasas y contribuyen a aumentar el nitrógeno soluble de los quesos, teniendo también acción degradativa sobre los aminoácidos (desaminante) (Choisy y col., 1990).

Los mohos son los microorganismos más lipolíticos de los quesos. *G. candidum* es un moho que se desarrolla al principio de la maduración y contribuye a la hidrólisis de los triglicéridos, asegurando la liberación preferentemente de ácido oleico (Tahoun y col., 1982). En los quesos azules la lipólisis se debe fundamentalmente a *P. roqueforti* que posee dos lipasas de especificidad distinta, una favorecida por pH ácidos y otra por pH neutros (Menassa y Lambert, 1982).

Otro grupo de microorganismos presentes en la leche es el constituido por la familia *Micrococcaceae*. Esta familia incluye fundamentalmente dos géneros de interés: *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

---

Los micrococos acceden a la leche durante y después del ordeño. Se multiplican más activamente cuando las condiciones del medio son más alcalinas, por lo tanto en el curso de la maduración de los quesos su crecimiento se ve favorecido por la previa degradación del lactato y la formación de compuestos básicos. Son más proteolíticos que las bacterias lácticas. Estos microorganismos pueden degradar los productos de la acción del cuajo sobre la caseína, produciendo cambios en el nitrógeno no proteico y en el nitrógeno amínico. Ciertas cepas poseen una metaloproteasa exocelular (pH 7,4) muy activa sobre las proteínas no degradadas, especialmente sobre la  $\beta$ -caseína (Choisy y col., 1990). Los micrococos poseen también lipasas más activas que las de las BAL pero su acción no se aprecia en quesos con mohos o levaduras (Stadhouders y Mulder, 1958).

Los estafilococos son microorganismos indicadores de contaminación humana o animal. La presencia de *Staphylococcus aureus* en número elevado supone el riesgo de permanencia en el alimento de enterotoxinas aún después de que estos microorganismos hayan desaparecido. Algunos estafilococos coagulasa (-) de origen animal pueden también entrañar el riesgo de producción de enterotoxinas.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos en la leche cruda indica el grado de contaminación, si bien son esperables unos recuentos elevados durante la elaboración y primeras etapas de la maduración de los quesos, que se deben a la multiplicación de la flora normal y deseable, mayoritaria frente a los posibles agentes patógenos y alterantes. Si la maduración de los quesos se prolonga, el recuentos de microorganismos aerobios mesófilos irá gradualmente descendiendo como consecuencia de las condiciones físico-químicas más o menos desfavorables, según el grupo microbiano, que se van instaurando durante el proceso.

Las bacterias psicrotrofas, por último, pueden tener mucha importancia cuando la leche es mantenida a temperaturas de refrigeración, a las cuales son capaces de multiplicarse; este grupo incluye microorganismos patógenos y alterantes. Las enterobacterias representan del 5 al 33% de las bacterias psicrotrofas presentes en la leche (Thomas, 1974). Algunos aislamientos de enterococos también pueden crecer a 7°C (Wessels y col., 1990) y tienen actividad proteolítica.

Las bacterias psicrotrofas poseen proteasas y lipasas termorresistentes que pueden producir alteraciones en las características organolépticas de la leche y productos lácteos (Cousin, 1982; Law, 1979). Las lipasas son específicas para la liberación de ácidos grasos de cadena corta, C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>, responsables del sabor a rancio (Stead, 1986; Martín Hernández, 1991). La inducción de proteasas requiere la presencia de una fuente orgánica de nitrógeno, actuando como buenos promotores algunos aminoácidos como asparagina y aspártico (Fairbain y Law, 1986).

A lo largo de este capítulo se estudiará:

- La evolución de los grupos microbianos más importantes desde el punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario, durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado: bacterias acidolácticas (lactococos, lactobacilos, leuconostoc), enterococos, mohos y levaduras, enterobacterias, micrococáceas, flora aerobia mesófila total y flora aerobia psicrotrofa total.
- Los parámetros físico-químicos que influyen en el crecimiento y en la actividad de los sistemas enzimáticos de los microorganismos: pH, acidez titulable,  $A_w$ , contenidos en humedad, cloruros y la interrelación entre los valores de estos parámetros y la evolución de los distintos grupos microbianos durante el proceso madurativo.

## **2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO**

El control de la humedad relativa y temperatura de las salas de maduración se llevó a cabo mediante un Termohigrómetro RATONA THERMOHYGROGRAPH modelo 9708.

Para la incubación de los microorganismos se utilizaron estufas de aire forzado SELECTA modelo DIGITRONIC.

Para esterilizar medios de cultivo, soluciones y determinados materiales se empleó un autoclave SULZER mod. HA-300MII y una olla a presión CERTO-CLAV A-4050.

La esterilización de material de vidrio se realizó en un horno Pasteur HERAEUS a 160°C durante 2 horas.

Las pesadas ordinarias se hicieron en un granatario electrónico OHAUS 1500 D, para las de precisión se utilizó una balanza digital PRECISA 125 A.

Para trabajar en condiciones de esterilidad se empleó una cámara de flujo laminar TELSTAR BV-100.

Los baños de agua utilizados fueron SELECTA TECTRON 3473100 con regulador de temperatura y agitación constante.

Las medidas de pH se llevaron a cabo en un pHmetro CRISON, modelo PHM 82 STANDARD.

---

Para llevar a cabo las homogeneizaciones de las muestras se empleó un STOMACHER 400 LAB BLENDER.

Los agitadores magnéticos utilizados fueron AGIMATIC N de SELECTA y los agitadores de tubos THERMOLYNE modelo M-16710-12 de SYBRON CORPORATION.

El material de vidrio utilizado fue PYREX o de una calidad semejante.

Todo el material de vidrio, puntas de pipeta y utensilios diversos se esterilizó previamente a su utilización, por calor seco o húmedo, siguiendo las prácticas habituales en bacteriología, salvo en aquellos casos en los que el material ya estaba estéril o esta condición no era necesaria.

## 2.2.- QUESOS

Para abordar la caracterización microbiológica del queso de Armada se hicieron elaborar por artesanos de la zona de producción 4 partidas de queso con leche cruda de cabra y siguiendo la tecnología de fabricación artesanal (ver procedimiento de elaboración del queso de Armada, descrito en la Introducción).

### **Esquema de elaboración del queso de Armada:**

Leche cruda de cabra (30°C)

↓ 15 ml de cuajo 1/10.000 /100 l

↓ Al cabo de 1 h ⇒ Coagulación

Cuajada

↓ Cortes radiales ⇒ Desuerado

↓ 1 h

La cuajada se cuelga en sacos de lienzo

↓ 48 h

1<sup>er</sup> Sobado (Desmenuzado de la cuajada a mano)

↓

Se vuelve a colgar en lienzos

↓ (2-3 días)

---

2° Sobado y salazonado

↓

Moldeado (forma de prisma cuadrangular)

↓ 1 semana (secado)

Se cuelgan de nuevo en los lienzos

↓ Maduración (de 2 meses a 1 año)

Queso madurado

De las cuatro partidas de queso elaboradas, dos fueron maduras en verano (lotes A y B) y otras dos en otoño (lotes C y D).

## **2.3.- RECUENTO DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN**

### **2.3.1.- TOMA DE MUESTRAS**

En cada partida se tomaron muestras de leche, cuajada y queso de 1, 2, 4, 8 y 16 semanas de maduración, y se transportaron a temperaturas de refrigeración (<5°C) hasta el laboratorio, realizando el mismo día el análisis microbiológico.

### **2.3.2.- HOMOGENEIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y PREPARACION DE DILUCIONES**

Se homogeneizaron durante 1 minuto 50 g de leche o queso tras eliminar la corteza, tomados de modo aséptico, con 200 ml de una solución estéril al 2% de citrato sódico tribásico a 40-45°C. Se obtuvo así la dilución 1/5, a partir de la cual se prepararon diluciones decimales sucesivas mezclando 10 ml de la dilución previa en 90 ml de agua de peptona al 0,1%, siguiendo la norma FIL-122A:1988.

### **2.3.3.- RECUENTO DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS**

#### **2.3.3.1.- FLORA AEROBIA MESÓFILA TOTAL**

Se recontó en PCA (Plate Count Agar) (Agar triptona glucosa extracto de levadura o agar para Métodos Normalizados) (APHA, 1960). Se describe como el medio estándar para el

---

recuento de microorganismos heterótrofos aerobios y anaerobios facultativos a partir de agua, leche, productos lácteos y otros alimentos. Se sembró en masa, por duplicado, 1 ml de cada dilución. Tras mezclar homogéneamente el agar y el inóculo, se dejó solidificar y se incubó a 30°C durante 48 horas.

### **2.3.3.2.- FLORA AEROBIA PSICROTROFA TOTAL:**

Se recontó también en PCA. Se sembró por duplicado en masa 1 ml de cada dilución. La incubación se efectuó a 7°C durante 10 días.

### **2.3.3.3.- FLORA ACIDOLÁCTICA:**

Se recontó en los siguientes medios de cultivo:

- Agar MSE (Mayeux y col., 1962) tras incubar a 22°C durante 4 días. Es uno de los medios más empleados para el recuento y aislamiento de *Leuconostoc*, se trata de un medio hipersacarosado, en cuya composición destaca la presencia de sacarosa en un 10% y de azida sódica. La azida sódica inhibe a los gérmenes Gram (-) y en parte a los lactococos, la elevada concentración de sacarosa favorece la formación de colonias mucoides por las especies de *leuconostoc* productoras de dextrano (*L. mesenteroides* y *L. dextranicum*). Además se incubaba a 22°C, que es una temperatura más baja que la requerida en general para las bacterias mesófilas. La temperatura óptima para el crecimiento de *leuconostoc* es de 20 a 30°C, aunque *L. cremoris* y *L. oenos* prefieren temperaturas de 22°C y pueden requerir un tiempo de incubación de 48 horas. A partir de cada dilución se sembraron, por duplicado, 0,1 ml en superficie.

- Agar M17 (Terzagui y Sandine, 1975) tras incubar a 30°C durante 18 horas. Es un medio selectivo que se emplea para recuento y aislamiento de lactococos; se trata de un medio muy rico que permite el crecimiento de estos microorganismos, algunos de los cuales tienen complejos requerimientos nutricionales. Entre los componentes del medio figuran lactosa (5%) y glicerofosfato de sodio (19%) que permite aumentar la capacidad tampón del medio y mantener el pH en  $7,2 \pm 0,1$ . En este medio se sembraron también en superficie y por duplicado 0,1 ml de cada dilución.

- Agar ROGOSA (Rogosa y col., 1951) tras incubar a 30°C durante 5 días. Este medio se emplea para el aislamiento de lactobacilos, en su composición lleva acetato sódico en proporción del 1,7% y tiene un pH de aproximadamente 5,4. Aunque es un medio bastante selectivo puede permitir el crecimiento de pediococos y algunos *leuconostoc* (Perry y Sharpe, 1960); al llevar pequeñas cantidades de Mn, Mg y Fe se estimula el crecimiento de los lactobacilos. De cada dilución se sembró por duplicado 1 ml en masa, mezclando uniformemente con el medio de cultivo. Tras la solidificación se añadió una cobertera del

---



mismo medio para favorecer el crecimiento de los lactobacilos (microaerófilos). Además, en ausencia de cobertera, si el crecimiento se realizara en superficie, podría verse afectado porque durante la incubación a 30°C durante 5 días se produce una deshidratación del medio que se traduce en una concentración de la azida sódica que puede llegar a inhibir el crecimiento de los lactobacilos.

#### **2.3.3.4.- ENTEROCOCOS:**

El recuento se llevó a cabo en Agar KAA (Kanamycin Aesculin Azide Agar Base) (Mossel y col.,1978). Se trata de un medio suplementado con kanamicina, que también lleva azida sódica en su composición. Los estreptococos del grupo D son los más resistentes a condiciones adversas por lo que crecen bien en este medio. Además según Brandl y col. (1985) este medio se comporta mejor que otros medios alternativos (agar KF, agar Elliker) en el análisis de productos lácteos. Se sembró en masa, por duplicado, 1 ml de cada dilución, incubando a 37°C durante 24 horas.

#### **2.3.3.5.- MICROCOCCACEAE:**

En Agar MSA (Mannitol Salt Agar) o Medio de Chapman (Chapman, 1945). Este medio posee como agente selectivo un elevado contenido en sal (75 g/l) por lo que sólo crecerán en este medio los microorganismos halotolerantes. También lleva manitol y la utilización de éste se manifiesta por la formación de ácido y el consiguiente viraje del indicador. La utilización del manitol con formación de ácido está relacionada con la patogenicidad del microorganismo y sirve como indicativo de *S. aureus*. Las colonias manitol (+), con halo luminoso y crecimiento intenso corresponden por lo general a *S. aureus*, otras sin cambio de color y de crecimiento débil casi siempre corresponden a *S. epidermidis* entre otros posibles. Se sembraron en superficie y por duplicado 0,1 ml del inóculo. Como en todas las siembras en superficie el inóculo se extendió con un asa de Drigalski. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas.

#### **2.3.3.6.- ENTEROBACTERIACEAE:**

En VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar) (Oxoid) (Mossel y col., 1962). Este medio lleva como azúcar fermentable la glucosa; todas las enterobacterias degradan este azúcar, produciendo ácidos que hacen virar el medio, siendo así fácilmente detectables. El cristal violeta y las sales biliares inhiben la flora acompañante. Se sembraron en masa 0,1 ml de cada dilución siempre por duplicado. Tras mezclar el inóculo y el agar (unos 15 ml por placa), se dejó solidificar y se añadió una sobrecapa del mismo medio. La incubación se efectuó a 37°C durante 18-24 horas.

---

### **2.3.3.7.- MOHOS Y LEVADURAS:**

El recuento se llevó a cabo en OGYEA (Oxytetracycline glucose yeast extract agar) (Mossel y col., 1970), medio diseñado para el aislamiento de mohos y levaduras a partir de alimentos y otros materiales. Se sembró en profundidad por duplicado, 1 ml de cada dilución, incubando con posterioridad a 22°C durante 5 días.

Después de mantener las placas el tiempo y a la temperatura apropiadas para cada grupo se realizó el contaje de aquellas placas con un número de colonias entre 30 y 300, se deshicieron las diluciones, expresando finalmente los recuentos en términos de ufc/g ó ml.

### **2.4.- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

El contenido en humedad y NaCl en cuajada y queso se determinó de acuerdo con las Normas IDF 4:1982 y 17A:1972, respectivamente. En cuajada y queso el pH se determinó según el método de la AOAC 14022:1980. El contenido de humedad y NaCl en leche se determinó de acuerdo con las Normas IDF 21B:1987 y 12A:1969, respectivamente. El pH de la leche se midió directamente con un pHmetro PHM 82 Standard. La actividad de agua (Aw) fue medida con un aparato Decagón CX-1 Water Activity System.

## **3.- RESULTADOS**

### **3.1.- EVOLUCIÓN DE LOS RECuentOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN**

Las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 recogen la evolución de los recuentos microbianos en los medios PCA (mesófilos), PCA (psicrotrofos), Agar MSE, Agar M17, Agar ROGOSA, KAA, MSA, VRBGA y OGYEA, respectivamente, a lo largo de la evolución y maduración de los 4 lotes de queso estudiados.

Las Tablas I y II muestran los valores medios de los recuentos en los distintos medios de cultivo durante la elaboración y maduración de los lotes madurados en verano (A y B) y en otoño (C y D) respectivamente.

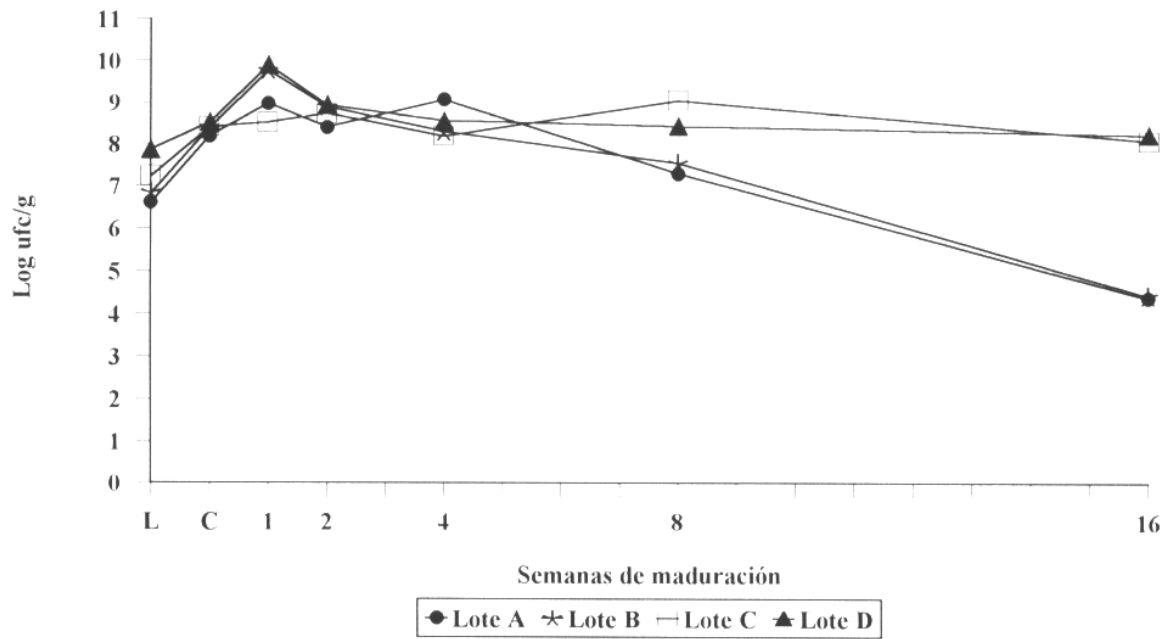


Figura 1.- Evolución de los recuentos en PCA (incubado a 30°C - 48 h.) durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

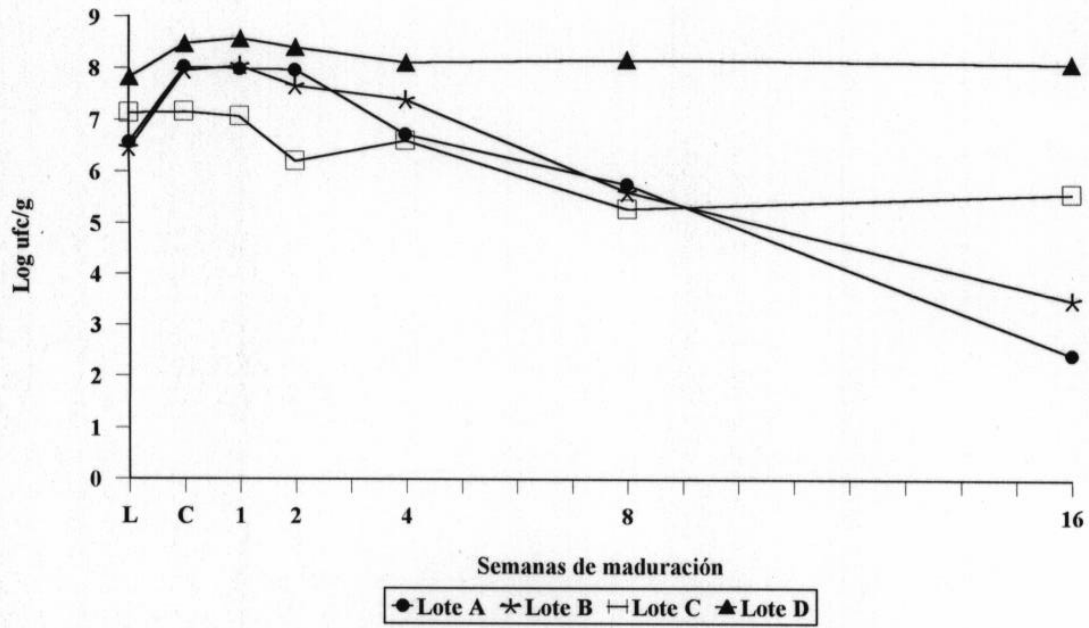


Figura 2.- Evolución de los recuentos en PCA (7°C - 10 días) durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

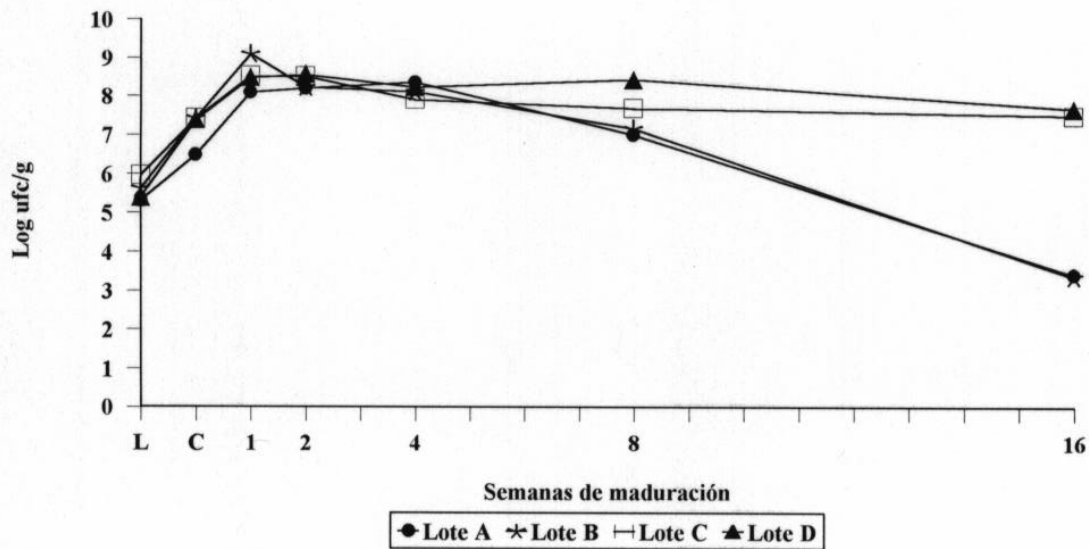


Figura 3.- Evolución de los recuentos en agar MSE durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

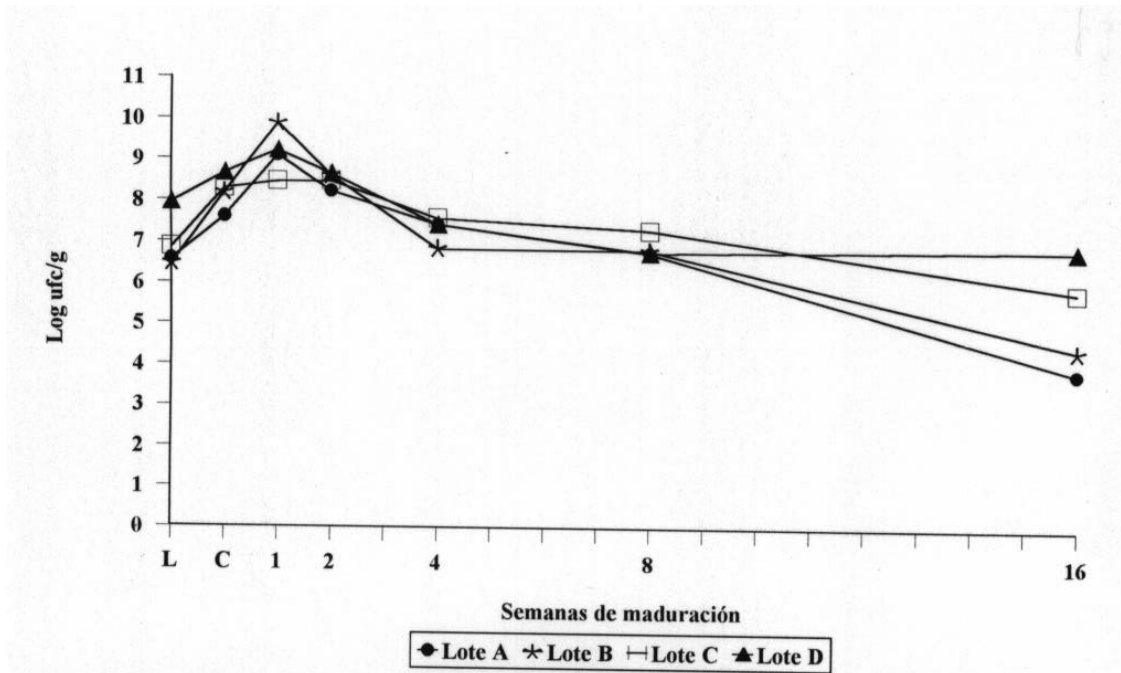


Figura 4.- Evolución de los recuentos en agar M17 durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

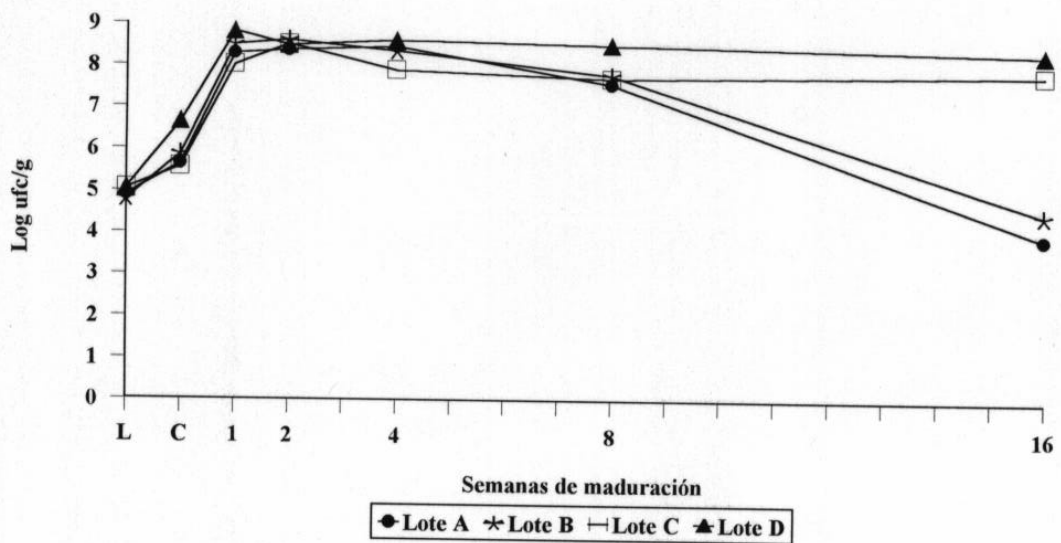


Figura 5.- Evolución de los recuentos en agar ROGOSA durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

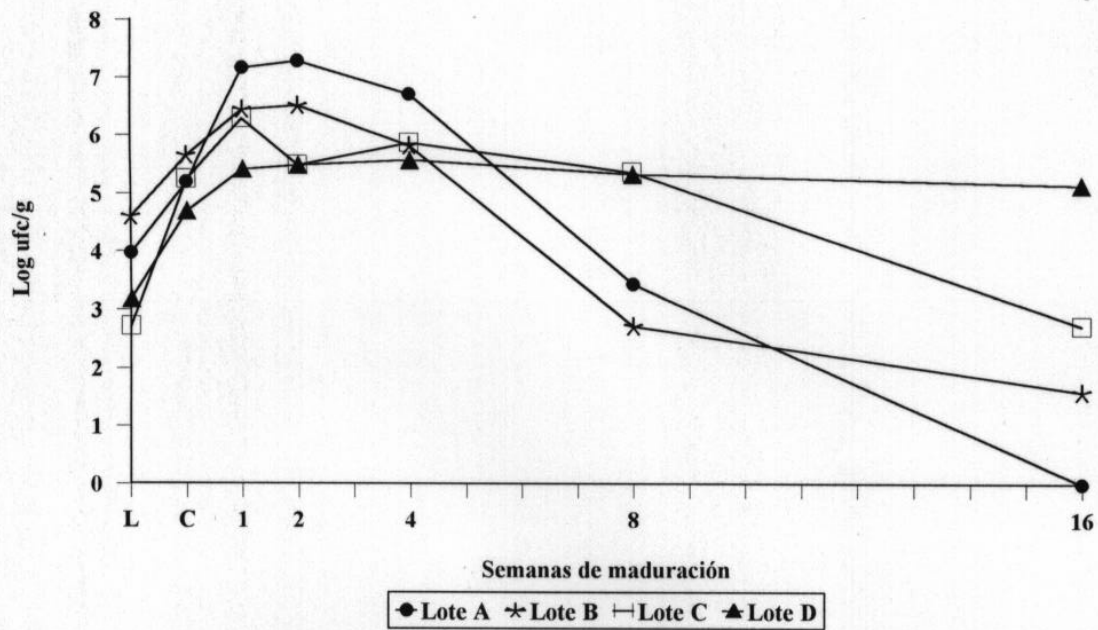


Figura 6.- Evolución de los recuentos en KAA durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

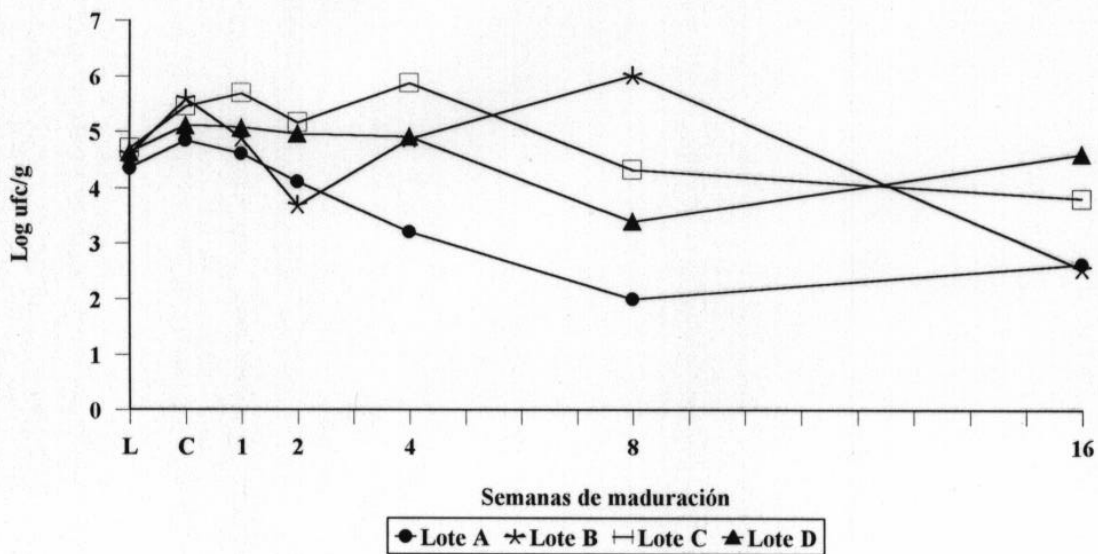


Figura 7.- Evolución de los recuentos en MSA durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

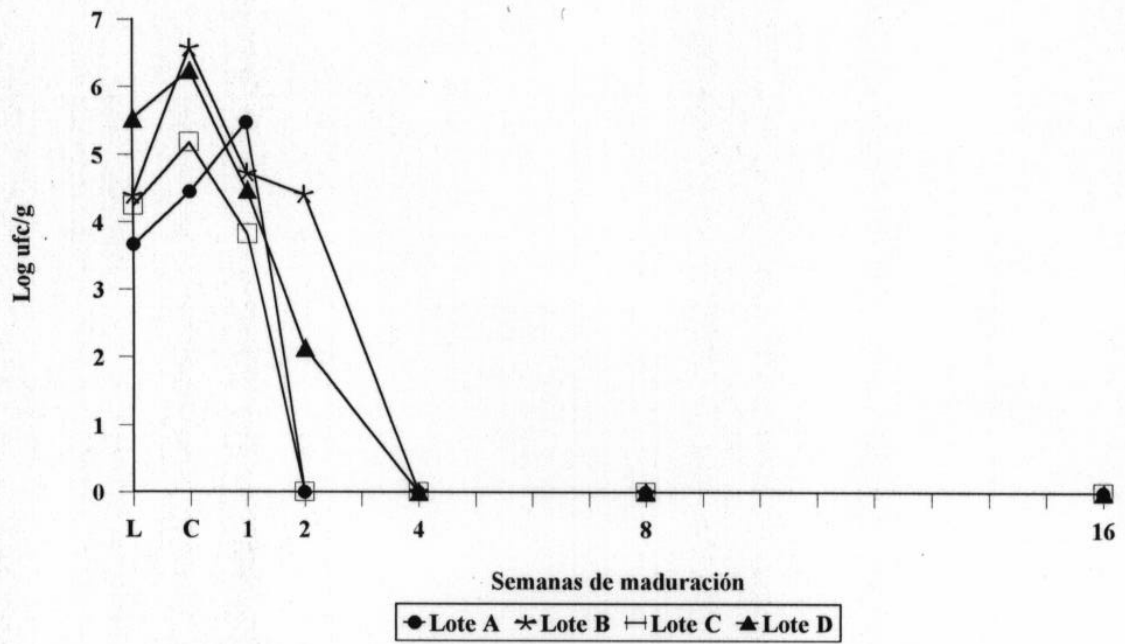


Figura 8.- Evolución de los recuentos en VRBGA durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

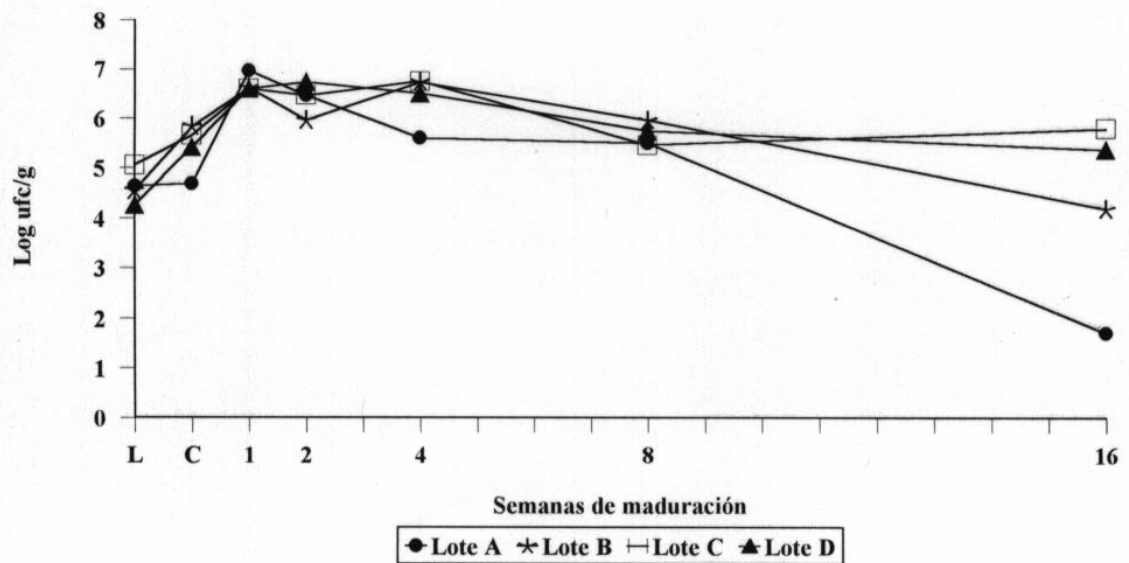


Figura 9.- Evolución de los recuentos en OGYEA durante la elaboración y maduración de los cuatro lotes de queso de Armada, variedad Sobado

Tabla I.- Evolución de los recuentos ( $\log_{10}$  ufc/g) de los grupos microbianos del queso de Armada madurado en verano. (Los datos corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de los dos lotes).

Medio de cultivo	Leche	Cuajada	Semanas de maduración				
			1	2	4	8	16
PCA (30°C-48 h)	6.72 $\pm$ 0.15	8.29 $\pm$ 0.14	9.37 $\pm$ 0.55	8.65 $\pm$ 0.35	8.69 $\pm$ 0.55	7.42 $\pm$ 0.17	4.39 $\pm$ 0.03
PCA (7°C-10 días)	6.51 $\pm$ 0.08	7.98 $\pm$ 0.05	8.01 $\pm$ 0.04	7.80 $\pm$ 0.22	7.05 $\pm$ 0.46	5.68 $\pm$ 0.10	2.97 $\pm$ 0.76
M17	6.53 $\pm$ 0.07	7.89 $\pm$ 0.40	9.48 $\pm$ 0.56	8.41 $\pm$ 0.26	7.14 $\pm$ 0.40	6.80 $\pm$ 0.04	4.17 $\pm$ 0.40
ROGOSA	4.84 $\pm$ 0.08	5.76 $\pm$ 0.16	8.40 $\pm$ 0.14	8.50 $\pm$ 0.16	8.41 $\pm$ 0.07	7.68 $\pm$ 0.15	4.19 $\pm$ 0.41
MSE	5.47 $\pm$ 0.21	6.95 $\pm$ 0.66	8.60 $\pm$ 0.71	8.21 $\pm$ 0.01	8.23 $\pm$ 0.17	7.08 $\pm$ 0.11	3.38 $\pm$ 0.02
KAA	4.29 $\pm$ 0.44	5.42 $\pm$ 0.31	6.80 $\pm$ 0.51	6.89 $\pm$ 0.55	6.26 $\pm$ 0.63	3.08 $\pm$ 0.50	0.80 $\pm$ 1.13
MSA	4.47 $\pm$ 0.17	5.21 $\pm$ 0.52	4.74 $\pm$ 0.19	3.89 $\pm$ 0.30	4.03 $\pm$ 1.17	4.00 $\pm$ 2.83	2.58 $\pm$ 0.05
OGYEA	4.59 $\pm$ 0.06	5.26 $\pm$ 0.81	6.79 $\pm$ 0.25	6.20 $\pm$ 0.35	6.16 $\pm$ 0.79	5.73 $\pm$ 0.32	2.94 $\pm$ 1.75
VRBGA	4,03 $\pm$ 0,51	5,51 $\pm$ 1,50	5,10 $\pm$ 0,53	2,20 $\pm$ 3,12			



Tabla II: Evolución de los recuentos ( $\log_{10}$  ufc/g) de los grupos microbianos del queso de Armada madurado en otoño. (Los datos corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de los dos lotes).

Medio de cultivo	Leche	Cuajada	Semanas de maduración				
			1	2	4	8	16
PCA (30°C-48 h.)	7.55 $\pm$ 0.44	8.46 $\pm$ 0.07	9.21 $\pm$ 0.97	8.84 $\pm$ 0.15	8.37 $\pm$ 0.25	8.75 $\pm$ 0.44	8.14 $\pm$ 0.10
PCA (7°C-10 días)	7.47 $\pm$ 0.48	7.81 $\pm$ 0.93	7.81 $\pm$ 1.07	7.30 $\pm$ 1.55	7.35 $\pm$ 1.06	6.72 $\pm$ 2.04	6.84 $\pm$ 1.76
M17	7.40 $\pm$ 0.76	8.47 $\pm$ 0.26	8.83 $\pm$ 0.53	8.55 $\pm$ 0.12	7.50 $\pm$ 0.10	7.05 $\pm$ 0.37	6.38 $\pm$ 0.71
ROGOSA	5.05 $\pm$ 0.00	6.11 $\pm$ 0.76	8.42 $\pm$ 0.56	8.50 $\pm$ 0.01	8.25 $\pm$ 0.50	8.11 $\pm$ 0.57	8.09 $\pm$ 0.34
MSE	5.68 $\pm$ 0.40	7.39 $\pm$ 0.02	8.49 $\pm$ 0.03	8.53 $\pm$ 0.04	8.06 $\pm$ 0.23	8.05 $\pm$ 0.53	7.58 $\pm$ 0.12
KAA	2.94 $\pm$ 0.32	4.96 $\pm$ 0.38	5.85 $\pm$ 0.61	5.47 $\pm$ 0.00	5.71 $\pm$ 0.20	5.34 $\pm$ 0.02	3.94 $\pm$ 1.70
MSA	4.66 $\pm$ 0.04	5.27 $\pm$ 0.23	5.37 $\pm$ 0.42	5.06 $\pm$ 0.13	5.39 $\pm$ 0.67	3.85 $\pm$ 0.65	4.20 $\pm$ 0.56
OGYEA	4.66 $\pm$ 0.56	5.54 $\pm$ 0.16	6.60 $\pm$ 0.00	6.60 $\pm$ 0.19	6.63 $\pm$ 0.17	5.60 $\pm$ 0.20	5.58 $\pm$ 0.30
VRBGA	4,89 $\pm$ 0,91	5,71 $\pm$ 0,75	4,15 $\pm$ 0,46	1,07 $\pm$ 1,51			

### 3.2.- EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS MÁS RELEVANTES

Las tablas III, IV, V y VI recogen los valores de los parámetros físico-químicos a lo largo de la elaboración y maduración de los lotes A, B, C y D respectivamente.

Tabla III.- Evolución de los distintos parámetros físico-químicos durante la elaboración y maduración del lote A.

	Queso (semanas)						
	Leche	Cuajada	1	2	4	8	16
pH	6,67	5,05	4,31	4,64	4,84	4,35	4,89
Aw		0,990	0,966	0,968	0,948	0,895	0,880
Humedad	85,06	44,67	48,05	39,00	30,91	18,63	18,19
NaCl	0,15	0,20	2,19	1,25	1,53	2,09	1,39

Tabla IV.- Evolución de los distintos parámetros físico-químicos durante la elaboración y maduración del lote B.

	Queso (semanas)						
	Leche	Cuajada	1	2	4	8	16
pH	6,66	4,83	4,62	4,48	4,64	5,29	5,03
Aw		0,991	0,971	0,983	0,940	0,882	0,886
Humedad	85,59	42,97	44,36	38,73	29,56	20,57	19,36
NaCl	0,13	0,14	1,04	0,29	1,70	2,37	2,92

Tabla V.- Evolución de los distintos parámetros físico-químicos durante la elaboración y maduración del lote C.

	Leche	Cuajada	Queso (semanas)				
			1	2	4	8	16
pH	6,45	4,96	4,54	4,37	4,49	4,89	5,25
Aw		0,986	0,960	0,950	0,920	0,908	0,914
Humedad	83,92	50,58	46,46	37,30	27,03	24,21	24,87
NaCl	0,25	0,25	2,13	1,92	2,46	2,32	1,48

Tabla VI.- Evolución de los distintos parámetros físico-químicos durante la elaboración y maduración del lote D.

	Leche	Cuajada	Queso (semanas)				
			1	2	4	8	16
pH	6,59	5,68	4,68	4,78	4,62	4,93	4,99
Aw		0,994	0,973	0,961	0,950	0,943	0,931
Humedad	82,18	49,08	52,06	40,41	35,93	26,45	22,10
NaCl	0,10	0,21	1,45	1,32	1,58	1,45	1,26

### 3.3.- CORRELACIÓN ENTRE LOS RECuentOS MICROBIANOS Y LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN

La tabla VII recoge los valores de los coeficientes de correlación entre los recuentos de los diferentes grupos microbianos y los parámetros físico-químicos más relevantes durante la elaboración y maduración.

Tabla VII.- Coeficientes de correlación entre el  $\log_{10}$  ufc/g de los recuentos en los diferentes medios de cultivo y los parámetros físico-químicos más relevantes a lo largo de la elaboración y maduración del queso de Armada.

	PCA (30°C-48 h.)	PCA (7°C-10 d.)	M17	ROGOSA	MSE	KAA	MSA	VRBGA	OGYEA	NaCl	Aw	Humedad	pH
PCA (30°C-48 h.)	1												
PCA (7°C-10 d.)	0,76 <sup>***</sup>	1											
M17	0,86 <sup>***</sup>	0,80 <sup>***</sup>	1										
ROGOSA	0,78 <sup>***</sup>	0,47 <sup>*</sup>	0,55 <sup>**</sup>	1									
MSE	0,93 <sup>***</sup>	0,67 <sup>***</sup>	0,77 <sup>***</sup>	0,90 <sup>***</sup>	1								
KAA	0,80 <sup>***</sup>	0,72 <sup>***</sup>	0,79 <sup>***</sup>	0,68 <sup>***</sup>	0,83 <sup>***</sup>	1							
MSA	0,42 <sup>*</sup>	0,50 <sup>**</sup>	0,57 <sup>**</sup>	0,18 <sup>NS</sup>	0,42 <sup>*</sup>	0,39 <sup>*</sup>	1						
VRBGA	0,21 <sup>NS</sup>	0,48 <sup>**</sup>	0,54 <sup>**</sup>	-0,32 <sup>NS</sup>	-0,01 <sup>NS</sup>	0,19 <sup>NS</sup>	0,39 <sup>*</sup>	1					
OGYEA	0,80 <sup>***</sup>	0,64 <sup>***</sup>	0,72 <sup>***</sup>	0,83 <sup>***</sup>	0,89 <sup>***</sup>	0,78 <sup>***</sup>	0,51 <sup>**</sup>	0,00 <sup>NS</sup>	1				
NaCl	-0,05 <sup>NS</sup>	-0,43 <sup>*</sup>	-0,21 <sup>NS</sup>	0,42 <sup>*</sup>	0,13 <sup>NS</sup>	-0,03 <sup>NS</sup>	-0,17 <sup>NS</sup>	-0,69 <sup>***</sup>	0,27 <sup>NS</sup>	1			
Aw	0,62 <sup>***</sup>	0,82 <sup>***</sup>	0,79 <sup>***</sup>	0,21 <sup>NS</sup>	0,55 <sup>**</sup>	0,72 <sup>***</sup>	0,45 <sup>*</sup>	0,78 <sup>***</sup>	0,44 <sup>*</sup>	-0,74 <sup>***</sup>	1		
Humedad	-0,00 <sup>NS</sup>	0,35 <sup>NS</sup>	0,26 <sup>NS</sup>	-0,44 <sup>*</sup>	-0,19 <sup>NS</sup>	0,04 <sup>NS</sup>	0,31 <sup>NS</sup>	0,70 <sup>***</sup>	-0,12 <sup>NS</sup>	-0,70 <sup>***</sup>	0,91 <sup>***</sup>	1	
pH	-0,40 <sup>*</sup>	-0,04 <sup>NS</sup>	-0,27 <sup>NS</sup>	-0,66 <sup>***</sup>	-0,55 <sup>**</sup>	-0,44 <sup>*</sup>	0,06 <sup>NS</sup>	0,34 <sup>NS</sup>	-0,50 <sup>**</sup>	-0,59 <sup>***</sup>	-0,07 <sup>NS</sup>	0,75 <sup>***</sup>	1

\*\*\*  $P < .001$ .

\*\*  $P < .01$ .

\*  $P < .05$ .

NS  $P > 0.05$

#### 4.- DISCUSIÓN

La leche utilizada para la fabricación de los quesos presenta unos elevados recuentos microbianos (el logaritmo de los recuentos de la flora aerobia mesófila total oscila entre 6,72 y 7,55); aunque se han observado recuentos similares en leche de cabra utilizada en la elaboración de otras variedades de queso (Fatichenti y col., 1979; Gutiérrez y col., 1988; Fontecha y col., 1990; Mas Mayoral y col., 1991) estos valores fueron mucho más altos que los dados por otros autores (Espie y Mullan, 1987; Tirard-Collet y col., 1991; Medina y col., 1992) y se deben al ordeño manual en condiciones poco higiénicas y a la ausencia de refrigeración de la leche después del ordeño. Los recuentos de los otros grupos microbianos en leche fueron también altos pero dentro del rango que se observa en la leche destinada a la fabricación de otros quesos de cabra (Fatichenti y col., 1979; Gutiérrez y col., 1988; Fontecha y col., 1990; Mas Mayoral y col., 1991). Los recuentos de *Enterobacteriaceae* en leche ( $\log \text{ufc/gramo} = 4,45$ ) se encuentran dentro del rango observado para leche de cabra usada en la elaboración de otros quesos de cabra españoles (Gutiérrez y col., 1988; González Crespo y Mas Mayoral, 1992). Estos recuentos son más elevados que los observados en leche de oveja por otros autores (Gaya y col., 1987; Medina y col., 1991), aunque Gaya y col. (1983) observaron recuentos más altos ( $\log \text{ufc/g} = 5,9$ ) en leche de oveja empleada para la elaboración de queso Manchego.

Los recuentos alcanzados en la cuajada por los distintos grupos microbianos fueron aproximadamente 1 unidad logarítmica más altos que los observados en leche. El incremento de la población microbiana en la cuajada es un fenómeno normal en la elaboración de los quesos y se debe en parte a la multiplicación microbiana y en parte a la retención física de los microorganismos en la cuajada durante el desuerado. El incremento observado en el queso de Armada fue similar al señalado por Medina y col. (1992) en el queso Gredos y por Gutiérrez y col. (1988) en el Valdeteja. Pouillet y col. (1991) en el queso de oveja del Casar de Cáceres observaron incrementos más altos (3 unidades logarítmicas). Gómez y col. (1989) en queso Majorero observaron incrementos de 3 a 5 unidades logarítmicas, sin embargo hay que tener en cuenta que utilizaron leche pasteurizada a la que añadieron un cultivo iniciador antes de la coagulación.

Los bajos incrementos que se observan en los recuentos en cuajada en el queso de Armada se podrían explicar por el corto periodo de tiempo que transcurre entre la toma de muestras de leche y cuajada (aproximadamente 7 horas) en el que la multiplicación microbiana fue mínima. Esta posibilidad es apoyada por los datos de otros autores (Tatini y col., 1971) quienes señalan que la retención física de las bacterias en la cuajada es responsable de un incremento en los recuentos en 1 unidad logarítmica, siendo el incremento restante debido a la multiplicación microbiana.

Los recuentos más altos en todos los grupos microbianos se alcanzaron, generalmente, a la semana de maduración. El incremento en los recuentos durante la primera semana se acompañó de una brusca caída del pH (aproximadamente 2 unidades) (ver tablas III, IV, V y VI) como consecuencia de la producción de ácido por parte de los microorganismos presentes. Esta fuerte caída del pH es lógica si consideramos que los lactococos (principales productores de ácido láctico) (recuentos en agar M17) fueron el grupo microbiano dominante en leche, cuajada y queso de una semana de maduración.

Tras la primera semana los recuentos de todos los grupos microbianos decayeron lenta e irregularmente, alcanzando, después de 16 semanas de maduración, en los lotes madurados en el otoño (tabla II) recuentos aproximadamente 1 unidad logarítmica más bajos que los que mostraban en queso de 1 semana de maduración. La caída mostrada por los recuentos en M17 (presuntos lactococos) en estos dos lotes (2,45 unidades logarítmicas) fue particularmente importante. En los lotes madurados en verano el descenso en los recuentos a lo largo de la maduración fue más pronunciado (los recuentos al cabo de 16 semanas de maduración fueron en los diferentes grupos microbianos, por término medio, del orden de 4,5 unidades logarítmicas más bajos que los observados para queso de 1 semana); la caída en los recuentos en KAA (presuntos enterococos) fue particularmente notable (6 unidades logarítmicas). El descenso en los recuentos más acentuado en estos lotes ocurrió durante las últimas 8 semanas de maduración (aproximadamente 2,80 unidades logarítmicas en los diferentes grupos microbianos).

En todos los lotes, el mayor descenso en los recuentos fue el experimentado por las enterobacterias, desapareciendo en queso de 2 semanas en los lotes A y C y en queso de 4 semanas en los lotes B y D. La desaparición de *Enterobacteriaceae* a lo largo de la maduración de los quesos suele ocurrir lentamente. Descensos tan drásticos en los recuentos de *Enterobacteriaceae* han sido únicamente observados en quesos de maduración muy rápida y muy intensa como el Cabrales (Núñez, 1978).

En base a los coeficientes de correlación establecidos entre el logaritmo de los recuentos de los diferentes grupos microbianos y los distintos parámetros físico-químicos (tabla VII) la caída en los recuentos a lo largo de la maduración parece deberse fundamentalmente al descenso en la actividad del agua ( $A_w$ ). La disminución en la  $A_w$  fue más evidente en los lotes madurados en verano debido a las temperaturas más elevadas y a la humedad relativa más baja que tenían las salas en las que se maduraban los quesos en esta época del año, lo que se traduciría en una mayor pérdida de humedad de los quesos por intercambio con el ambiente. Este fuerte descenso en la  $A_w$  en los lotes madurados en verano coincidió con una fuerte disminución en los recuentos microbianos en esos lotes.

Los elevados coeficientes de correlación entre los valores de  $A_w$  y los recuentos microbianos de presuntos lactococos ( $r = 0,79$ ), presuntos enterococos ( $r = 0,72$ ) y

*Enterobacteriaceae* ( $r = 0,77$ ), indican que posiblemente sean estos grupos los más afectados por el descenso en la Aw. Sin embargo, Fontecha y col. (1990) observaron durante la maduración del queso Majorero descensos en los valores de la Aw y contenido en humedad similares o incluso superiores a los detectados en el queso de Armada sin que hubiera desaparición de coliformes hasta después de los 90 días de maduración.

Los valores de pH, en el rango 4,3 a 4,8 a lo largo de la mayor parte de la maduración, podrían igualmente influir en el descenso de los recuentos de algunos grupos microbianos. Sin embargo, esta posibilidad no se ve apoyada por los valores de los coeficientes de correlación entre los logaritmos de los recuentos y los valores de pH a lo largo de la maduración (tabla VII). Estos resultados son particularmente sorprendentes en el caso de las enterobacterias y contrastan con los obtenidos por otros autores que señalan que los microorganismos pertenecientes a este grupo microbiano son inhibidos e incluso destruidos por los bajos valores de pH (Goel y col., 1971; Gaya y col., 1983; Medina y col., 1991). A pesar de los resultados estadísticos, no se puede descartar la contribución de los bajos valores de pH en la desaparición de *Enterobacteriaceae* durante la maduración del queso de Armada. La presencia de determinadas sustancias inhibitoras producidas por la flora presente en este queso podría igualmente ser responsable de la desaparición de *Enterobacteriaceae* durante la maduración. Finalmente la alta temperatura de maduración (aproximadamente 15°C) también podría contribuir a este fenómeno.

El salazonado, llevado a cabo durante las operaciones de sobado de los quesos, no parece tener mucha influencia en los recuentos (es importante señalar que el contenido en sal de los diferentes quesos es bastante irregular debido a la técnica de salado utilizada; los quesos fueron salados individualmente añadiendo sal durante la primera operación de salado y es probable que no se añadiera la misma cantidad a todos los quesos, y que las pérdidas de sal con el suero que escurre de la cuajada mientras se mantiene en fardeles de tela fueran diferentes en unos quesos y en otros). Es más, la flora con mayor tolerancia a la sal, la perteneciente a la familia *Micrococcaceae*, fue conjuntamente con las enterobacterias el único grupo microbiano que no se multiplicó durante la primera semana de maduración, experimentando incluso un descenso en este periodo en tres de los cuatro lotes estudiados. A partir de ese momento los recuentos en MSA siguieron descendiendo lentamente hasta el final del proceso madurativo. Otros autores (Devoyod, 1969) describieron este mismo fenómeno durante la elaboración y maduración del queso Roquefort. El descenso de los niveles de micrococáceas se puede explicar por el hecho de que parte de los microorganismos de esta familia, los micrococos, son bacterias aerobias que no crecen bien al bajo potencial redox que se instaure en el interior del queso. Además los valores de pH observados en las primeras semanas de maduración del queso de Armada (tablas III, IV, V y VI) podrían contribuir al descenso y/o desaparición de algunas especies de esta familia. Mattick y col. (1959) observaron que en condiciones de pH bajo (aproximadamente 5,0) tenía lugar un rápido

---

descenso en el número de estafilococos. Sharpe y col. (1962) relacionan pHs relativamente altos (6,6) con la permanencia de estos microorganismos en el queso durante un largo periodo de tiempo. Además, aunque estos microorganismos son halotolerantes, los bajos valores de pH que se establecen en este queso podrían incrementar su sensibilidad a la sal. Las BAL podrían igualmente ejercer un control sobre esta población microbiana, que se debería no sólo al efecto de la acidez producida, y por tanto del bajo pH, sino también a la producción de bacteriocinas de acción específica. Algunos autores (Gaya y col., 1988; Stecchini y col., 1991) señalan la influencia negativa de la flora acidoláctica, procedente de la leche cruda o bien del estarter añadido, sobre la población de micrococos y estafilococos.

Considerando conjuntamente los cuatro lotes, los lactobacilos (recuentos en agar ROGOSA) fueron el grupo microbiano dominante en los últimos estadios de la maduración. Esta circunstancia podría deberse a la mayor facilidad que tienen los lactobacilos para crecer a bajos valores de pH (Núñez, 1976; McDonald y col., 1990), posibilidad corroborada por la elevada correlación negativa que se establece entre los recuentos (en unidades logarítmicas) de los presuntos lactobacilos y los valores de pH (tabla VII). La elevada resistencia de los lactobacilos a la sal (Sharpe, 1979) puede también ser causa de su predominio en las últimas etapas de la maduración.

Los recuentos de mohos y levaduras se mantuvieron relativamente constantes a lo largo de todo el proceso madurativo (en torno a  $10^5$ - $10^6$  ufc/g), salvo en la partida A donde experimentaron un notable descenso en las últimas 4 semanas. La actividad de las levaduras que metabolizan el ácido láctico, conjuntamente con la liberación de compuestos alcalinos resultantes de la degradación de las proteínas, podría ser la responsable del incremento de pH observado en este queso tras la primera semana de maduración.

Se puede concluir que las bacterias acidolácticas constituyen la flora dominante durante la elaboración y maduración del queso de Armada.

En las primeras ocho semanas de maduración no se apreciaron diferencias significativas en los recuentos de los diferentes grupos microbianos asociadas a la estación en la que se maduraron los quesos. Sólo en los quesos de 16 semanas de maduración (último punto de muestreo) los recuentos en los quesos madurados en verano fueron más bajos que los de los quesos madurados en otoño. Estas diferencias fueron especialmente notables en la flora aerobia mesófila total ( $P < 0,001$ ), presuntos leuconostocs (recuentos en agar MSE) ( $P < 0,001$ ) y presuntos lactobacilos (recuentos en agar ROGOSA) ( $P < 0,05$ ).



## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA)** (1960). Standard methods for the examination of Dairy Products, 11 th Ed. New York.

**BRANDL, E., ASPERGER, H., PLEGER, F. e IBEN, CH.** (1985). Zum vorkommen von D-Streptokokken in käse. Arch. Lebensmittelhyg., 36:18-22.

**CARRASCO DE MENDOZA, M., SCARINCI, H.E., GARAT, M.H. y SIMONETTA, A.C.** (1992). Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 10:289-293.

**CHAPMAN G.H.** (1945). The significance of sodium chloride in studies of Staphylococci. *J. Bacteriol.*, 50:201-203.

**CHOISY, C., DESMAZEAUD, M.J., GRIPON, J.C., LAMBERET, G., LENOIR, J. y TOURNEUR, C.** (1990). Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. En *El queso*, Eck.A (ed.). Omega. p. 57-91.

**COUSIN, M.A.** (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. *J. Food Prot.*, 45:172-207.

**DESMAZEAUD, M.J., GRIPON, J.C., LE BARS, D. y BERGERE, J.L.** (1976). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caseicolum* et *P. roqueforti*). *Lait*, 56:379-396.

**DEVOYOD, J.J. y MULLER, M.** (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostocs. Influence de différents micro-organismes de contamination. *Lait*, 49:369-380.

**ESPIE, W.E. y MULLAN, W.M.A.** (1987). Microbiological aspects of the quality of goat milk in Northern Ireland. *Milchwissenschaft*, 42:762-764.

**FAIRBAIRN, D.J. y LAW, B.A.** (1986). Proteinase of psychrotrophic bacteria, their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.*, 53:139-177.

**FATICENTI, F., DEIANA, P., FARRIS, G.A. y SOGGIA, G.** (1979). Etudes microbiologiques sur le lait et le fromage de chèvre en Sardaigne. Note II: streptocoques, lactobacilles et leuconostoc. *Lait*, 59:387-400.

**FONTECHA, J., PELÁEZ, C., JUÁREZ, M., REQUENA, T., GÓMEZ, C. y RAMOS, M. (1990).** Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.*, 73:1150-1157.

**FRYER, T.F., REITER, B. y LAWRENCE, R.C. (1977).** Lipolytic activity of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 50:388-389.

**GAYA, P., MEDINA, M. y NÚÑEZ, M. (1983).** Accelerated decrease of *Enterobacteriaceae* counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. *J. Food Prot.*, 46:305-308.

**GAYA, P., MEDINA, M. y NÚÑEZ, M. (1987).** *Enterobacteriaceae*, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes' milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 62:321-326.

**GAYA, P., MEDINA, M., BAUTISTA, L. y NÚÑEZ, M. (1988).** Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 6:249-257.

**GOEL, M.C., KULSCHRESTHA, D.C, MARTH, E.H., FRANCIS, D.V., BRADSHAW, J.G. y READ, R.B. (1971).** Fate of coliforms in yogurt, buttermilk, sour cream and Cottage cheese during refrigerated storage. *J Milk and Food Technol.*, 34:54-58.

**GÓMEZ, R., PELÁEZ, C. y DE LA TORRE, E. (1989).** Microbiological study of semi-hard goat's milk cheese (Majorero). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24:147-151.

**GONZÁLEZ CRESPO, J. y MAS MAYORAL, M. (1992).** Inhibición de enterobacteriáceas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fermento acidificante y NaCl en la fabricación de quesos de los Ibores con leche cruda. *Alimentaria*, 229:51-54.

**GRIPON, J.C., DESMAZEAUD, M.J., LE BARS, D. y BERGERE, J.L. (1975).** Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la presure commerciale. *Lait*, 55:502.

**GUTIÉRREZ, L.M., CARBALLO, J., VIDAL, I., GONZÁLEZ PRIETO, J., MARTÍN SARMIENTO, R. y BERNARDO, A. (1988).** Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la elaboración y maduración del queso de Valdeteja. *An. Fac. Vet. León*, 34:119-126.

**HARPER, W.J., CARMONA DE CATRIL, A. y CHEN, J.L. (1980).** Esterases of lactic streptococci and their stability in cheese slurry systems. *Milchwissenschaft*, 35:129.

**KAMALY, K.M. y MARTH, E.H. (1989).** Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: a review. *J. Dairy Sci.*, 72:1945-1966.

---

**KAMALY, K.M., TAKAYAMA, K. y MARTH, E.H.** (1990). Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* and their mutants. *J. Dairy Sci.*, 73:280-290.

**LAW, B.A.** (1979). Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.*, 46:573-588.

**MCDONALD, L.C., FLEMING, H.P. y HASSAN, H.M.** (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2120-2124.

**MARTIN-HERNÁNDEZ, M.C.** (1991). Proteasas y lipasas de la leche. Enzimas termorresistentes de bacterias psicrotrofas y su efecto en la leche y productos lácteos. *Rev. Agroquim. Technol. Alim.*, 31:1.

**MAS MAYORAL, M., TIMÓN ESTEBAN, J. y GONZÁLEZ CRESPO, J.** (1991). Queso de los Ibores: Caracterización productiva, físico-química y microbiológica. *Arch Zootec.*, 40:103-113.

**MATTICK, A.T.R., NEAVE, F.K. Y CHAPMAN, H.R.** (1959). Staphylococcus aureus in Cheddar cheese. *Proceedings IV International Dairy Congress*, 3:1914.

**MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E. y ELLIKER, P.R.** (1962). A selective medium for detecting leuconostoc organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45:655-656.

**MEDINA, M., FERNÁNDEZ DEL POZO, B., RODRÍGUEZ MARÍN, A., GAYA, P. y NÚÑEZ, M.** (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *J. Dairy Res.*, 58:355-361.

**MEDINA, M., GAYA, P. y NÚÑEZ, M.** (1992). Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *J. Dairy Res.*, 59:563-566.

**MENASSA, A. y LAMBERET, G.** (1982). *Lait*, 62:32-43. Citado por Choisy y col., 1990 en *El queso*, Eck, A. (ed.). Omega. p. 64.

**MOSSEL, D.A.A., MENGERINK, W.H.J. Y SCHOLTS, H.H.** (1962). Use of a modified Mc Conkey agar medium for the selective growth and enumeration of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.*, 84:381.

---

**MOSSEL, D.A.A., KLEYNEN-SEMMELING, A.M.C. Y VINCENTE, H.M.** (1970). Oxytetracycline-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., BIJKER, P.G.H. y EELDERING, J.** (1978). Streptokokken der Lancefield-gruppe D in lebensmitteln und trinkwarrer. Ihre bedeutung, erfassung und bekämpfung. *Arch. f. Lebensmittelhyg.*, 29:121-127.

**MUCCHETTI, G., NEVIANI, E., TODESCO, R. y LODI, R.** (1982). Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. II: attività caseinolitica e lipolitica. *Latte*, 7:821-831.

**NÚÑEZ, M.** (1976). Flora microbiana del queso Manchego. IV. Lactobacilos. *An. INIA/Ser. General*, 4:57-65.

**NÚÑEZ, M.** (1978). Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *J. Dairy Res.*, 45:501-508.

**OLSON, N.F.** (1990). The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Reviews*, 87:131.

**PERRY, K.D. y SHARPE, M.E.** (1960). *J. Dairy Res.*, 27:267. Citado por Sharpe, M.E. (1962). Taxonomy of the *Lactobacilli*. Dairy Science Abstracts, 24:109-118.

**POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. y LARRIBA, G.** (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *J. Dairy Res.*, 58:231-238.

**ROGOSA, M., MITCHELL, J.A. y WISEMAN, R.F.** (1951). A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.*, 62:132-133.

**SHARPE, M.E.** (1979). Identification of lactic acid bacteria. En *Identification methods for microbiologists* (Skinner, F.A. y Lovelock, D.W., eds.). Academic Press. London.

**STADHOUDERS, J. y MULDER, H.** (1958). Fat hydrolysis and cheese flavour. II. Micro-organisms involved in the hydrolysis of fat in the interior of the cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 12:238-264.

**STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A. E INGRAHAM, J.L.** (ed.) (1984). *Microbiología*. Reverté, S.A., Barcelona. p. 650-656.

**STEAD, D.** (1986). Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Res.*, 53:481.

---

**STECCHINI, M.L., SARAIS, I. y BERTOLDI, M.** (1991). The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 14:99-110.

**TAHOUN, M.K., MOSTAFA, R. y ABOU-DONIA, S.** (1982). Lipase induction in *Geotrichum candidum*. *Milchwissenschaft*, 37:86-88.

**TATINI, S.R., JEZESKI, J.J., MORRIS, H.A., OLSON, J.C. y CASMAN, E.P.** (1971). Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. *J. Dairy Sci.*, 54:815-825.

**THERZAGUI B.E. y SANDINE, W.E.** (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29:807-813.

**THOMAS, S.B.** (1974). The microflora of bulk collected milk. I. *Dairy Ind.*, 39:239.

**TIRARD-COLLET, P., ZEE, J.A., CARMICHAEL, L. y SIMARD, R.E.** (1991). A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec. *J. Food Prot.*, 54:263-266.

**WESSELS, D., JOOSTE, P.J. y MOSTERT, J.F.** (1990). Technologically important characteristics of *Enterococci* isolates from milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 10:349-352.

---



# CAPÍTULO II. ESTUDIO DE LA FLORA ACIDOLÁCTICA DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA

## 1.- INTRODUCCIÓN

Las bacterias acidolácticas (BAL) comprenden varios géneros de microorganismos Gram (+), entre los que se encuentran *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Consideraremos conjuntamente lactococos, leuconostoc y lactobacilos y en otro capítulo se hará referencia a los enterococos ya que éstos, además de tener un papel tecnológico, sirven como indicadores de la calidad higiénica.

Este grupo microbiano lleva a cabo actividades metabólicas como la fermentación de la lactosa con producción de ácido láctico, degradación de proteínas y lípidos y producción de compuestos del aroma, y poseen capacidad para potenciar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

Las BAL pueden ser homo o heterofermentadoras. Las homofermentadoras degradan las hexosas por la vía glucolítica y rinden ácido láctico como producto final. Las heterofermentadoras siguen la ruta de las pentosas-P y producen ácido láctico, CO<sub>2</sub>, acetato y/o etanol.

Los **lactococos** son homofermentadores, degradan la lactosa durante las primeras etapas de la maduración de los quesos, siendo responsables de los cambios que ocurren en los estadios tempranos de la maduración y que directa o indirectamente van a influir en el desarrollo del sabor y en la marcha del proceso madurativo. El metabolismo de la lactosa en los lactococos es dependiente de las condiciones del medio. Los lactococos producen L(+) lactato como único producto final de la fermentación de los carbohidratos cuando las bacterias crecen con exceso de glucosa o lactosa. El metabolismo de la glucosa en un medio sin O<sub>2</sub> es homoláctico, pero en cultivos donde la glucosa o la lactosa son limitantes, o si la fuente de energía es la galactosa, se pueden formar otros compuestos finales además del lactato

---

(acetato, formiato, etanol y CO<sub>2</sub>) (Thomas y col., 1979, 1980). Este fenómeno se debe a que la concentración de fructosa (1,6) difosfato (FDP) y de triosas-fosfato disminuye y como la FDP activa a la lactato-DH y las triosas-P inhiben a la piruvato-formiato-liasa, el piruvato se transforma en formiato, acetato y etanol (Fordyce y col., 1984).

Los lactococos fermentan rápidamente la lactosa. En prácticamente todos los tipos de quesos se encuentran las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* y ambas son responsable del proceso de acidificación (Collins, 1962). Según Devoyod (1969) la producción de ácido láctico por ciertos lactococos se ve estimulada por la presencia de enterococos, que al tener una actividad proteolítica intensa proporcionarían sustancias de crecimiento para la flora láctica (Litopoulou-Tzanekaki y Tzanetakis, 1992).

Los **leuconostoc**, en cambio, pertenecen al grupo de las bacterias lácticas heterofermentadoras (producen gas a partir de la glucosa), no desaminan la arginina y pueden metabolizar el citrato si en el medio se encuentra otra fuente de energía disponible. Estos microorganismos no llevan a cabo la degradación de la glucosa por la ruta glucolítica, ya que carecen de una enzima clave, la fructosa (1,6) dP-aldolasa, empleando en cambio la ruta de las pentosas-P y de la fosfocetolasa, cuyos enzimas claves son la glucosa 6-P-DH y la xilulosa 5-P-cetolasa. Los leuconostoc crecen en la leche en asociación con los lactococos pudiendo degradar los carbohidratos y generar compuestos del aroma una vez que los lactococos han metabolizado buena parte de la lactosa a ácido láctico (la capacidad de los leuconostoc para metabolizar la lactosa es mucho menor que la de los lactococos (Garvie, 1984)). Los leuconostoc forman D(-) lactato a partir de la glucosa, así como acetato, etanol y CO<sub>2</sub>; algunos leuconostoc pueden producir además compuestos del aroma no sólo a través de la ruta heterofermentadora de degradación de la glucosa sino también a partir del citrato. *Leuconostoc cremoris* y *L. lactis* se suelen incluir en los fermentos para la fabricación de algunos quesos y otros derivados lácteos, por la capacidad de formar compuestos del aroma.

Los **lactobacilos** crecen en asociación con lactococos y leuconostoc. Tienen un metabolismo de degradación de los azúcares que puede ser homofermentativo o heterofermentativo. Los primeros utilizan la ruta glucolítica y producen únicamente ácido láctico a partir de la lactosa, no pudiendo fermentar las pentosas. Los lactobacilos heterofermentadores degradan la glucosa por la ruta del 6-P-gluconato y rinden como productos finales lactato, acetato, formiato y CO<sub>2</sub>, también pueden fermentar las pentosas.

Existe, además, otro grupo de lactobacilos, los heterofermentadores facultativos, cuyo metabolismo depende del medio de cultivo; normalmente llevan a cabo la degradación de las hexosas por la ruta glucolítica a ácido láctico, pero si la glucosa es limitante podría ser degradada a ácido láctico y otros productos finales. Los lactobacilos realizan un metabolismo de la lactosa más lento que los lactococos, que les preceden normalmente en el curso de la maduración. Degradan la lactosa residual y producen lactato y compuestos aromáticos

---



(acetato, etanol, diacetilo, CO<sub>2</sub>) (Law y Kolstad, 1983), pueden llevar a cabo isomerizaciones y racemizaciones del ácido láctico produciendo D(-) lactato y DL-lactato (Thomas y Crow, 1983), y degradar ácidos orgánicos como citrato (vía piruvato y oxalacetato) a CO<sub>2</sub> y lactato o acetilo (Whiting, 1975).

Los lactobacilos son contaminantes importantes de los quesos y pueden llegar a alcanzar concentraciones de 10<sup>8</sup> ufc/g. Se consideran bacterias "non-starter", no incluyéndose normalmente entre los microorganismos que forman parte del cultivo iniciador empleado en la fabricación de los quesos. Entre los lactobacilos más frecuentemente aislados en los quesos madurados se encuentran *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* y *L. brevis*.

### 1.1.- Metabolismo del citrato en las bacterias acidolácticas

Dentro del género *Lactococcus*, *L. lactis* subsp. *diacetylactis* puede metabolizar el citrato contribuyendo al desarrollo del aroma en ciertos productos lácteos. Como consecuencia del metabolismo del citrato se produce acetato, formiato, lactato, etanol, CO<sub>2</sub> y α-acetolactato (intermediario en la síntesis de acetoína, diacetilo y butanodiol).

Starrenburg y Hugenholtz (1991) observaron crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* con citrato y en ausencia de lactosa, lo que indica que se genera energía durante el metabolismo del citrato, parte se origina en la conversión del acetyl-CoA a acetato durante la fermentación heteroláctica y se produce 1 mol de ATP por molécula de citrato degradada a piruvato.

Algunas BAL necesitan también la presencia de un cosustrato para metabolizar el citrato (Cogan, 1987); de hecho, no se había descrito previamente el crecimiento de las BAL en presencia de citrato como única fuente de energía debido posiblemente a que las condiciones que permiten el crecimiento con citrato son muy críticas. En el metabolismo del citrato influyen condiciones del medio como pH, concentración de lactosa, de O<sub>2</sub>, etc (Cogan y col., 1981; Kaneko y col., 1990). Starrenburg y Hugenholtz (1991) observaron que la utilización del citrato por los lactococos y leuconostoc era mayor en rangos de pH entre 5,5 y 6,0. El citrato, que puede estimular el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a pH<5,5 comienza a ser tóxico y a pH>6,0 no es utilizado.

## 1.2.- Capacidad proteolítica y lipolítica de las bacterias acidolácticas y acción inhibitoria sobre microorganismos patógenos y alterantes

### 1.2.1.- Papel en la proteolisis

El papel de los lactococos en la hidrólisis de la caseína es escaso, sin embargo atacan los productos derivados de la acción de la quimosina sobre la caseína, originando péptidos y aminoácidos que a lo largo de la maduración de los quesos irán incrementando su concentración (Kaminogawa y col., 1986).

La quimosina actúa sobre la  $\kappa$ -caseína, localizada en la superficie de las micelas de caseína desestabilizándolas, con lo que las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  quedan expuestas a la acción de las proteinasas y peptidasas microbianas.

El sistema proteolítico de los lactococos está constituido por (Smid y col., 1991):

- Proteinasas caseinolíticas, asociadas a la pared celular.
- Peptidasas extracelulares.
- Sistema de transporte de aminoácidos.
- Sistema de transporte de péptidos.
- Peptidasas intracelulares.

Las proteinasas asociadas a la pared celular actúan sobre la caseína rindiendo oligopéptidos, éstos suelen ser restos de 10 a 12 aminoácidos, comprendidos entre los residuos aminoacídicos 53 al 93 y 164 al 209 de la  $\beta$ -caseína. Se han descrito 2 tipos de proteinasas asociadas a la pared celular y que difieren en su especificidad, la AP I y la AP III, las proteinasas tipo AP I son específicas para la  $\beta$ -caseína y las AP III para las caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , algunas cepas de lactococos poseen proteinasas de ambos tipos (Visser y col., 1986). Aunque hay variabilidad en la especificidad de las proteinasas hacia las caseínas, la  $\beta$ -caseína parece ser la más susceptible (Olson, 1990).

En los lactobacilos las proteinasas se encuentran asociadas a la pared celular como se ha demostrado en *L. bulgaricus* (Argyle y col., 1976), *L. helveticus* (Vescovo y Botazzi, 1979) y *L. casei* (Neviani y col., 1984; El Soda y col., 1986). Estas proteinasas actúan sobre la  $\alpha_{s1}$  caseína y la  $\beta$ -caseína produciendo un compuesto mayor y otros menores. Ezzat y col. (1984) han demostrado también la existencia de una proteasa ligada a la pared celular en *L.*

*lactis*, *L. helveticus* y *L. bulgaricus*. *L. plantarum* posee también proteinasas asociadas a la pared celular pero en general es menos proteolítico que *L. casei*.

### 1.2.2.- Actividad peptidasa

La mayoría de los péptidos liberados por las proteinasas no pueden ser incorporados directamente a la célula y tienen que sufrir hidrólisis por acción de peptidasas extracelulares, dando lugar a péptidos más cortos y aminoácidos que son transportados al interior de la célula por medio de sistemas de transporte específicos para aminoácidos y para di y tripéptidos.

Yan y col. (1987) caracterizaron en lactococos dos endopeptidasas posiblemente ligadas a la pared celular, una de ellas con especificidad para el péptido  $\alpha_1$ -CN liberado en la maduración y sin actividad frente a proteínas como la  $\alpha$ s-caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\alpha$ -lactoalbúmina o  $\beta$ -lactoglobulina, la otra endopeptidasa tenía la misma especificidad de sustrato ( $\alpha_1$ -CN) pero también podía hidrolizar péptidos algo mayores.

También se han detectado exopeptidasas en lactococos, principalmente aminopeptidasas de localización no clara, ligadas a la pared celular o intracelulares (Olson, 1990; Requena y col., 1991). Es posible que haya ambos tipos en función de la especie y cepas de lactococos ya que mientras Law y Kolstad (1983) detectaron la existencia de una peptidasa ligada a la membrana celular o a la pared celular en *L. lactis* subsp. *lactis*, Exterkate (1984) detecta una actividad Lys-aminopeptidasa en *L. lactis* subsp. *cremoris*, localizada básicamente en el interior celular. No se ha detectado actividad carboxipeptidasa por lo que los lactococos sólo podrían degradar péptidos comenzando por el extremo amino (Smid y col., 1991).

En los **lactobacilos** la actividad peptidasa podría estar localizada en la pared celular o en la membrana celular, existiendo también la posibilidad de que pudiera localizarse en el interior celular y que los derivados peptídicos atravesaran la envoltura de la célula (Law, 1979; Exterkate, 1984; Thomas y Pritchard, 1987).

En la pared celular de *Lactobacillus casei*, donde reside la actividad proteasa y una actividad exopeptidasa extracelular, no se detectó actividad aminopeptidasa, dipeptidasa o carboxipeptidasa. El Soda y col. (1978) establecieron que el 94% de la actividad aminopeptidasa se localiza en la fracción soluble intracelular.

La presencia de un sistema exopeptidasa intracelular se pone de manifiesto por la hidrólisis de los componentes menores (El Soda y col., 1978), pudiendo existir peptidasas intracelulares (dipeptidasas, tripeptidasas, aminopeptidasas, endopeptidasas) que degradan los péptidos a aminoácidos libres (Smid y col., 1991).

Aunque generalmente se ha dado más importancia al sistema proteolítico de los lactococos y lactobacilos, los leuconostoc poseen un sistema intracelular péptido-hidrolasa, con actividad dipeptidasa y aminopeptidasa, además de una actividad caseinolítica general (El-Shafei y col., 1990).

La actividad proteolítica puede verse afectada por el pH que provoca alteraciones en la estructura activa de las enzimas o en el centro activo de las mismas (De Giori y col., 1985).

### **1.2.3.- PAPEL EN LA LIPOLISIS**

Las bacterias lácticas tienen baja actividad lipolítica (Deeth y Fitz-Gerald, 1975; Fryer y col., 1967; Stadhouders y Veringa, 1973), pero son capaces de hidrolizar la grasa de la leche cuando se encuentran en suficiente número y en contacto con el sustrato durante un largo periodo de tiempo (Fryer y col., 1967).

Las enzimas lipolíticas de las BAL son más efectivas frente a monoglicéridos y diglicéridos que frente a triglicéridos (Requena y col., 1991) y la actividad lipolítica de las BAL está preferentemente dirigida hacia la liberación de ácidos grasos de cadena corta (Singh y col., 1973).

El sistema esterolítico presenta una gran especificidad para determinados ácidos grasos (butírico, caproico, caprílico).

Umemoto y col. (1968) observaron que la lipasa de las bacterias lácticas tiene un pH óptimo entre 6 y 8, cuando la tributirina actúa como sustrato; en consonancia con estos resultados Kamaly y col. (1990) establecen rangos de actividad de la lipasa de las BAL sobre la grasa de la leche a pH desde 5 a 9, con un máximo a pH 7. La actividad lipasa parece tener una temperatura óptima de acción de 37°C (Umemoto y col., 1968; Kamaly y col., 1990). La actividad esterolítica y lipolítica es máxima durante la fase logarítmica de crecimiento (Lee y Lee, 1990) y disminuye al entrar en la fase estacionaria.

Según varios autores (Carini y col., 1972; Chander y Chebbi, 1972; Singh y col., 1973) las lipasas de las bacterias lácticas serían intracelulares y al morir las células difundirían al medio circundante, produciendo la hidrólisis de la grasa; otros autores (Kamaly y Marth, 1989) establecen que los lactococos poseen lipasas intracelulares y extracelulares.

Aunque la actividad lipolítica y esterolítica que poseen las BAL es limitante y probablemente no contribuya mucho al aroma del queso (Stadhouders y Mulder, 1958), sí puede tener cierta influencia en el desarrollo del mismo (El Soda y col., 1986; Lee y col., 1986).

## **1.2.4.- ACCIÓN INHIBITORIA SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y DE DETERIORO**

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* inhiben el crecimiento de muchas bacterias Gram (+), mientras *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* y *L. dextranicum* inhiben a las bacterias Gram (-) a través de la producción de ácido láctico, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y de bacteriocinas producidas igualmente por los lactobacilos.

Existen dudas a cerca de cómo influyen estos factores sobre el crecimiento microbiano, por ejemplo se sabe que la actividad del ácido láctico depende del pH del medio y el que existe a lo largo de la maduración de los quesos no es el más idóneo para la expresión de la máxima actividad bactericida de este compuesto. El pH del medio determina que el ácido se encuentre en la forma disociada o sin disociar (forma esta última en la que es más activo). Dado que el pKa del ácido es de 3,9, a un pH superior a éste se encontrará completamente disociado, y tendría poca actividad bactericida (Ross, 1981).

## **2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO**

Además del material general descrito en el capítulo I se utilizaron microscopios ópticos OLYMPUS CHB CO11 y de contraste de fases NIKON 8TR-Ke-Ph.

### **2.2.- MÉTODOS**

#### **2.2.1.- AISLAMIENTO DE LAS CEPAS**

Los géneros que se incluyen dentro de las BAL poseen muchas características comunes por lo que resulta difícil la elección de un medio adecuado para el recuento y aislamiento de cada género por separado (Reuter, 1985).

En los medios MSE, ROGOSA y M17 de cada lote y para cada punto de muestreo se aislaron de modo aleatorio, con ayuda de un disco de Harrison (Harrigan y McCance, 1979), 10 colonias en aquellas placas que contenían entre 30 y 300, manteniéndose en frascos de agar MRS inclinado (Man y col., 1960) en refrigeración hasta el momento de su purificación. Una vez purificadas las cepas se guardaron en caldo MRS a temperatura de congelación añadiendo un 20% de glicerol como crioprotector, hasta proceder a su identificación.

Se aislaron un total de 840 cepas (70 por lote y por medio de cultivo).

---

El medio generalmente empleado para cultivar y realizar pruebas de identificación fue el MRS. Durante el proceso de identificación, periódicamente, se realizó una tinción de Gram en cada cepa al objeto de comprobar la pureza del cultivo.

### 2.2.2.- ADSCRIPCIÓN A GÉNERO

Para adscribir a género se realizaron las siguientes pruebas:

- **Gram y morfología:** La tinción de Gram se hizo a partir de un cultivo en MRS incubado a 30°C durante 14 a 17 horas; se extendió una gota del cultivo en un porta y se dejó secar al aire, luego se fijó al calor y se hizo la tinción. Se observó con el objetivo de inmersión el carácter Gram (+) ó (-), la morfología y la disposición de las células.

- **Catalasa:** A un cultivo en agar MRS de 24 horas a 30°C se le añadieron unas gotas de agua oxigenada al 30%, la producción de burbujas debido al desprendimiento de O<sub>2</sub> por descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicó la positividad de la reacción.

- **Producción de CO<sub>2</sub> a partir de la glucosa:** Se utilizó el medio semisólido de Gibson (Gibson y Abd-El-Malek, 1945) en tubos. Tras la inoculación de la cepa se añadió un tapón de agar agua y se dejó solidificar, observando los tubos a las 24, 48, 72 horas y a los 7 días de incubación a 30°C. La producción de gas se puso de manifiesto por la formación de burbujas que a veces conllevó agrietamiento del medio y desplazamiento del tapón de agar. A los 7 días se pueden introducir los tubos que dieron un resultado negativo en un baño de agua a 30°C para dilatar el gas que haya podido quedar retenido y no se apreciase previamente.

Esta prueba permite discernir entre bacterias homofermentadoras y heterofermentadoras, si bien hay que tener en cuenta que ciertos lactobacilos homofermentadores pueden volverse heterofermentadores en determinadas condiciones, como por ejemplo ante bajas concentraciones de glucosa (Moat, 1985).

- **Desaminación de la arginina:** A una gota de un cultivo en caldo MRS con un 0,3% de monoclóhidrato de L-arginina, incubado a 30°C durante 3 días, se le añadió una gota del reactivo de Nessler con el fin de demostrar la producción de amoníaco. La aparición de un color naranja-marrón indicó la positividad de la reacción. La prueba se realizó siempre comparando con un testigo positivo y otro negativo.

En la prueba de producción de amoníaco a partir de la arginina es importante la composición del medio, siendo crítica la concentración de glucosa. Con una concentración de glucosa del 2% sólo las especies de lactobacilos heterofermentadores producen amoníaco (Briggs, 1953), con una baja concentración de glucosa no sólo las especies heterofermentativas producen amoníaco sino que también algunas cepas de *L. plantarum*

pueden producirlo (Keddie, 1959). Un medio que resulta adecuado para este fin es el caldo arginina MRS, que lleva 0,3% de arginina y 2% de glucosa (Sharpe, 1962).

La prueba de desaminación de la arginina permite diferenciar los lactobacilos heterofermentadores de los leuconostoc; a veces morfológicamente son difíciles de separar, ya que los lactobacilos pueden adoptar una morfología cocoide y los leuconostoc pueden aparecer como cocobacilos o bacilos cortos. Se diferencian porque los leuconostoc nunca desaminan la arginina. *Lactobacillus viridescens*, dentro del grupo de los lactobacilos heterofermentadores, así como todos los leuconostoc, no llevan a cabo la desaminación de la arginina, por lo tanto y en función del perfil de fermentación de azúcares la prueba de la producción de amoníaco va a permitir discernir en estos casos a nivel de género.

En los lactococos es una prueba de adscripción a especie, permite distinguir *L. lactis* subsp. *lactis* de *L. lactis* subsp. *cremoris*.

- **Crecimiento a 10°C:** Para lactococos y leuconostoc es una prueba que confirma la adscripción a género. Se realizó en caldo MRS incubando durante 7 días. El crecimiento en ambos casos fue, por lo general positivo.

- **Crecimiento a 45°C:** Se observó en caldo MRS tras 48 horas de incubación, permitiendo diferenciar entre lactococos y enterococos.

- **Crecimiento en MRS con un 6,5% de NaCl:** Se observó la presencia o no de crecimiento tras incubar a 30°C durante 2 días en caldo MRS con ese porcentaje de sal.

Estas dos últimas pruebas permitieron diferenciar entre lactococos y enterococos (ambos son cocos homofermentadores). Los lactococos no crecen a 45°C y/o 6,5% sal, mientras que los enterococos sí pueden crecer en esas condiciones.

Los cocos Gram (+), catalasa (-), homofermentadores, que crecen a 10°C y a 40°C pero no lo hacen a 45°C y/o 6,5% de sal y que pueden o no desaminar la arginina se consideraron lactococos. En las cepas que crecían a 45°C y/o 6,5% sal se hicieron pruebas correspondientes al grupo de los enterococos.

En los medios de cultivo M17, MSE y ROGOSA se aislaron algunas cepas pertenecientes al género *Enterococcus* que fueron identificadas de acuerdo con los métodos y criterios descritos en el siguiente capítulo. Sus características bioquímicas y culturales aparecen también descritas en el capítulo siguiente.

Las formas cocoides o cocobacilares, Gram (+), catalasa (-), heterofermentadores, que no desaminan la arginina y no crecen a 45°C, se consideraron leuconostoc.

Se consideraron, por último, lactobacilos los bacilos o cocobacilos, Gram (+), catalasa (-), con metabolismo homo o heterofermentador, pudiendo los homofermentadores crecer a 15°C (grupo *Streptobacterium*) o ser incapaces de crecer a esa temperatura (*Thermobacterium*). En medio KAA, donde los aislamientos fueron fundamentalmente enterococos que se estudian en el capítulo siguiente, se aislaron a las 16 semanas de maduración 6 cepas del género *Lactobacillus*, que fueron adscritas a especie de acuerdo con la metodología que se describe en el apartado siguiente.

### 2.2.3.- ADSCRIPCIÓN A ESPECIE

Para adscribir a especie se realizaron las siguientes pruebas:

- **Crecimiento a 37°C** (*Leuconostoc*): En caldo MRS durante 3 días.
- **Crecimiento a 40°C** (lactococos): En caldo MRS durante 2 días, permite diferenciar entre *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*.
- **Crecimiento a 45°C** (en caldo MRS durante 2 días) y **Crecimiento a 15°C** (en caldo MRS durante 10 días). Estas dos pruebas permiten establecer dos subgrupos dentro de los lactobacilos homofermentadores: *Thermobacterium*, que se corresponde con los lactobacilos homofermentadores obligados y *Streptobacterium*, que se corresponde con los heterofermentadores facultativos. El crecimiento a 45°C no es discriminativo, ya que el grupo *Thermobacterium* crece a 45-50°C y el grupo *Streptobacterium* puede o no crecer a esa temperatura, sin embargo, el crecimiento a 15°C sí permite diferenciar entre ambos subgrupos, los lactobacilos del grupo *Thermobacterium* no crecen a 15°C, los *Streptobacterium* siempre crecen a 15°C y por lo general también a 6°C.

Los heterofermentadores obligados (subgrupo *Betabacterium*) no crecen a 45°C (sólo *L. fermenti*) y crecen a 15°C (salvo *L. fermenti*).

- **Crecimiento en presencia del 4% de NaCl**: En caldo MRS con ese porcentaje de sal, después de incubar a 30°C durante 48 horas. El crecimiento en presencia del 4% de sal discrimina entre *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*. También permite discriminar entre las distintas especies de *leuconostoc*.

- **Crecimiento en presencia del 6,5% de NaCl**: En caldo MRS con el 6,5% de sal, incubando a 30°C durante 48 horas. Esta prueba permite también discriminar a nivel de especie dentro del género *Leuconostoc*; *Leuconostoc mesenteroides* y *L. paramesenteroides* pueden crecer con ese porcentaje de sal.

- **Crecimiento en presencia del 10% de etanol** (*Leuconostoc*): En caldo MRS con 10% de etanol. Se incubó a 30°C y se observó el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas. Permite



diferenciar entre la especie *Leuconostoc oenos*, que crece en presencia del 10% de etanol, y el resto de los leuconostoc que no lo hacen (Garvie, E.I., 1967).

- **Producción de dextrano** (leuconostoc): Se empleó el medio Agar sacarosa (Evans y col., 1956; Garvie, 1960) que lleva en su composición un 5% de sacarosa. La producción de dextrano se pone de manifiesto por la formación de colonias mucosas y permite diferenciar especies dentro de los leuconostoc; *L. mesenteroides* y *L. dextranicum* producen dextrano y el resto no.

- **Prueba de Voges-Proskauer y Utilización del citrato:** Estas dos pruebas se efectuaron en las cepas del género *Lactococcus*; permiten diferenciar *L. lactis* subsp. *diacetylactis* del resto de los lactococos.

La **prueba de Voges-Proskauer** permite comprobar la producción de acetoína a partir de la glucosa, utilizando como medio de cultivo el caldo glucosa-P. Se siembra en este medio y se incuba a 30°C durante 2 a 7 días, al cabo de ese tiempo se efectúa la prueba.

La acetoína (acetilmetilcarbinol) es un compuesto intermediario en la síntesis del butanodiol a partir del ácido pirúvico, después de la incubación la adición de un álcali al medio asegura que en presencia de esta sustancia cualquier cantidad de acetoína que esté presente se oxide a diacetilo; el diacetilo combinado con arginina, creatina o creatinina ofrecerá un color rosado.

Para detectar la producción de acetoína se siguió el Método de Barrit (1936), que emplea una solución etanólica de  $\alpha$ -naftol al 6% y una solución de KOH al 16%. Este método es muy sensible (consigue detectar 1 ppm de acetoína).

A 1 ml del cultivo (en caldo glucosa-P, incubado durante 2 a 7 días a 30°C) se añaden 0,5 ml de una solución de  $\alpha$ -naftol al 6% y 0,5 ml de KOH al 16%. Se agita el tubo y si se forma un precipitado rojo (generalmente al cabo de 5 minutos) la reacción es positiva, si no se aprecian cambios de color la reacción es negativa.

La prueba de **utilización del citrato** emplea como medio el agar citrato de Simmons que lleva en su composición citrato sódico en proporción del 2%.

Partiendo de un cultivo en caldo MRS, se centrifugó, lavando las células por resuspensión y centrifugación sucesiva en una solución de NaCl (8,5 g/l). A partir de una suspensión salina de células lavadas se sembró el medio con una aguja de platino o asa muy descargada y se incubó a 30°C, durante 7 días. La utilización del citrato se caracterizó por una reacción alcalina que cambió el color del medio de verde a azul fuerte.

El agar citrato de Simmons posee fosfato amónico como única fuente de nitrógeno, y citrato sódico como única fuente de carbono. Sólo pueden crecer los microorganismos que

utilizan el citrato como fuente de C, dado que éstos pueden también utilizar sales inorgánicas de amonio como única fuente de N, el metabolismo de estas sales hace que el medio se vuelva alcalino y se produzca el viraje del indicador (azul de bromotimol) de verde a azul.

- **Fermentación de azúcares:** Se empleó el medio de fermentación MRS, ligeramente modificado, omitiendo la glucosa y el extracto de carne que suele contener pequeñas cantidades de carbohidratos (Man y col., 1960; Harrigan y Mc Cance, 1979). El pH del medio de fermentación es importante ya que puede determinar la actividad enzimática de la célula. Para lactococos y leuconostoc se ajustó el pH a aproximadamente 7,0, para lactobacilos el pH se ajustó a 6,0-6,5 (se prefiere ligeramente ácido) (Sharpe, 1962). Como indicador se utilizó el púrpura de bromocresol al 0,004%.

Los azúcares se prepararon por separado en soluciones al 10% y se esterilizaron por filtración, añadiéndose asepticamente al medio hasta obtener una concentración final del 2%.

Las células microbianas de las cepas a ensayar se lavaron mediante centrifugaciones y resuspensiones repetidas en una solución salina (8,5 g/l de NaCl), partiendo del sedimento de un cultivo en caldo MRS.

Las células de cada cepa, resuspendidas en la solución salina, se inocularon en el medio de fermentación con cada uno de los azúcares en una placa de microtítulo, con la finalidad de economizar material y reactivos; seguidamente se incubó a 30°C y se efectuaron lecturas a las 24, 48 y 72 horas y a los 5 días. La utilización de los azúcares se manifestó por el viraje del medio de fermentación desde el color violeta inicial hasta una tonalidad amarillenta. La lectura que se tomó como más representativa a la hora de anotar el carácter positivo o negativo en la fermentación de un azúcar determinado fue la de 72 horas.

Se ensayaron los siguientes azúcares:

Para lactococos: arabinosa, inulina, xilosa, glicerol, sucrosa, sorbitol, trealosa, ramnosa, manitol, ribosa, salicina, maltosa y rafinosa.

Para leuconostoc: arabinosa, celobiosa, fructosa, glucosa, lactosa, maltosa, melibiosa, sacarosa, salicina y trealosa.

En los lactobacilos se probaron distintos azúcares para el grupo de los homofermentadores y para los heterofermentadores. Para los homofermentadores se ensayaron: arabinosa, lactosa, melibiosa, sucrosa, xilosa, inulina, rafinosa, ramnosa, sorbitol y sorbosa; para los heterofermentadores: arabinosa, celobiosa, lactosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, salicina, trealosa y xilosa.

Las cepas se agruparon por patrones bioquímicos de fermentación de azúcares, así como por similitud en las características fisiológicas para compararlas con patrones modelo y

---

se identificaron siguiendo los criterios de Garvie (1986) para los leuconostocs, Kandler y Weiss (1986) para los lactobacilos y Mundt (1986) para los lactococos.

### 3.- RESULTADOS

Las tablas I, II y III recogen respectivamente la identidad y la distribución por puntos de muestreo de los aislamientos efectuados en los medios M17, MSE y ROGOSA.

Se aislaron en total 190 cepas pertenecientes al género *Lactococcus*, de las cuales 128 se aislaron en M17, 61 en MSE y 1 en ROGOSA.

Del total de lactococos (190), 159 se incluyeron en la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 en *L. lactis* subsp. *diacetilactis* y 27 en *L. lactis* subsp. *cremoris*, 2 cepas no se pudieron identificar a nivel de especie.

*L. lactis* subsp. *lactis* representó el 83,68% del total de lactococos aislados, *L. lactis* subsp. *cremoris* el 14,21% y *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetilactis* el 1,05%.

Las características bioquímicas de las cepas identificadas como lactococos se recogen en la tabla IV.

En nuestro estudio el agar M17 mostró una moderada selectividad para el aislamiento de *Lactococcus* (sólo el 45,71% de las cepas aisladas en M17 se adscribieron a este género).

Como leuconostoc se identificaron un total de 54 cepas, 46 aisladas en MSE, 4 en M17 y 4 en ROGOSA.

De estas 54 cepas, 5 se identificaron como *Leuconostoc paramesenteroides*, 13 como *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y 36 como *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. No se detectó la presencia de *L. cremoris* ni *L. lactis*.

Respecto al total de *Leuconostoc* aislados, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* representó el 66,66%, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* el 24,07% y *L. paramesenteroides* el 9,26%.

Hemos constatado la escasa selectividad del agar MSE en el aislamiento de leuconostoc (sólo el 16,42% de los aislamientos realizados en MSE pertenecieron a este género) a pesar de que este medio lleva en su composición un 10% de sacarosa y un 0,0075% de azida sódica; si bien hay que tener en cuenta que el 84% de las cepas de este género fueron aisladas en este medio. También hemos podido comprobar la dificultad que entraña la adscripción fiable a especie de los microorganismos de este género cuando se utilizan únicamente caracteres fenotípicos.

---

La tabla V muestra las características bioquímicas de las cepas identificadas como leuconostoc.

De las 409 cepas de lactobacilos aisladas, 241 (229 homofermentadoras y 12 heterofermentadoras) lo fueron en ROGOSA, 57 (46 homofermentadoras y 11 heterofermentadoras) en M17 y 111 (102 homofermentadoras y 9 heterofermentadoras) en MSE. De las 409 cepas de lactobacilos, 377 se consideraron lactobacilos homofermentadores (*Streptobacterium*) y 32 se consideraron heterofermentadores (*Betabacterium*). Entre las cepas aisladas no se encontró ningún lactobacilo perteneciente al grupo *Thermobacterium*.

Las especies encontradas en el grupo de los lactobacilos homofermentadores fueron: *Lactobacillus plantarum* (215 cepas), *L. casei* subsp. *casei* (158) y *L. casei* subsp. *alactosus* (3 cepas).

En el grupo *Betabacterium* se identificaron 25 cepas como pertenecientes a la especie *L. brevis*, 2 como *L. fermentum* y 5 especies sin identificar.

Respecto al total de cepas de lactobacilos, *L. plantarum* representó el 52,56%, *L. casei* var. *casei* el 38,63% y *L. casei* var. *alactosus* el 0,73%. *L. brevis* representó el 6,11% de los lactobacilos totales y *L. fermentum* el 0,49%.

El agar ROGOSA mostró una selectividad bastante elevada para el aislamiento de lactobacilos. Fueron clasificados como lactobacilos el 86,07% de los aislamientos efectuados en este medio.

Las características bioquímicas de las cepas del grupo *Streptobacterium* se muestran en la tabla VI. En esta tabla se recogen también las características de las 5 cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* y de la cepa de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* aisladas a partir de queso de 16 semanas en agar KAA.

En la tabla VII se recogen las características bioquímicas de las cepas del grupo *Betabacterium*.

Finalmente reiterar que en los tres medios de cultivo (M17, MSE y ROGOSA) se aislaron cepas posteriormente identificadas como *Enterococcus* y cuyas características serán expuestas y discutidas en el capítulo siguiente de esta memoria. Su distribución por puntos de muestreo aparece también recogida en las tablas I, II y III.

---







Tabla IV: Características bioquímicas de las cepas de lactococos aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Características	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	Sin identificar
Nº de cepas	159	27	2	2
Crec. 45°C	-	-	-	-
Crec. 40°C	129	18	1	-
Crec. 10°C	159	22	2	2
Desam. de Arg	158	1	1	-
Diacetilo	-	-	2	-
V.P.	-	-	2	-
Crec. 4%	159	7	2	2 (+/-)
Crec. 6,5%	-	-	-	-
Fermentación:				
Arabinosa	19	1 (+/-)	-	2
Xilosa	56	1 (+/-)	1	1
Sucrosa	35	22	-	2
Trealosa	159	23	1	2
Manitol	72	19	-	2
Salicina	159	22	1	2
Rafinosa	-	11	-	2
Inulina	-	-	-	-
Glicerol	4	-	-	1
Sorbitol	4	18	-	-
Ramnosa	5	18	-	-
Ribosa	124	23	2	2
Maltosa	159	23	1	2



Tabla V: Características bioquímicas de las cepas de *Leuconostoc* aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Características bioquímicas	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	<i>L. paramesenteroides</i>
Nº de cepas	13	36	5
Crec. a 10°C	13	36	5
Crec. a 37°C	13	35	0 y 1 (+/-)
Cre. 4% NaCl	13	35	3
Cre. 6,5% NaCl	9 y 2 (+/-)	5	0
Prod. dextrano	13	36	0
Fermentación de:			
Arabinosa	11 y 2 (+/-)	21 (+/-)	3 (+/-)
Celobiosa	13	2 (+/-)	5
Fructosa	13	36	5
Glucosa	13	36	5
Lactosa	13	36	5
Maltosa	13	36	5
Melibiosas	12 y 1 (+/-)	36	5
Sacarosa	13	36	5
Salicina	6 y 2 (+/-)	1 (+/-)	3 y 2 (+/-)
Trealosa	6 y 3 (+/-)	1 (+/-)	1 y 4 (+/-)

Tabla VI: Características bioquímicas de las cepas de lactobacilos homofermentadores aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado

Característica	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> var. <i>alactosus</i>
Nº de cepas	215	158	3
Crec. 45°C	8	6	-
Fermentación de:			
Arabinosa	68	-	-
Lactosa	215	158	-
Melibiosa	215	-	-
Sucrosa	184	139	3
Xilosa	8	-	-
Inulina	3	7	-
Rafinosa	137	-	-
Ramnosa	43	-	-
Sorbitol	166	49	2
Sorbosa	9	17	2

Tabla VII: Características bioquímicas de las cepas de lactobacilos heterofermentadores aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Característica	<i>L. brevis</i>	<i>L. fermentum</i>
Nº de cepas	25	2
Crec. 15°C	25	2
Crec. 45°C	-	2
Desam. Arg	25	2
Fermentación:		
Arabinosa	25	2
Celobiosa	-	2
Lactosa	16	2
Melecitosa	-	2
Melibiosa	17	2
Rafinosa	-	-
Salicina	-	2
Trealosa	-	2
Xilosa	25	2
Manosa	-	2

#### 4.- DISCUSIÓN

El agar M17 mostró una selectividad moderada para el aislamiento de lactococos en este queso (sólo el 45,71% de los aislamientos obtenidos en este medio fueron clasificados como lactococos). La especie de lactococos que se aisló en mayor proporción fue *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Esta especie constituyó el 47,5% de los aislamientos efectuados en leche, su proporción se incrementó en cuajada (62,5% de los aislamientos) y todavía más en queso de una semana (70% de los aislamientos). A partir de este momento su presencia descendió notablemente alcanzando bajas proporciones en queso de 8 semanas de maduración (12,5% de los aislamientos) y de 16 semanas (17,5% de los aislamientos en M17 en este punto de muestreo). El aislamiento de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fue prácticamente testimonial. Los estudios previamente efectuados por otros autores, en diferentes variedades de queso, coinciden en señalar estas dos especies como muy minoritarias frente a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Algunos autores incluso (Martínez-Moreno (1976) en queso Manchego, Mas y González Crespo (1992) en queso de los Ibores, Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki (1992) en Telemé, Pouillet y col. (1993) en queso del

Casar de Cáceres), aislaron únicamente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, si bien algunas de estas cepas eran consideradas como atípicas.

El descenso en el número de lactococos a partir de la primera semana de maduración tiene lugar probablemente debido al efecto inhibitorio de los bajos valores de pH alcanzados (ver tablas III a VI del capítulo I) y de la elevada concentración sal/humedad, que entre la 8 y 16 semana de maduración alcanza valores del 9% aproximadamente. Este descenso, incluso más pronunciado, ha sido también observado por otros autores en diferentes variedades de quesos; Litopoulou-Tzanetaki (1990), trabajando en queso Kefalotyri, observó una total desaparición de los lactococos a partir del día 15 de maduración; en queso Telemé (Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992) la desaparición se produjo en momentos probablemente más tempranos todavía, no observándose lactococos a partir del 5º día de maduración.

Aunque los lactococos están presentes en prácticamente todas las variedades de queso estudiadas hasta la actualidad, en algunas variedades de queso no han sido detectados. Thompson y Marth (1986) trabajando en queso Parmesano y utilizando como medio de recuento y aislamiento agar APT, aislaron a lo largo del proceso madurativo únicamente lactobacilos; Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki (1992) tampoco detectaron lactococos a lo largo de la maduración del queso Feta utilizando como medios de aislamiento agar MRS y agar ROGOSA. Bien es verdad que en ambos casos los medios utilizados, debido fundamentalmente a sus bajos pHs, no son los más idóneos para el aislamiento de lactococos.

Los lactobacilos que se aislaron en proporciones insignificantes a partir de agar M17 en los primeros estadíos de la maduración, constituyeron las especies dominantes en queso de 8 semanas (57,5% de los aislamientos efectuados en agar M17) y de 16 semanas (32,5% de los aislamientos).

El aislamiento de *Leuconostoc* en agar M17 fue vestigial. De las 280 cepas aisladas en este medio sólo 4 fueron adscritas a este género. Es finalmente destacable el aislamiento de cepas de *Enterococcus* a partir sobre todo de la cuarta semana de maduración.

El número de cepas perdidas, entre los aislamientos efectuados en agar M17, fue muy elevado, especialmente en los tres primeros puntos de muestreo (leche, cuajada y queso de 1 semana). Es necesario apuntar que prácticamente todas estas pérdidas se produjeron durante la fase de purificación de las cepas (pases alternos en agar MRS y caldo MRS), lo que nos lleva a sospechar que posiblemente estas cepas no fueran bacterias acidolácticas.

Como hemos señalado previamente en el apartado de resultados de este capítulo, a pesar de su elevado contenido en sacarosa (100 g/l) y de la presencia de azida sódica (0,075 g/l), el agar MSE mostró en nuestro caso una selectividad muy baja para el aislamiento de *Leuconostoc* (sólo el 16,42% de los aislamientos efectuados en este medio pertenecieron a

---

este género), bien es verdad que el agar MSE fue de los tres medios utilizados para el aislamiento de la flora acidoláctica el que nos permitió el aislamiento de un mayor porcentaje de leuconostoc por lo que podría considerarse como electivo para el recuento y aislamiento de este género. Este medio de cultivo ha sido previamente ensayado por otros autores con resultados ligeramente más satisfactorios que los nuestros. Alonso Calleja (1991), trabajando en queso de cabra de Valdeteja, identificó como *Leuconostoc* el 28% de las cepas aisladas en agar MSE. Pouillet y col. (1993), en queso de oveja del Casar de Cáceres, obtuvo un 48,5% de leuconostoc entre los aislamientos efectuados en este mismo medio. En este medio podría hacerse un aislamiento y recuento selectivo de las especies que producen dextrano (y forman por lo tanto colonias mucosas, fácilmente reconocibles), pero sin embargo las colonias de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides* son totalmente indistinguibles de las de lactococos y lactobacilos.

Las especies de leuconostoc aisladas del queso de Armada coinciden con las identificadas en otros quesos de cabra (Fatichenti y col., 1979; Fontecha y col., 1990; Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 1992; Mas y González Crespo, 1992). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* fue la especie de *Leuconostoc* más abundante, siendo su presencia particularmente importante en queso de una semana (25% de los aislamientos en agar MSE) y en queso de 8 semanas (17,5%). Esta especie fue también descrita como mayoritaria en el queso de cabra de Valdeteja (Alonso Calleja, 1991) y en quesos elaborados con leche de otras especies como el Cabrales (Núñez y Medina, 1979) y el Roquefort (Devoyod, 1969).

La baja selectividad mostrada por el agar MSE hace que las especies aisladas en este medio sean un fiel reflejo de la evolución global de la flora acidoláctica a lo largo de la elaboración y maduración de este queso. Los lactococos (*L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*) fueron los gérmenes mayoritariamente aislados en este medio a partir de leche, cuajada y queso de 1 semana, mientras que los lactobacilos (*L. plantarum* y *L. casei* subsp. *casei*) predominaron entre los aislamientos efectuados a partir de queso de 2, 4, 8 y 16 semanas de maduración.

El número de aislamientos perdidos, de entre los efectuados en este medio fue también importante, particularmente en los primeros puntos de muestreo. Como ocurrió con el agar M17, prácticamente todas las pérdidas se produjeron cuando las cepas estaban en la fase de purificación y estaban siendo cultivadas en agar y caldo MRS. Esta dificultad para crecer en medio MRS nos llevó igualmente a sospechar que no se trataba de bacterias acidolácticas.

El agar ROGOSA, por último, mostró una selectividad bastante elevada para el aislamiento de lactobacilos (se clasificaron como tales el 86,07% de los aislamientos efectuados en este medio). En nuestro estudio el agar ROGOSA mostró una selectividad mayor que la observada por otros autores. Pouillet y col. (1993) sólo identificaron como

---

lactobacilos el 39,3% de los aislamientos efectuados en este medio. Alonso Calleja (1991) por su parte, trabajando en queso de Valdeteja, observó una deficiente selectividad de este medio, sobre todo en leche, cuajada y queso de 2, 5 y 10 días, donde aisló a partir de él fundamentalmente leuconostoc. Kandler y Weiss (1986) señalan que aunque en el agar ROGOSA crecen bien los lactobacilos, no es completamente selectivo y pueden crecer en él otras bacterias acidolácticas como leuconostocs, pediococos, enterococos, bifidobacterias (en muestras de origen intestinal) e incluso levaduras. Las especies de lactobacilos mayoritariamente aisladas en este medio fueron *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus plantarum*. Estas dos especies se hallaron en prácticamente la misma proporción y con una distribución muy similar en todos los puntos de muestreo; son las especies que mejor se desarrollan con un 5% de sal y un pH inicial de 5,0, por lo que su resistencia a la sal y a la acidez puede explicar el hecho de que sean las especies dominantes en la mayoría de los quesos madurados (Sharpe, 1979). Estas dos especies resultaron también mayoritarias en otros quesos de cabra como el Majorero artesanal (Fontecha y col., 1990), Majorero industrial (Gómez y col., 1989), blanco-salmuerizado (Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 1992) e Ibores (Mas y González Crespo, 1992); sin embargo en casi todos estos quesos *Lactobacillus plantarum* predominó claramente sobre *L. casei* subsp. *casei*, cosa que no ocurrió en el queso de Armada. Ambas especies fueron también aisladas como las únicas especies de lactobacilos en el queso Tafí de vaca (De Giori y col., 1983) y como mayoritarias en el Cabrales de mezcla (Núñez y Medina, 1979).

De estas dos especies *L. casei* subsp. *casei* parece ser la de mayor significación tecnológica. Este microorganismo ha sido descrito como la especie de *Lactobacillus* predominante en quesos de vaca como el de León (Rodríguez Medina y col., 1995), el Palmita venezolano (Ferrer Ocando y col., 1991), Kefalotiry (Litopoulou-Tzanetaki, 1990) y queso Cheddar Irlandés (Jordan y Cogan, 1993). En queso Parmesano, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* fue la bacteria acidoláctica mayoritaria y la única aislada a partir del segundo mes de maduración. En queso Palmita venezolano es considerada como la principal especie responsable de las características organolépticas del queso elaborado con leche pasteurizada (Ferrer Ocando y col., 1987; Ferrer Ocando y col., 1991). La contribución de este microorganismo en el desarrollo del sabor y del aroma del queso Cheddar ha sido puesta de manifiesto en numerosos trabajos (Marth, 1963). Más recientemente Trepanier y col. (1991) comprobaron que la adición de células vivas de *L. casei* subsp. *casei* y de homogeneizados de células de esta misma especie al queso Cheddar da lugar a un queso madurado de buena calidad con un 40% más de aroma con respecto a los quesos control elaborados sin este tipo de adiciones.

Solamente 10 cepas de lactobacilos fueron identificadas como *Lactobacillus brevis*, 8 de ellas a partir de queso de 16 semanas. Aunque este fenómeno también se ha observado en queso de vaca de León (Rodríguez Medina y col., 1995), es bastante atípico el aislamiento de

*Lactobacillus brevis* al final del proceso madurativo. En otros quesos donde se aisló esta especie u otros lactobacilos heterofermentativos (Litopoulou-Tzanetki, 1990; Thompson y Marth, 1986), se aislaron fundamentalmente en los primeros momentos de la maduración, desapareciendo después debido a su sensibilidad a las condiciones ambientales adversas. *Lactobacillus brevis* ha sido aislado también en queso Cabrales (Núñez y Medina, 1979), en el queso Casar de Cáceres (Poulet y col., 1993) y en queso Suízo (Langsrud y Reinbold, 1973). En esta última variedad es considerado responsable del sabor ácido.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**ALONSO CALLEJA, C.** (1991). Estudio microbiológico del queso de cabra de Valdeteja (León). Tesis Doctoral. Universidad de León.

**ARGYLE, P.J., MATHISON, G.E. y CHANDAN, R.C.** (1976). Production of cell-bound proteinase by *L. bulgaricus* and its location in the bacteria cell. *J. Appl. Bacteriol.*, 41:175-184.

**BARRIT, M.M.** (1936). The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol. *J. Path. Bacteriol.*, 42:441.

**BRIGGS, M.** (1953). The classification of Lactobacilli by means of physiological tests. *J. Gen. Microbiol.*, 9:234.

**CARINI, S., KADARAVEK, G. y LODI, R.** (1972). Lipolisi microbica: I Lattici. *Scienza tec. Latt.-casear.*, 23:377.

**CHANDER, H. y CHEBBI, N.D.** (1972). A study of lipolysis by lactic acid bacteria. *Ind. J. Animal Res.*, 6:9.

**COGAN, T.M.** (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *leuconostoc* spp:effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.*, 63:551-558.

**COGAN, T.M., O'DOWD, M. y MELLERICK, D.** (1981). Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1-8.

**COLLINS, E.B.** (1962). Symposium on lactic starter cultures I. Culture identity and selection. *J. Dairy Sci.*, 45:1263-1266.

**DE GIORI, G.S., DE VÁLDEZ, G.F., DE RUÍZ HOLGADO, A.P. y OLIVER, G.** (1983). Microflora of Tafí cheese. Changes during manufacture and maturation. *J. Food Prot.*, 46:518-521.

---

**DE GIORI, G.S., DE VALDEZ, G.F., DE RUIZ HOLGADO, A.P. y OLIVER, G.** (1985). Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 68:2160-2164.

**DEETH, H.C. y FITZ-GERALD, C.H.** (1975). Factors governing the susceptibility of milk to spontaneous lipolysis. *Int. Dairy Federation Annual Bulletin Document.*, 86:24-34.

**DEVOYOD, J.J.** (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort IV. Les entérocoques. *Lait*, 49:637-650.

**EL-SHAFEI, H., EL-SODA, M. y EZZAT, N.** (1990). The peptide hydrolase system of the leuconostoc. *J. Food Prot.*, 53:165-169.

**EL-SODA, M., BERGERE, J.L. y DESMAZEAUD, M.J.** (1978). Detection and localization of peptide hydrolase in *L. casei*. *J. Dairy Res.*, 45:519-524.

**EL SODA, M., DESMAZEAUD, M.J., LE BARS, D. y ZEVACO, C.** (1986). Cell-wall-associated proteinases in *L. casei* and *L. plantarum*. *J. Food Protect.*, 49:361-365.

**EXTERKATE, F.A.** (1984). Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:177-183.

**EVANS H.J., KWANTES, W., JENKINS, D.C. y PHILLIPS, J.I.** (1956). Sucrose loss from ice-cream on storage. *Analyst.*, Lond., 81:204.

**EZZAT, N., EL-SODA, M., BOUILLANNE, C., ZEVACO, C. y BLANCHARD, P.** (1984). Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *L. bulgaricus* and *L. lactis*. *Milchwissenschaft*, 40:140-143.

**FATICHEI, F., DEIANA, P., FARRIS, G.A. y SOGGIA, G.** (1979). Etudes microbiologiques sur le lait et le fromage de chèvre en Sardaigne. Note II: streptocoques, lactobacilles et leuconostoc. *Lait*, 59:387-400.

**FERRER OCANDO, A.J., URDANETA, G.D. y RINCÓN, Z.** (1987). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del queso Palmita venezolano. *Revista Ciencias*, 4:133-147.

**FERRER OCANDO, A.J., URDANETA, G.D., RINCON, Z., CABRERA, L.T. y BASANTA, Y.** (1991). Microflora isolated from Venezuelan "Palmita-type" cheese. *J. Food Prot.*, 54:856-860.

**FONTECHA, J., PELÁEZ, C., JUÁREZ, M., REQUENA, T., GÓMEZ, C. y RAMOS, M.** (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.*, 73:1150-1157.

---



**FORDYCE, A.M., CROW, V.L. y THOMAS, T.D.** (1984). Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in non-growing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:332.

**FRYER, T.F., REITER, B. y LAWRENCE, R.C.** (1967). Lipolytic activity of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 50:388-389.

**GARVIE, E.I.** (1960). The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27:283-292.

**GARVIE, E.I.** (1967). *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, 48:431-438.

**GARVIE, E.I.** (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc*s from other lactic acid bacteria. En *Methods in Microbiology*, Vol. 16, (Bergan, T. ed). Academic Press. London. p. 147-178.

**GARVIE, E.I.** (1986). Genus *Leuconostoc*. En *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. II. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (eds). Williams & Wilkins. Baltimore. p. 1071-1075.

**GIBSON, T. y ABD-EL-MALEK, Y.** (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.*, 14:35-44.

**GÓMEZ, R., PELÁEZ, C., DE LA TORRE, E.** (1989). Microbiological study of semi-hard goat's milk cheese (Majorero). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24:147-151.

**HARRIGAN W.F. y Mc CANCE, M.E.** (1979). Métodos estadísticos para la selección y análisis de colonias bacterianas. En *Métodos de laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos lácteos*. Academia. León. p. 43-45.

**JORDAN, K.N. y COGAN, T.M.** (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish J. Agric. Food Res.*, 32:47-55.

**KAMALY, K.M. y MARTH, E.H.** (1989). Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: a review. *J. Dairy Sci.*, 72:1945-1966.

**KAMALY, K.M., TAKAYAMA, K. y MARTH, E.H.** (1990). Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and their mutants. *J. Dairy Sci.*, 73:280-290.

**KAMINOGAWA, S., YAN, T.R., AGUMA, N. y YAMAUCHE, K.** (1986). Identification of low molecular weight peptides in Gouda type cheese and evidence for the

formation of these peptides from 23 N-terminal residues of  $\alpha_{s1}$ -casein by proteinases of *S. cremoris* H61. *J. Food Sci.*, 51:1253-1256 y 1264.

**KANDLER, O. y WEISS, N.** (1986). Genus *Lactobacillus*. En *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol II*. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holtz, J.G. (eds). Williams & Wilkins. Baltimore. p. 1209-1234.

**KANEKO, T., WATANABE, Y. y SUZUKI, H.** (1990). Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *L. lactis* subsp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth. *J. Dairy Sci.*, 73:291-298.

**KEDDIE, R.M.** (1959). *J. Appl. Bact.*, 22:403. Citado por Sharpe, M.E. (1962). Taxonomy of the Lactobacilli. *Dairy Sci. Abstracts*, 24:109-118.

**LANGSRUD, T. y REINBOLD, G.W.** (1973). Flavor development and microbiology of Swiss cheese. *J. Milk Food Technol.*, 36:593-609.

**LAW, B.A.** (1979). Extracellular peptidases in group N *Streptococci* used as cheese starters. *J. Appl. Bacteriol.*, 46:455-463.

**LAW, B.A. y KOLSTAD, J.** (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 49:225-245.

**LEE, B.H., HACHE, S. y SIMARD, R.E.** (1986). A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacteria by enzyme systems. *J. Ind. Microbiol.*, 1:209.

**LEE, S.Y. y LEE, B.H.** (1990). Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG. *J. Food Sci.*, 55:119-122, 126.

**LITOPOULOU-TZANETAKI, E.** (1990). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.*, 55:111-113.

**LITOPOULOU-TZANETAKI, E. y TZANETAKIS, N.** (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.*, 9:13-19.

**MAN J.C. DE, ROGOSA, M. y SHARPE, M.E.** (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23:130-135.

**MARTH, E.M.** (1963). Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening. A review. *J. Dairy Sci.*, 46:869-890.

**MARTÍNEZ-MORENO, J.L.** (1976). Flora microbiana del queso Manchego III. Estreptococos. *An. INIA/Ser. General*, N.4:41-56.

---

**MAS, M. y GONZALEZ-CRESPO, J.** (1992). Bacterias lácticas en el queso de los Ibores. *Alimentaria*, 41-43, 28, 230.

**MOAT, A.G.** (1985). *Biology of the lactic and propionic acid bacteria*. En *Biology of Industrial Microorganisms*. Demain, A.L. y Solomon, N.A. (eds.). The Benjamin/Cummings Co. Inc., Ontario. p. 143. Citado por Lee, B.H., Laleye, L.C., Simard, R.E., Holley, R.A., Emmons, D.B. y Giroux, R.N. (1990) en *J. Food Sci.*, 55:386-390.

**MUNDT, J.O.** (1986). Lactic acid streptococci. En *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol II*. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holtz, J.G. (eds). Williams & Wilkins. Baltimore. p. 1065-1066.

**NEVIANI, G., MUCCHETTI, G., GIRAFFA, G. y CARINI, S.** (1984). Cell-wall caseinolytic activity of *L. casei*. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 35:439-450.

**NÚÑEZ, M. y MEDINA, M.** (1979). La flore lactique du fromage bleu de Cabrales. *Le Lait*, 59:497-513.

**OLSON, N.F.** (1990). The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Reviews*, 87:131-148.

**POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. y LARRIBA, G.** (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *J. Dairy Res.*, 60:123-127.

**REUTER, G.** (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2:55-68.

**REPORT** (1958). Report of the *Enterobacteriaceae* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiological Societies. *Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.*, 8:25.

**REQUENA, T., PELAEZ, C. y DESMAZEAUD, M.J.** (1991). Characterization of *lactococci* and *lactobacilli* isolated from semihard goat's cheese. *J. Dairy Res.*, 58:137-145.

**RODRÍGUEZ MEDINA, M.L., TORNADIJO, M.E., CARBALLO, J. y MARTÍN SARMIENTO, R.** (1995). Microbiological study of León raw cow-milk cheese, a Spanish craft variety. *J. Food Prot.*, 57: En prensa.

**ROSS, G.D.** (1981). The inhibition of growth of spoilage microorganisms in milk by *S. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* and *L. dextranicum*. *J. Dairy Technol.*, 36:147-152.

**SHARPE, M.E.** (1962). Taxonomy of the Lactobacilli. *Dairy Sci. Abstr.*, 24:109-118.

---

**SHARPE, M.E.** (1979). Identification of the lactic acid bacteria. En *Identification methods for microbiologists*, (Skinner, B.A. and Lovelock, D.W. eds.). Academic Press. London. p. 233-259.

**SIMMONS, J.S.** (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating certain fungi. *J. Infect. Dis.*, 39:209-241.

**SINGH, A., SCRINIVASAN, S.A. y DUDANI, A.T.** (1973). Studies on exocellular and endocellular lipases of some of the lipolytic bacteria. *Milchwissenschaft*, 28:164-166.

**SMID, E.J., POOLMAN, B. y KONING, W.N.** (1991). Casein utilization by *Lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2447-2452.

**STADHOUDERS, J. y VERINGA, H.A.** (1973). Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27:77-91.

**STARRENBURG, M.J. y HUGENHOLTZ, J.** (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3535-3540.

**THOMAS, T.D., ELLWOOD, D.C. y LONGYEAR, V.M.C.** (1979). Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J. Bacteriol.*, 138:109-117.

**THOMAS, T.D., TURNER, K.W. y CROW, V.L.** (1980). Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *S. cremoris*: pathways, products and regulation. *J. Bacteriol.*, 144:672-682.

**THOMAS, T.D. y PRITCHARD, G.C.** (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46:245-268.

**THOMPSON, T.L. y MARTH, E.H.** (1986). Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora-aerobic plate count, lactic acid bacteria, psychrotrophic bacteria and aerobic spores. *Milchwissenschaft*, 41:86-89.

**TREPANIER, G., SIMARD, R.E. y LEE, B.H.** (1991) Lactic acid bacteria relation to accelerated maturation of Cheddar cheese. *J. Food Sci.*, 56:1238-1240.

**TZANETAKIS, N. y LITOPOULOU-TZANETAKI, E.** (1992). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two greek cheeses from ewes'milk. *J. Dairy Sci.*, 75:1389-1393.

**UMEMOTO, Y., UMEDA, H. y SATO, Y.** (1968). Studies on lipolysis of dairy lactic acid bacteria. Part II. On the lipolytic activities of cell-free extracts of lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 32:1311.

---

**VESCOVO, M. y BOTTAZZI, V.** (1979). Caratteristiche dei bacilli lattici presenti nelle colture naturali in siero, 6 parte: localizzazione citologica del sistema proteolitico in lizzazione citologica del sistema proteolitico in *L. helveticus*. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 30:434-437.

**VISSER, S., EXTERKATE, F.A., SLANGEN, C.J. y DE VEER, G.J.C.M.** (1986). Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *S. cremoris* on bovine  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ , and  $\kappa$ -casein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:1162-1166.

**WHITING, G.C.** (1975). Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages. En *Lactic acid bacteria in beverages and food*, (Carr, J.C., Cutting, C.V. and Whiting, G.C. eds.). Academic Press. London. p. 69-85.

**YAN, T.R., AZYMA, N., KAMINOGAWA, S. y YAMAUCHI, K.** (1987). Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metalloendopeptidasa from *S. cremoris* H61. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:2296-2302.

---



# **CAPÍTULO III. ESTUDIO DE LOS ENTEROCOCOS AISLADOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

Los enterococos se encuentran entre los muchos contaminantes de la leche y productos lácteos. Estos microorganismos pueden acceder a la leche y al queso a través del aire, agua, estiércol, insectos, o del equipo durante la elaboración.

Durante mucho tiempo se han considerado indicadores de las condiciones higiénicas observadas durante la producción y procesado de los alimentos, su presencia en el agua y los alimentos era un índice de contaminación fecal al igual que la presencia de coliformes y otras enterobacteriáceas (Batish y Ranganathan, 1984). Como también se tenía en cuenta su capacidad para producir alteraciones en el producto (algunas cepas son altamente proteolíticas) y el carácter patógeno relacionado con la producción de enterotoxinas, se rechazaban los productos en los que se encontraban presentes en proporciones elevadas.

Actualmente se cuestiona si los enterococos pueden realmente ser considerados indicadores de contaminación fecal ya que al tratarse de organismos muy resistentes a condiciones adversas como la temperatura, sal o acidez, no se podría relacionar claramente su presencia en un alimento con contaminación fecal (Bossi y col.,1986). Para evaluar la importancia y el significado de la presencia de estos microorganismos en un alimento, y su repercusión en la salud, sería necesario considerar antes varios factores como el tipo de producto, su tecnología de elaboración o la concentración en la que están presentes.

En tecnología quesera los enterococos forman parte de la flora microbiana normal de quesos elaborados con leche cruda, por lo que su presencia ha comenzado a interpretarse de modo diferente. Como la contaminación se produce de modo totalmente al azar, la concentración a la que se encuentran estos microorganismos varía mucho de unos quesos a

---

otros (Hernández y col., 1989). La presencia de algunas especies podría ser incluso deseable ya que poseen determinadas características que permitirían su utilización como cultivos iniciadores. La presencia de otra flora complementaria a las bacterias acidolácticas parece necesaria para que se desarrollen las características de textura y aroma que diferencian a los quesos artesanales.

Los enterococos tienen capacidad de acidificar, de producir compuestos aromáticos, de degradar proteínas y lípidos, bacteriolítica y estimulante de la actividad de lactococos y leuconostoc (Devoyod y Muller, 1969; Devoyod y Desmazeaud, 1970).

La actividad acidificante (que como es sabido depende tanto de la aptitud para fermentar la lactosa como de la resistencia a la acidez desarrollada) es, en los enterococos, altamente variable de unas cepas a otras e incluso dentro de la misma especie (Carrasco de Mendoza y col., 1992). Si bien las bacterias lácticas que comúnmente se emplean como estarters producen una acidificación final del medio superior, algunas especies de enterococos (*E. faecalis* var. *liquefaciens*) llevan a cabo una acidificación más rápida (Schmidt y Lenoir, 1972).

La capacidad de producir compuestos aromáticos como diacetilo o acetoína es bastante débil (Schmidt y Lenoir, 1972) y es probable que además de la lactosa los enterococos empleen otro tipo de sustratos como aminoácidos para la producción de ácidos orgánicos (propiónico o acético) (Ferrer Ocando y col., 1993).

Los enterococos también pueden ser capaces de utilizar el citrato de modo similar a como lo hace *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Como principales productos de la degradación del citrato producen CO<sub>2</sub> y acetato. El citrato puede, además, representar una fuente adicional de piruvato para las células. El metabolismo del piruvato parece ser muy similar al observado en las bacterias del grupo N streptococci; los principales productos derivados del piruvato son acetato, CO<sub>2</sub>, acetoína+diacetilo y lactato. Teniendo en cuenta que la formación de acetoína y diacetilo no ocurre hasta que la ruta de formación de acetato se ha saturado, cuando esta ruta está bloqueada (por inhibición de la piruvato-deshidrogenasa) tiene lugar el desvío metabólico hacia la formación de acetoína y diacetilo, obteniéndose como productos finales de la degradación del citrato, acetato, acetoína y/o diacetilo y CO<sub>2</sub> (Coventry y col., 1978).

La posibilidad de ocasionar deterioro en los alimentos está en relación con la capacidad proteolítica que es muy evidente en cepas de la especie *Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*. Si esta especie se encuentra en muy elevada proporción, la calidad del producto se puede ver deteriorada por degradación de las proteínas y aparición de sabores amargos. *E. faecium* puede provocar alteraciones en productos lácteos envasados, originando sabores ácidos y texturas anormales (Devoyod, 1969). Además algunas cepas de *E. faecalis* y *E.*

---



*faecium* pueden, incluso, ser proteolíticas a temperaturas de refrigeración (Wessels y col., 1990).

Los enterococos poseen sistemas proteolíticos extracelulares y endocelulares. *E. faecalis* var. *liquefaciens* posee proteinasas extracelulares que hidrolizan las caseínas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y otras proteínas de la leche liberando péptidos y polipéptidos (Schmidt y Lenoir, 1972; Mucchetti y col., 1982; García de Fernando y col., 1991a y b; García de Fernando y col., 1992). Las proteinasas endocelulares de *E. faecium* y *E. durans* son liberadas al medio con la lisis de la célula (Schmidt y Lenoir, 1972).

No está claro en qué rango de pH y T<sup>a</sup> se desarrolla la actividad óptima de la proteasa endocelular de *E. faecium*. Según Wallace y Harmond (1970) tiene lugar a pH 7,5, conservando alguna actividad a pH 5,5-6,0 (de modo similar a la actividad primaria y secundaria de las proteasas de *Lactococcus lactis*). Esto supondría la existencia de dos enzimas o bien dos formas ionizables del mismo enzima. Según Schmidt y Lenoir (1972), la actividad óptima ocurriría a pH 5,4-5,7 y T<sup>a</sup> de 45°C.

También se aprecian similitudes entre la estabilidad térmica de la proteasa intracelular de *Enterococcus faecium* y la de la proteasa extracelular de *Lactococcus lactis*. Tras un calentamiento de 97°C a 99°C y a un pH de 6,0-7,5, la endoproteasa de *Enterococcus faecium* se mantiene estable durante un periodo de 60 minutos y pierde el 10% de actividad a un pH de 8,5 después de 30' y el 21% al cabo de 60'. Esta termoestabilidad puede deberse a una estabilidad inherente a la molécula o bien a la presencia de factores protectores (Wallace y Harmond, 1970).

La actividad óptima de la proteasa extracelular de *E. faecalis* ocurre a un pH de 7,3, y a pH 5,6 (más próximo al que suele darse en un queso) presenta un 50% de la actividad máxima (Schmidt y Lenoir, 1972).

Aunque los enterococos son principalmente proteolíticos, también pueden tener capacidad para hidrolizar los triglicéridos de la leche, esta capacidad lipolítica es más intensa en cepas de la especie *E. faecalis* var. *liquefaciens* (Carrasco de Mendoza y col., 1992).

La lipasa de *E. faecalis* es específica sobre todo para triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta, capaces de formar fácilmente emulsiones, como la tributirina, y tiene menos preferencia hacia lípidos con largas cadenas de AG insaturados, como la trioleína. El orden de preferencia sería: tributirina>tricaproína>tricaprilina>trioleína (Chander y col., 1979).

El pH y temperatura óptimos para la actividad de la lipasa de *E. faecalis* es 7,5 y 40°C, respectivamente, y ligeras variaciones por encima y debajo de esos valores inhiben la actividad de la enzima (Chander y col., 1979).

Se suele apreciar una similitud entre la especificidad y las condiciones óptimas de actuación (pH y T<sup>a</sup>) de las lipasas de enterococos y bacterias lácticas (Umemoto y col., 1968).

Pompei y col. (1992) han ensayado la actividad bacteriolítica de los enterococos frente a especies de micrococáceas, concluyendo que se trata de una propiedad constante en todas las cepas de una misma especie, pero que varía entre cepas de diferentes especies. La producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) comienza en la fase logarítmica de crecimiento y su actividad es máxima en la fase estacionaria (Villani y col., 1993).

Mc Kay (1990) demostró la producción por *E. faecium* de una bacteriocina cuya acción antimicrobiana era especialmente intensa frente a *Listeria*. La producción de bacteriocinas parece requerir la presencia de determinadas sustancias como péptidos; si éstos se encuentran en concentración limitada pueden no ser producidas. *E. faecalis* produce también una sustancia de naturaleza proteica, activa frente a *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* y cepas de enterococos. Es moderadamente estable al calor, (resiste calentamientos de 90°C/30', manteniendo el 50% de su actividad después de 100°C/30' y se inactiva completamente después de 121°C/15'); esta bacteriocina se inactiva también por acción de determinadas enzimas proteolíticas, con excepción de la pepsina (Villani y col., 1993).

Las bacteriocinas producidas por enterococos pueden tener aplicación en la identificación de este grupo microbiano y al ser resistentes a la renina también tendrían aplicación tecnológica. Se podrían incluir cepas de enterococos con esta propiedad en los starters lácticos, así el pH ácido y las bacteriocinas ejercerían un efecto sinergista en la inhibición de *Listeria* y otros microorganismos patógenos (Giraffa y col., 1994).

Es posible que los enterococos tengan un papel importante en la maduración de los quesos, a través de su acción glicolítica y por la posibilidad que determinadas cepas de *E. faecalis* tienen de degradar la caseína e hidrolizar los triglicéridos.

## **2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO**

Además del material general que se describe en el capítulo I se utilizaron los microscopios ópticos OLYMPUS CHB CO11 y de contraste de fases NIKON 8TR-Ke-Ph.

---

## 2.2.- MÉTODOS

### 2.2.1.- AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

En agar KAA, tras incubar a 37°C durante 24 horas, de cada punto de muestreo, y en cada uno de los cuatro lotes, se aislaron 10 cepas. Un total de 270 cepas que se mantuvieron en frascos de agar nutritivo inclinado hasta proceder a su purificación. Una vez purificadas mediante 2 pases alternos en agar nutritivo-caldo nutritivo, las cepas se guardaron congeladas en caldo nutritivo en tubos eppendorf con un 20% de glicerol hasta su identificación.

Durante la fase de identificación, en cada cepa se realizó periódicamente una tinción de Gram para verificar la pureza del cultivo.

### 2.2.2.- ADSCRIPCIÓN A GÉNERO

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

- **Gram y morfología:** A partir de un cultivo en TSB (Tryptone-Soya-Broth) de aproximadamente 12 horas se realizó una tinción de Gram, observando el carácter Gram + ó -, la morfología, disposición de las células, etc.

- **Catalasa:** En un cultivo de aproximadamente 24 horas en TSA (Tryptone-Soya-Agar), se añadieron a las colonias unas gotas de agua oxigenada al 30% y se observó la formación de burbujas de O<sub>2</sub>.

- **Producción de CO<sub>2</sub> a partir de la glucosa:** Las cepas se sembraron en el medio de Gibson y Abd-El-Malek (1945), añadiendo a cada tubo un tapón de agar, se incubaron a 37°C y se observó el desprendimiento de gas a las 24, 48 y 72 horas y a los 7 días de incubación.

- **Crecimiento a 10°C:** Se observó la presencia o no de crecimiento después de 10 días de incubación en TSB a esta temperatura.

- **Crecimiento a 37°C:** En caldo TSB, tras 3 días de incubación.

- **Crecimiento a 40°C:** En caldo TSB, tras 3 días de incubación.

- **Crecimiento a 45°C:** En caldo TSB, tras 48 horas de incubación.

- **Crecimiento en presencia de 4% y 6,5% de NaCl:** Se observó el crecimiento después de tres días de incubación a 37°C en TSB con cada una de las concentraciones salinas mencionadas.

---

- **Crecimiento a pH 9,6:** En caldo BHI (Brain-Heart-Infusion), ajustado con  $K_3PO_4$  al 20%.

El caldo se esterilizó en autoclave a  $121^\circ C$  durante 15' y el  $K_3PO_4$  se esterilizó por filtración; justo antes de sembrar se añadió a cada tubo y en condiciones estériles las gotas necesarias para que el caldo BHI alcanzase el pH 9,6. Se prepararon además dos controles, uno para ajustar al pH adecuado los tubos que iban a ser sembrados y otro para medir el pH al cabo de 24 horas. Tras un día de incubación a  $30^\circ C$  el tubo control presentó un descenso variable del pH.

Se sembraron y se cerraron los tubos con parafilm para reducir el intercambio de gases con la atmósfera y que así el pH variase lo menos posible, incubando a  $30^\circ C$  durante 24 a 48 horas.

No se consideró una prueba definitiva de discriminación ya que se pueden dar variaciones del pH, pudiendo ocurrir que no tengan todos los tubos el mismo pH que el ajustado para el control; además el pH puede variar con el tiempo de incubación.

- **Resistencia al calentamiento a  $60^\circ C$  durante 30':** Un cultivo en TSB de 12 a 24 horas se mantuvo durante 30' en un baño a  $60^\circ C$ , a continuación se sembró en TSA y se incubó a  $37^\circ C$ , durante 48 horas. Se apuntó la presencia o no de crecimiento en las placas.

- **Crecimiento en agar bilis esculina:** Se incubó durante tres días en el medio Bile-Esculin-Agar (Difco) a  $30^\circ C$  y se observó el crecimiento y la hidrólisis de la esculina.

Los enterococos toleran la presencia de bilis por lo que pueden multiplicarse en este medio. Hidrolizan el glucósido esculina a glucosa y esculetina. La esculetina forma con iones  $Fe^{3+}$  un complejo de color desde verde oliva hasta negro, que suele ser visible a las 24 horas de incubación. La hidrólisis de la esculina y la tolerancia a la bilis son consideradas como características fidedignas y constantes de los enterococos (Facklam, 1972, 1973).

- **Crecimiento en agar KF y reducción del TTC:** Este medio lleva lactosa y maltosa que son utilizados por la mayoría de los enterococos con formación de ácido que se pone de manifiesto por el viraje a amarillo del indicador purpura de bromocresol. También lleva azida sódica.

Los enterococos reducen el TTC (2,3,5 - cloruro de trifenil-tetrazolio) presente en el medio dando lugar a colonias de color rojo. *E. faecalis* y sus variedades dan colonias rojas con buen crecimiento y casi siempre con halo amarillo, *E. faecium* da colonias rosas por su menor facilidad para reducir el TTC.

Las cepas se incubaron en este medio a 37°C durante 48 horas y se apuntó la presencia o no de crecimiento y en caso afirmativo el color, tipo de colonias y la presencia o no de halo amarillo.

Tras realizar las pruebas de adscripción a género se consideraron enterococos los cocos Gram +, agrupados en parejas o cadenas cortas, catalasa -, anaerobios facultativos, homofermentadores (producen L-Lactato como producto principal de la fermentación de la glucosa), que crecieron a 10°C, 37°C, 40°C y por lo general a 45°C, crecieron en presencia de 6,5% NaCl, a pH 9,6 y en presencia de 40% de bilis, en agar KF formaron colonias rojas o rosas, normalmente con halo amarillo y sobrevivieron tras calentamiento a 60°C durante 30'. Algunos cultivos de otros microorganismos como por ejemplo lactococos, aerococos, pediococos o leuconostoc pueden crecer en caldo con 6,5% NaCl o ser bilis (+), esculina (+).

### 2.2.3.- IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

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

- **Crecimiento en presencia de 0,1% de azul de metileno:** Las cepas se sembraron en leche descremada con 0,1% de azul de metileno y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Se observó la reducción del azul de metileno.

- **Desaminación de la L-arginina:** Se utilizó caldo TSB suplementado con 0,3% de monoclóhidrato de L-arginina que se sembró e incubó a 37°C durante 3 días. La producción de amoniaco a partir de la arginina se puso de manifiesto haciendo reaccionar una gota del cultivo con una gota del reactivo de Nessler.

- **Crecimiento en presencia de 0,04% de telurito potásico:** Las cepas se sembraron en TSA con 0,04% de telurito potásico y se incubaron a 37°C durante 48 horas. La prueba se consideró positiva cuando se observó crecimiento en forma de colonias negras debido a la capacidad de reducción del telurito.

- **Crecimiento en agar KF:** Aunque el crecimiento en agar KF es también una prueba de adscripción a género puede ayudar a discriminar entre especies, de hecho *E. faecalis* y *E. faecium* difieren en la capacidad de reducir el TTC.

- **Crecimiento a 45°C:** Se sembraron las cepas en caldo TSB y se incubaron a 45°C durante 48 horas. La capacidad de crecer en estas condiciones contribuye a discriminar entre especies de enterococos (la mayoría de ellos son capaces de crecer a esta temperatura por lo que representa también una prueba de adscripción a género).

---

- **Crecimiento a 50°C:** La siembra se hizo en caldo TSB y se incubó a 50°C durante 48 horas. Esta prueba permite discriminar entre *E. faecalis* que no crece a esa temperatura y *E. faecium* que sí es capaz de crecer.

- **Fermentación de azúcares:** Se utilizó el mismo medio basal de fermentación de azúcares que para las bacterias lácticas (Harrigan y Mc Cance, 1979), ajustando el pH del medio a 7,5.

Los azúcares ensayados fueron: L-arabinosa, arbutina, melezitosa, melibiosa, sorbitol, sorbosa, ramnosa, rafinosa, almidón y sucrosa.

La reducción del tetrazolio, resistencia al telurito y producción de ácido del sorbitol y del glicerol son características de la especie *E. faecalis*, mientras *E. faecium* y *E. durans* no suelen dar positivo a estos tests. A diferencia de las otras dos especies *E. faecium* normalmente produce ácido a partir de la arabinosa. Para diferenciar *E. faecium* de *E. durans* se realizan los tests de fermentación del manitol, arabinosa y sucrosa que resultan positivos para *E. faecium* y negativos para *E. durans* (Facklam, 1972).

Como se ha descrito en el capítulo anterior, se han aislado también cepas de enterococos en los medios agar M17, agar MSE y agar Rogosa. Para estas cepas, al ser inicialmente identificadas conjuntamente con los lactococos, leuconostoc y lactobacilos, se poseen datos también de la fermentación de otros azúcares (xilosa, trealosa, manitol, salicina, inulina, glicerol, ribosa y maltosa).

Para la identificación a nivel de especie se siguieron los criterios propuestos por Mundt (1986).

### 3.- RESULTADOS

La tabla I recoge la distribución de las especies aisladas en agar KAA durante la elaboración y maduración del queso de Armada.

De los 270 aislamientos realizados en KAA, 248 se identificaron como enterococos (2 de ellos dudosos). De éstos, 211 cepas pertenecieron a la especie *E. faecalis*, 6 a *E. durans*, 1 a *E. faecium*, 10 cepas presentaban similitud con la especie *E. faecalis* por lo que fueron denominadas "*E. like-faecalis*" y 18 presentaban caracteres intermedios entre *E. faecalis* y *E. faecium*, se les denominó "*E. inter faecalis-faecium*".

Como se describió en el capítulo anterior se aislaron 32 cepas de enterococos en agar M17, 26 cepas en agar MSE y 2 cepas en agar ROGOSA. De estos 60 enterococos, 25 se identificaron como *E. faecalis*, 1 *E. faecium*, 4 "*E. inter faecalis-faecium*", 25 *E. malodoratus* y 2 cepas quedaron sin identificar; 3 cepas se consideraron enterococos dudosos.

La especie de *Enterococcus* que apareció como dominante en el queso de Armada fue *E. faecalis*. A esta especie pertenecieron el 85,08% de los enterococos aislados en KAA y el 40,32% de los enterococos aislados en los otros medios.

Como se puede apreciar a la vista de los resultados obtenidos, el agar KAA presentó en nuestro estudio una alta selectividad para el aislamiento de enterococos.

Las características bioquímicas de las cepas aisladas en KAA se muestran en la tabla II.

Las características bioquímicas de las cepas de enterococos aisladas en los otros medios de cultivo aparecen reflejadas en la tabla III.

---

Tabla I.- Distribución de las especies aisladas en KAA durante la fabricación y maduración de cuatro lotes del queso de Armada, variedad Sobado.

Especies	Leche		Cuajada		Semanas de maduración													
					1		2		4		8		16					
	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)				
<i>Enterococcus faecalis</i>	28	70	28	70	29	72,5	40	100	37	92,5	30	75	19	63,3				
<i>Enterococcus like-faecalis</i>	1	2,5	3	7,5	4	10	—	—	—	—	1	2,5	1	3,3				
<i>Enterococcus faecium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2,5	—	—				
<i>Enterococcus durans</i>	—	—	2	5	—	—	—	—	1	2,5	3	7,5	—	—				
<i>Enterococcus inter faecalis-faecium</i>	10	25	1	2,5	4	10	—	—	1	2,5	2	5	—	—				
<i>Enterococci dudosos</i>	—	—	—	—	1*	2,5	—	—	1*	2,5	—	—	—	—				
<i>Lactobacillus casei ssp. casei</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3,3				
<i>Lactobacillus casei ssp. alactosus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	16,6				
Cepas perdidas	1	2,5	6	15	2	5	—	—	—	—	3	7,5	4	13,3				
Total	40	100	40	100	40	100	40	100	40	100	40	100	30	100				



Tabla II.- Características bioquímicas de los enterococos aislados en KAA durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Prueba bioquímica	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	" <i>E. Inter faecalis-faecium</i> "	<i>E. durans</i>	" <i>E. like-faecalis</i> "	Enterococos dudosos
Nº de cepas	211	1	18	6	10	2
Crec. 45°C	190	1	9	6	10	1
Crec. 50°C	13	1	0	0	0	0
Crec. pH 9,6	201	1	18	6	10	2
Crec. 6,5% NaCl	211	1	12	6	10	1
Crec. 0,1% Azul Metileno	211	1	18	6	10	2
Res. 60°C/30'	207	1	16	6	8	2
Crec. 0,04% K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>	210	0	10	2	10	1
Ferm. Arabinosa	0	1	4	0	0	0
Arbutina	211	1	18	6	10	2
Melezitosa	211	0	17	0	10	1
Melibiosa	0	1	16	2	10	1
Sorbitol	211	0	16	0	10	2
Sorbosa	0	0	11	0	0	1
Ramnosa	3	0	7	0	1	1
Rafinosa	0	0	6	0	0	0
Almidón	211	1	17	6	10	1
Sucrosa	211	0	17	0	10	1
Crec. en KF	211	1	18	3 y 3 (+/-)	10	2 (+/-)
Des. Arginina	211	1	7	6	10	1

Tabla III.- Características bioquímicas de los enterococos aislados en medios diferentes al KAA durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Prueba bioquímica	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	" <i>E. Inter faecalis-faecium</i> "	<i>E. malodoratus</i>	Enteroc. sin identificar a especie	Enterococos dudosos
Nº de cepas	25	1	4	25	2	3
Crec. 45°C	25	1	4	0	0	0
Crec. 50°C	7	0	1	0	0	0
Crec. pH 9,6	20	1	4	18	2	1
Crec. 6,5% NaCl	24	1	4	20	2	3
Crec. 0,1% Azul Metileno	25	0	4	13	2	2
Crec. 40% bilis	25	1	4	11	1	2
Res. 60°C/30'	20	1	4	14	2	1
Coag. leche	9*+13**	0	2*+2**	0	1**	0
Hidr. Esculina	25	1	4	8	1	2
Red. 0,04% K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>	25	0	4	0	1	0
Ferm. Arabinosa	2	0	0	0	1	0
Arbutina	25	1	4	25	2	2
Melezitosa	23	0	4	10	2	1
Melibiosa	0	1	4	25	1	2
Sorbitol	25	0	4	22	1	0
Sorbosa	0	1	4	25	1	0
Ramnosa	24	0	4	21	0	0
Rafinosa	5	1	1	4	0	2
Almidón	25	1	4	17	2	2
Sucrosa	25	1	4	25	2	1
Crec. en KF	25	1	4	25	2	2 y 1 (+/-)
Des. Arginina	25	1	4	0	0	3

\* Coagulan la leche a las 48 horas.

\*\* Coagulan la leche al cabo de 72 horas.

#### 4.- DISCUSIÓN

El agar KAA mostró en nuestro caso una selectividad muy elevada para el aislamiento de enterococos, representando el 91,85% de los aislamientos realizados en este medio; únicamente en el último punto de muestreo se aislaron 6 cepas que no eran enterococos (1 identificada como *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y 5 como *casei* subsp. *alactosus*).

La especie predominante fue *Enterococcus faecalis*, constituyendo el 100% de los aislamientos realizados en queso de 2 semanas de maduración y más del 60% en el resto de los puntos de muestreo. Algunos aislamientos (10) mostraron características muy próximas a *Enterococcus faecalis* pero sin coincidir exactamente con los patrones bioquímicos y culturales de esta especie por lo que consideramos más correcto integrar estas cepas bajo el nombre de "*Enterococcus like-faecalis*", este grupo incluye cepas móviles que se han venido incluyendo en la especie *Enterococcus faecalis* y cuya inclusión en esta especie es errónea, pues *E. faecalis* se trata de una especie no móvil. En algunos casos se hacen necesarios estudios de composición de bases del DNA y de hibridación de ácidos nucleicos para asegurar una adscripción más fiable de las cepas a la especie correspondiente. 6 aislamientos fueron identificados como *Enterococcus durans* y sólo 1 como *Enterococcus faecium*. Finalmente 18 aislamientos mostraron características intermedias entre *E. faecalis* y *E. faecium* y por ello fueron considerados como "*Enterococcus inter faecalis-faecium*".

El aislamiento de enterococos en agar M17 después de la cuarta semana de maduración fue notable, siendo de nuevo *E. faecalis* la especie predominante entre los enterococos aislados en este medio (20% de los aislamientos realizados a las 4 semanas de maduración, 10% de los realizados a las 8 semanas de maduración y 17,5% en el último punto de muestreo).

En agar MSE también se aislaron de una forma significativa enterococos. En este medio de cultivo la especie de *Enterococcus* predominante fue *E. malodoratus*. Esta especie, que también se aisló en agar M17 aunque en mucha menor proporción, ha sido también descrita en queso Gouda (Collins y col., 1984) y por Alonso Calleja (1991) en queso de cabra de Valdeteja. Sorprendentemente no fue aislada en agar KAA.

Considerando globalmente los resultados obtenidos en los distintos medios de cultivo, podemos concluir que *Enterococcus faecalis* es la especie de *Enterococcus* dominante en el queso de Armada, variedad Sobado. *E. faecalis* ha sido igualmente descrito como la especie de *Enterococcus* mayoritaria en otros quesos de cabra artesanales como el de Cerdeña (Fatichenti y col., 1979), Majorero (Fontecha y col., 1990) e Ibores (Mas y González Crespo, 1992). De entre los quesos de cabra elaborados con leche cruda, sólo en el queso madurado en

salmuera (Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 1992) *E. faecalis* no fue mayoritario, siendo en este caso predominante *E. faecium*.

*E. faecalis* ha sido también aislado en proporciones elevadas en el queso Ulloa (Burgos y Ordóñez, 1977; Ordóñez y Burgos, 1977) los autores lo relacionan con la elevada proteólisis que presenta este queso. Ordóñez y col. (1978) aislaron también esta especie en proporciones muy elevadas (80% de los enterococos) en queso Manchego. Sin embargo Martínez-Moreno (1976), estudiando también la población de enterococos del queso Manchego, aisló *Enterococcus durans* como la especie mayoritaria al predominar en el aire de la sala de fabricación. Esto no debe resultar extraño ya que la llegada de estos microorganismos al queso tiene lugar de un modo totalmente aleatorio, habitualmente por contaminación durante la elaboración.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**ALONSO CALLEJA, C.** (1991). Estudio microbiológico del queso de cabra de Valdeteja (León). Tesis Doctoral. Universidad de León.

**BATISH, V.K. y RAUGANATHAN, B.** (1984). Occurrence of *Enterococci* in milk and milk products. II. Identification and characterization of prevalent types. *N. Z. J. Dairy Technol.*, 19:189-196.

**BOSSI, M.G., MUCCHETTI, G. y NEVIANI, E.** (1986). Les levains cultivés dans le lait en technologie fromagère. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 4:35-41.

**BURGOS, J. y ORDÓÑEZ, J.A.** (1977). Étude de la variété de fromage "Ulloa". II: Préparation d'un levain pour sa fabrication à partir de lait pasteurisé. *Le Lait*, 57:278-286.

**CARRASCO DE MENDOZA, M., SCARINCI, H.E., GARAT, M.H. y SIMONETTA, A.C.** (1992). Technological properties of *Enterococci* in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 10:289-293.

**CHANDER, H., RANGANATHAN, B. y SINGH JASJIT,** (1979). Purification and some properties of lipases from *Streptococcus faecalis*. *J. Food Sci.*, 44:1747-1751.

**COLLINS, M.D., JONES, D., FARROW, J.A.E., KILPPER-BÄLZ, R. y SCHLEIFER, K.H.** (1986). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:220-223.

**COVENTRY, M.J., HILLIER, A.J. y JAGO, G.R.** (1978). The metabolism of pyruvate and citrate in the thermophilic cheese starter *Streptococcus faecium* (*S. durans*). *The Australian Journal of Dairy Technology*, Dic.:148-154.

**DEVOYOD, J.J.** (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Lait*, 49:637-649.

**DEVOYOD, J.J. y DESMAZEAUD, M.** (1970). Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des leuconostoc. Nature des substances stimulantes produites par *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *Lait*, 50:374-390.

**DEVOYOD, J.J. y MULLER, M.** (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostocs. Influence de différents micro-organismes de contamination. *Lait*, 49:369-380.

**FACKLAM, R.R.** (1972). Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Microbiol.*, 23:1131-1139.

**FACKLAM, R.R.** (1973). Comparison of several laboratory media for presumptive identification of *Enterococci* and group D *Streptococci*. *Appl. Microbiol.*, 26:138-145.

**FATICENTI, F., DEIANA, P., FARRIS, G.A., SOGGIA, G.** (1979). Etudes microbiologiques sur le lait et le fromage de chèvre en Sardaigne. Note II: streptocoques, lactobacilles et leuconostoc. *Lait*, 59:387-400.

**FERRER OCANDO, A., GRANADOS, A., BASANTA, Y., GUTIÉRREZ, B. y CABRERA, L.** (1993). Organic acids of low molecular weight produced by *Lactobacilli* and *Enterococci* isolated from Palmita-type Venezuelan cheese. *Food Microbiology*, 10:1-7.

**FONTECHA, J., PELAEZ, C., JUAREZ, M., REQUENA, T. y GOMEZ, C.** (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.*, 70:1150-1157.

**GARCÍA DE FERNANDO, G.D., HERNÁNDEZ, P.E., BURGOS, J., SANZ, B. y ORDÓÑEZ, J.A.** (1991 a). Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. I. Growth and extracellular proteinase production under different culture conditions. *Folia Microbiol.*, 36:423-428.

**GARCÍA DE FERNANDO, G.D., HERNÁNDEZ, P.E., BURGOS, J., SANZ, B. y ORDÓÑEZ, J.A.** (1991 b). Extracellular proteinase from *E. faecalis* subsp. *liquefaciens*. II. Partial purification and some technological important properties. *Folia Microbiol.*, 36:429-436.

---

**GARCÍA DE FERNANDO, G.D., SANZ, B., ASENSIO, M.A. y ORDÓÑEZ, J.A.** (1992). Effect of extracellular proteinase of *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* on protein breakdown in cheese. *Milchwissenschaft*, 47:420-422.

**GIBSON, T. y ABD-EL-MALEK, Y.** (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.*, 14:35.

**GIRAFFA, G., NEVIANI, E. y TORRI, G.** (1994). Antilisterial activity by *Enterococci* in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an italian soft cheese. *J. Dairy Sci.*, 77:1176-1182.

**HERNÁNDEZ, M., BARNETO, R. y GARRIDO, P.** (1989). Microbiología del queso de Gamonedo. *Alimentaria*, Sept.:47-50.

**LITOPOULOU-TZANETAKI, E. y TZANETAKIS, N.** (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.*, 9:13-19.

**McKAY, A.M.** (1990). Antimicrobial activity of *E. faecium* against *Listeria* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 11:15-17.

**MARTÍNEZ-MORENO, J.L.** (1976). Flora microbiana del queso Manchego. III. Estreptococos. *Anales del INIA/Ser. General*, 4:41-56.

**MAS, M. y GONZALEZ-CRESPO, J.** (1992). Bacterias lácticas en el queso de los Ibores. *Alimentaria*. 28:230:41-43.

**MUCCHETTI, G., NEVIANI, E., TODESCO, R. y LODI, R.** (1982). Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. II: attività caseinolitica e lipolitica. *Latte*, 7:821-831.

**MUNDT, J.O.** (1986). Enterococci. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol II. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holtz, J.G. (eds.). Williams & Wilkins. Baltimore. p. 1063-1065.

**ORDÓÑEZ, J.A. y BURGOS, J.** (1977). Étude de la variété de fromage "Ulloa". 1. Evolution de la flore microbienne et des composants azotés au cours de la maturation. *Le Lait*, 57:150-163.

**ORDÓÑEZ, J.A., BARNETO, R. y RAMOS, M.** (1978). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft*, 33:609-613.

**POMPEI, R., THALLER, M.C., PITTALUGA, F., FLORE, O. y SATTA, G.** (1992). Analysis of bacteriolytic activity patterns, a novel approach to the taxonomy of *Enterococci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42:37-43.

---

**SCHMIDT, J.L. y LENOIR, J.** (1972). Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques. *Lait*, 52:536-557 y 664-683.

**UMEMOTO, Y., UMEDA, H y SATO, Y.** (1968). Studies on the lipolysis of dairy lactic acid bacteria. 2. On lipolytic activity of cell-free extract of lactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 30:1311.

**VILLANI, F., SALZANO, G., SORRENTINO, E., PEPE, O., MARINO, P. y COPPOLA, S.** (1993). Enterocin 226 NWC, a bacteriocin produced by *E. faecalis* 226, active against *L. monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74:380-387.

**WALLACE, D.L. y HARMOND, L.G.** (1970). Intracellular protease from *S. durans*. *J. Dairy Sci.*, 53:394-409.

**WESSELS, D., JOOSTE, P.J. y MOSTERT, J.F.** (1990). Technologically important characteristics of *Enterococci* isolates from milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 10:349-352.

---





# **CAPÍTULO IV. ESTUDIO DE *ENTEROBACTERIACEAE* AISLADAS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

Las enterobacteriáceas son uno de los grupos microbianos más importantes en la leche cruda. Estos microorganismos acceden a la leche por falta de higiene durante el ordeño o procedentes del ambiente, pudiéndose aislar también en queso, principalmente en las etapas tempranas de la maduración.

La importancia de este grupo microbiano en leche destinada a la elaboración de queso y en el queso mismo radica en dos aspectos:

### **- Higiénico-sanitario:**

Determinados géneros como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* o *Escherichia* pueden presentar cepas enteropatógenas.

Como índice del grado de higiene se emplea normalmente el recuento de enterobacteriáceas o el de coliformes. La presencia en número elevado de estos microorganismos indicaría en cada caso:

- Métodos de ordeño y/o fabricación poco higiénicos.
- Inadecuada pasterización de la leche.
- Contaminaciones post-pasterización.

En quesos elaborados con leche cruda se suele aislar un número alto de enterobacteriáceas debido a deficiencias de higiene durante el ordeño y posterior manipulación.

---

**- Tecnológico:**

Además de entrañar un riesgo para la salud, algunas especies pueden causar problemas de tipo tecnológico; *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* pueden degradar la lactosa produciendo CO<sub>2</sub> y originando problemas de textura, conocidos como "hinchazón precoz". También ciertas cepas psicrotrofas de enterobacteriáceas pueden exhibir propiedades proteolíticas y lipolíticas (Juven y col., 1981).

El número de *Enterobacteriaceae* es un indicador de la calidad higiénica del queso y su detección tiene interés tanto higiénico-sanitario como preventivo de defectos de aroma y textura, siendo indeseable su presencia en número elevado (Lück y Dunkeld, 1981).

Una buena refrigeración de la leche durante el almacenamiento y transporte podría controlar el crecimiento de la mayoría de estos microorganismos (Núñez y col., 1984).

Los valores de pH y de acidez titulable de la leche también influyen en la población de enterobacteriáceas (Gaya y col., 1987), y en la fabricación de quesos el empleo de cultivos iniciadores adecuados juega un importante papel en el control de estos microorganismos a través de la producción de ácido láctico y el consiguiente descenso de pH y, posiblemente también por la producción de alguna sustancia con capacidad inhibitoria del crecimiento (Hargrove y col., 1969; Gibbs, 1987).

Las enterobacterias tienen un metabolismo anaerobio facultativo. La forma más común que tienen de degradación de los azúcares es a través de una fermentación ácido-mixta, que da lugar a la formación de gran cantidad de ácidos (ácidos láctico, acético, succínico, fórmico (o bien sus productos de degradación CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>)) y etanol.

Esta ruta es característica de géneros como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* o *Yersinia*.

Otras bacterias entéricas, como *Enterobacter* y *Serratia*, llevan a cabo la fermentación butanodiólica, que se caracteriza por la formación de un compuesto adicional, el 2,3-butanodiol. Como parte del piruvato se desvía en este caso hacia la formación de este nuevo compuesto el balance de ácidos formados será menor en una fermentación butanodiólica con respecto a una ácido-mixta, siendo éste un carácter que permite diferenciar géneros.

Otro carácter de importancia taxonómica es la producción de gas como consecuencia de la fermentación de la glucosa y se debe a la posesión de una enzima (Hidrogenoliasa fórmica) que escinde el formiato en CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. La posesión de esta enzima es la única posibilidad de que bacterias que realizan una fermentación ácido mixta produzcan gas. Como ejemplo de géneros que llevan a cabo una fermentación ácido mixta con formación de gas

---

están: *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* y sin formación de gas: *Shigella*, *Yersinia* o la especie *S. typhi*.

En la fermentación butanodiólica se produce siempre CO<sub>2</sub> a la vez que butanodiol, pero este gas es muy soluble en agua con lo que se mantiene disuelto en el medio. La formación de gas apreciable se produce cuando poseen la enzima que degrada el formiato a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Entre las enterobacterias que llevan a cabo una fermentación butanodiólica con formación de gas se encuentra *Enterobacter* y sin formación apreciable de gas *Serratia* (Stanier y col., 1984).

Otra característica de importancia en el grupo de las enterobacterias es la capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas, que es dependiente de la posesión de la β-galactosidasa y de una galactósido permeasa, aunque a veces la producción de gas ocurre lentamente. Presentan capacidad para fermentar la lactosa los géneros *Escherichia* y *Enterobacter*, mientras que no la fermentan los géneros *Shigella*, *Salmonella* o *Proteus*.

Las enterobacterias con capacidad para utilizar la lactosa se engloban bajo el término "coliforme".

Varios autores han estudiado la presencia y evolución de diferentes especies y grupos de la familia *Enterobacteriaceae* en quesos de vaca como el Brie, Camembert, Gouda y Cheddar. Entre los quesos de oveja, el Manchego ha sido también estudiado en este aspecto. Sin embargo la información existente sobre quesos de cabra es escasa. Se han efectuado estudios en queso Majorero (Fontecha y col., 1990), Ibores (Mas-Mayoral y col., 1991) y Valdeteja (Gutiérrez y col., 1988), pero estos trabajos se refieren únicamente a la evolución de los recuentos de *Enterobacteriaceae* o de coliformes a lo largo de la maduración sin identificar las especies presentes.

A lo largo de este capítulo se estudia la población de enterobacteriáceas en el queso de Armada, variedad Sobado, así como su evolución en relación con determinados parámetros bioquímicos (pH, Aw, contenido en ClNa y humedad).

## **2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO**

Además del material general que se describe en el capítulo I se utilizaron microscopios ópticos OLYMPUS CHB CO11 y de contraste de fases NIKON 8TR-Ke-Ph.

---

## 2.2.- MÉTODOS

### 2.2.1.- AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

En cada punto de muestreo y de cada uno de los 4 lotes de queso de Armada se tomaron, a partir de las placas de VRBGA donde se habían efectuado los recuentos, 10 colonias al azar con ayuda de un disco de Harrison. Un total de 140 cepas que se purificaron haciendo 4 pases alternos en caldo y agar nutritivo.

### 2.2.2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas Gram (-), catalasa (+), oxidasa (-), con morfología cocobacilar o de bacilos cortos se consideraron enterobacteriáceas y se identificaron según los criterios de Lapage y col. (1979) y Brenner (1984).

Se estudiaron los siguientes caracteres:

- **Tipo de metabolismo** (fermentación ácido-mixta o fermentación butanodiólica): se detectó en función de la cantidad de ácidos formados, empleando el test del Rojo de Metilo.

El medio empleado fue el Caldo-Glucosa-Fosfato (Harrigan y McCance, 1979). Se sembró y se incubó a 37°C durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo se añadieron unas gotas del reactivo de rojo de metilo.

La reacción es positiva si el medio adquiere color rojo. Si el color es amarillo la reacción es negativa. Esta prueba aporta una medida del pH final, el indicador presenta color rojo a valores de pH < 4,5 y color amarillo a pH 4,5 ó superior. Un resultado positivo indicará una producción intensa de ácidos, característico de la fermentación ácido-mixta.

Para estudiar el tipo de fermentación se podría también realizar la prueba de Voges-Proskauer, que permite detectar la presencia de acetoína, un compuesto intermediario en la formación del 2,3-butanodiol que pone de manifiesto la fermentación butanodiólica.

- **Formación de gas a partir de la glucosa:** se empleó el medio O/F (Difco), suplementado con dextrosa.

Cada cepa se sembró por duplicado (un tubo para la oxidación, como prueba confirmatoria de la identificación y otro para la fermentación, en este caso se añadieron 2 ml de agar bacteriológico para formar un tapón que crease anaerobiosis y permitiera observar la producción de gas).

---

- **Fermentación de la lactosa:** se empleó el mismo medio basal O/F, suplementado en este caso con lactosa al 10% de modo que la concentración final de azúcar en cada tubo fuera del 1%.

- **Utilización del gluconato:** como medio se empleó el caldo gluconato (Shaw y Clarke, 1955), descrito por Harrigan y McCance (1979).

Las cepas se sembraron en los tubos de caldo-gluconato y se incubaron durante 48 h a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se añadió 1,0 ml del reactivo de Benedict. Los tubos se introdujeron en agua hirviendo durante 10 min. Cuando la prueba fue positiva se formó un precipitado marrón-amarillento.

- **Utilización del malonato:** el medio empleado fue el caldo malonato (Report, 1958), descrito por Harrigan y McCance (1979).

Las cepas se sembraron en el medio y se incubaron a 37°C durante 48 horas. La utilización del malonato viene indicada por una reacción alcalina que se aprecia por un viraje del indicador de verde a azul.

- **Movilidad en un medio semisólido:** se empleó el medio M (API 20 E).

Se realizó una siembra por picadura y se incubó a 37°C durante 24 a 48 horas. La difusión del crecimiento en el medio indica la capacidad de movimiento de las cepas.

Todas las cepas aisladas fueron finalmente inoculadas en galerías API 20 E, que incluyen los siguientes test bioquímicos: producción de indol y de H<sub>2</sub>S, reducción de nitratos a nitritos, reducción de los nitritos a nitrógeno gaseoso, producción de acetoína, licuefacción de la gelatina, posesión de las enzimas ureasa, lisina descarboxilasa, arginina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, β-galactosidasa y triptófano desaminasa, utilización del citrato, fermentación de D-glucosa, D-manitol, inositol, D-sorbitol, L-ramnosa, sucrosa, melibiosa, amigdalina, arabinosa y lactosa.

### 3.- RESULTADOS

De 140 cepas aisladas, 139 se consideraron pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Las especies identificadas fueron: *Hafnia alvei* (58 cepas), *Serratia liquefaciens* (34), *Morganella morganii* (21), *Escherichia coli* (11), *Klebsiella oxytoca* (8), *Yersinia enterocolitica* (2), *Providencia alcalifaciens* (2), *Providencia rettgeri* (1), *Enterobacter sakazakii* (1) y *Citrobacter freundii* (1).

Algunas de las características de estos aislamientos no coinciden estrictamente con los patrones descritos por Lapage y col. (1979) y Brenner (1984). Varios autores han descrito

también dificultades en la identificación de enterobacteriáceas procedentes de queso Cheddar (Dommet, 1975), queso Manchego (Gaya y col., 1983) y leche cruda de oveja (Gaya y col., 1987).

La tabla I muestra la distribución de las especies identificadas en los distintos puntos de muestreo.

Las especies identificadas en leche fueron *Serratia liquefaciens* (57,5% de los aislamientos efectuados en este punto de muestreo), *Morganella morganii* (27,5%), *Hafnia alvei* (5%), *Yersinia enterocolitica* (5%) y *Klebsiella oxytoca* (5%). *Morganella morganii* no se aisló en cuajada pero fue aislada de nuevo en queso de una semana de maduración. *Yersinia enterocolitica* no se volvió a aislar ni en cuajada ni en queso.

*Serratia liquefaciens* y *Klebsiella oxytoca* (27,5% y 15% respectivamente de los aislamientos efectuados en cuajada) no volvieron a aislarse en queso de una ni de 2 semanas de maduración. *Hafnia alvei* incrementó su proporción en cuajada (47,5% de los aislamientos en este punto de muestreo) y todavía más en queso de 1 semana (75%), descendiendo en queso de 2 semanas (36,8%). *Escherichia coli* se aisló únicamente a partir de queso de 2 semanas, suponiendo el 57,8% de los aislamientos efectuados en este punto de muestreo. Finalmente, otras especies se aislaron en pequeña proporción en cuajada, *Providencia alcalifaciens* (5%), *Enterobacter sakazakii* (2,5%), *Citrobacter freundii* (2,5%) y en queso de 2 semanas de maduración (*Providencia rettgeri* (5,2%)).

Las características bioquímicas de las cepas identificadas aparecen recogidas en la tabla II.

Tabla I: Distribución de especies de *Enterobacteriaceae* por puntos de muestreo.

Especie	Leche		Cuajada		Queso (semanas)			
	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	1		2	
	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)
<i>Hafnia alvei</i>	2	5	19	47,5	30	75	7	36,8
<i>Serratia liquefaciens</i>	23	57,5	11	27,5	-		-	
<i>Morganella morganii</i>	11	27,5	-		10	25	-	
<i>Escherichia coli</i>	-		-		-		11	57,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	5	6	15	-		-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	5	-		-		-	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-		2	5	-		-	
<i>Providencia rettgeri</i>	-		-		-		1	5,2
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-		1	2,5	-		-	
<i>Citrobacter freundii</i>	-		1	2,5	-		-	

Tabla II.- Características bioquímicas de las cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Características	<i>H. alvei</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>M. organii</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>C. freundii</i>
N° de aislamientos	58	34	21	11	8	2	2	1	1	1
Prod. Indol	0	0	1	11	8	2	2	1	0	0
Rojo Metilo	37	15	21	11	1	2	2	1	1	1
Voges-Proskauer	37	28	0	0	8	0	0	0	1	0
Utilización Citrato	6	11	0	0	8	0	0	0	0	0
Prod. H <sub>2</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ureasa	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0
Lys descarboxilasa	58	21	0	11	8	0	0	0	0	0
Arg. Dihidrolasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ornitina descarboxilasa	58	34	8	11	0	0	0	0	1	0
Gelatinasa	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -Galactosidasa	9	27	0	11	8	2	0	0	1	1
Trp. desaminasa	0	0	21	0	0	0	2	1	0	0
Utilización malonato	47	0	0	0	8	0	0	0	0	1
Utilización gluconato	56	34	0	0	8	0	0	0	1	0
Acido de glucosa	58	34	21	11	8	2	0	1	1	1
Gas de glucosa	56	32	18	11	8	0	0	0	1	1
D-Manitol	13	34	0	11	8	2	0	0	1	1
Inositol	0	12	0	0	8	0	0	0	0	0
D-Sorbitol	0	34	0	11	8	2	0	0	0	1
L-Ramnosa	36	0	0	11	8	0	0	1	1	1
Sacarosa	0	34	0	11	8	2	0	0	1	0
Melibiosa	0	33	0	11	8	0	0	0	1	1
Amigdalina	0	33	0	0	8	2	0	0	1	1
Arabinosa	58	34	0	11	8	2	0	0	1	1
Lactosa	0	3	0	11	7	2	0	0	0	1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	58	34	20	11	7	2	2	1	1	1
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub>	0	1	8	0	5	2	0	0	0	0
Motilidad	15	34	21	2	0	0	0	1	1	1



#### 4.- DISCUSIÓN

No hemos podido encontrar datos en la bibliografía sobre identificación de enterobacterias procedentes de leche y queso de cabra.

Las especies que hemos aislado en leche son bastante diferentes a las aisladas por otros autores a partir de leche cruda de oveja (Mishra y col., 1978; Gaya y col., 1987). *S. liquefaciens* fue aislada también por Núñez y col. (1984) y por Gaya y col. (1987) en leche de oveja aunque no en tan elevada proporción. *M. morgani* no ha sido descrita hasta el momento en leche y productos lácteos pero al estar presente en heces de mamíferos (Brenner 1984) podría acceder fácilmente a la leche como consecuencia de prácticas poco higiénicas. *H. alvei* es un microorganismo típico de la leche y productos lácteos y comúnmente aislado en queso (Gaya y col., 1983; Gaya y col., 1987; Jacquet y Coiffier, 1984; Rutzinski y col., 1979), lo que puede guardar relación con su elevada resistencia a condiciones ácidas. *Klebsiella oxytoca* fue también aislada por Gaya y col. (1987) en leche de oveja en proporciones similares a las nuestras.

Es importante la presencia de *Y. enterocolitica* ya que es capaz de producir toxinas resistentes al tratamiento térmico en leche almacenada a temperatura ambiente (Francis y col., 1980; Olsvik y Kapperud, 1982). Este microorganismo se aísla con frecuencia a partir de leche cruda (Larkin y col., 1991; Schieman y Toma, 1978; Vidou y Delmas, 1981) y presenta una gran capacidad de supervivencia durante el almacenamiento de la leche a temperaturas de refrigeración. Schieman (1978) describió también su presencia en cuajada pero no existen pruebas experimentales de que haya sobrevivido en queso.

En quesos elaborados con leche cruda que no se ponen a la venta antes de 60 días de maduración *Y. enterocolitica* desaparece a lo largo del proceso madurativo por lo que estos quesos artesanales no constituyen un medio de transmisión de este patógeno (Schieman y Toma, 1978).

Brocklehurst y Lund (1990) establecieron que el pH combinado con la temperatura puede controlar el crecimiento de *Y. enterocolitica*, a pesar de que muestra gran resistencia a condiciones ácidas y a temperaturas bajas pudiendo multiplicarse en las siguientes condiciones de temperatura y pH: 10°C y 4,26; 7°C y 4,36; 4°C y 4,50 al cabo de 21 días (temperaturas más bajas incrementan el pH mínimo de crecimiento).

La leche aunque es un buen sustrato para el crecimiento de *Y. enterocolitica* no lo es para la producción de enterotoxinas y en caso de ser producidas podrían ser inactivadas por enzimas y otros componentes de la leche (Francis y col., 1980). Además las temperaturas de almacenamiento de la leche necesarias para garantizar su higiene impiden tal producción.

Las cepas de *Y. enterocolitica* aisladas en nuestro estudio fueron ramnosa (-) y citrato(-), patrones que se corresponden con las características típicas de esta especie (Stern y Pierson, 1979); pero al ser también lactosa (+) serían cepas atípicas (Schieman y Toma, 1978). Algunas cepas pueden utilizar la ramnosa y el citrato (ramnosa (+), citrato (+)) y se catalogan como cepas "ambientales" (Schieman y Toma, 1978). Según los criterios de Stern y Pierson (1979), nuestras cepas serían cepas "atípicas ambientales".

La presencia y supervivencia de *Hafnia alvei* durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado, concuerda con las observaciones efectuadas previamente por otros autores. Jacquet y Coiffier (1984) observaron que este microorganismo era la especie más resistente y que más proliferaba durante la maduración del queso Brie, Gaya y col. (1983) aislaron *H. alvei* en proporciones muy elevadas en queso Manchego de 60 días de maduración, Kleeberger y col. (1980) consideran que *H. alvei* es el típico microorganismo aislado a partir de leche y de productos lácteos. Por otra parte, Rutzinski y col. (1979), trabajando con queso Camembert elaborado con leche pasteurizada inoculada intencionadamente con *H. alvei* y con un cultivo iniciador, observaron que este microorganismo era capaz de sobrevivir en el queso durante la maduración, alcanzando niveles muy elevados ( $10^7$ - $10^8$  ufc/g) al cabo de 9 semanas.

*Escherichia coli* se aisló al cabo de 2 semanas de maduración. El hecho de no aislar antes este microorganismo se podría deber a que se encuentra en proporción minoritaria respecto al resto de las especies que se aíslan en leche, cuajada y queso de 1 semana. La presencia de *E. coli* al cabo de 2 semanas de maduración está relacionada con la mayor resistencia que presenta este microorganismo a condiciones ácidas y  $A_w$  bajas, como también indican Gaya y col. (1983) que aíslan este microorganismo en alta proporción en Manchego después de 60 días de maduración, más que con alguna posible contaminación de los quesos durante su manipulación. Bester (1976) observó también una elevada capacidad de supervivencia de *E. coli* en queso Gouda, obteniendo elevados recuentos (por encima de  $10^5$  ufc/g) tras 12 semanas de maduración. La elevada resistencia de *E. coli* a condiciones desfavorables ha sido también puesta de manifiesto por varios autores trabajando con quesos contaminados de modo artificial (Frank y col., 1978; Kornacki y Marth, 1982; Rash y Kosikowski, 1982).

La probabilidad de que las cepas de *E. coli* aisladas en nuestro estudio sean toxigénicas y en tal caso que las toxinas producidas persistan en el queso después de que estos microorganismos hayan desaparecido, es mínima, ya que la temperatura óptima para la producción de enterotoxinas por este microorganismo es de  $35^\circ\text{C}$  y no es frecuente que se den esas condiciones durante la maduración y almacenamiento del queso (Lovett y col., 1979). Glatz y Brudvig (1980) estudiaron la producción de enterotoxinas por cepas de *E. coli* enterotoxigénicas estableciendo que es poco probable que produzcan enterotoxinas en aquellos productos lácteos en los que el pH desciende rápidamente por debajo de 6,5 por lo

---

que el pH también parece influir en la toxigenesis. A pesar de lo expuesto siempre es conveniente mantener un bajo nivel de *E. coli*, que actúa como indicador de contaminación fecal, a lo largo de la manufactura del queso, lo que puede conseguirse extremando las medidas higiénicas durante todo el proceso de fabricación.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**BESTER, B.H.** (1976). Enkele aspekte van gasvorming deur kolivormige bakteriëe in kaas. *S. A. J. Dairy Technol.*, 8:51-55.

**BRENNER, D.J.** (1984). Family Enterobacteriaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Krieg, N.R. y Holt, J.G. (ed.). Williams & Wilkins. Baltimore. p. 408-516.

**BROCKLEHURST, T.F. y LUND, B.M.** (1990). The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of *Y. enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.*, 69:390-397.

**FONTECHA, J., PELÁEZ, C., JUÁREZ, M., REQUENA, T. y GÓMEZ, C.** (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.*, 73:1150-1157.

**FRANCIS, D.W., SPAULDING, P.L. y LOVETT, J.** (1980). Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:174-176.

**FRANK, J.F., MARTH, E.H. y OLSON, N.F.** (1978). Behaviour of enteropathogenic *E. coli* during manufacture and ripening of Brick cheese. *J. Food Prot.*, 41:111-115.

**GAYA, P., MEDINA, M. y NUÑEZ, M.** (1983). Accelerated decrease of Enterobacteriaceae counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. *J. Food Prot.*, 46:305-308.

**GAYA, P., MEDINA, M. y NUÑEZ, M.** (1987). Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewe's milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 62:321-326.

**GIBBS, P.A.** (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. *J. Appl. Bacteriol.*, Symposium Supplement, 51S-58S.

**GLATZ, B.A. y BRUDVIG, S.A.** (1980). A research note: Enterotoxin production in milk by enterotoxigenic *E. coli*. *J. Food Prot.*, 43:298-299.

---

**GUTIÉRREZ, L.M., CARBALLO, J., VIDAL, I., GONZALEZ PRIETO, J., MARTIN SARMIENTO, R. y BERNARDO, A.** (1988). Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la elaboración y maduración del queso de Valdeteja. *An. Fac. Vet. León*, 34:119-126.

**HARGROVE, R.E., MCDONOUGH, F.E y MATTINGLY, W.A.** (1969). Factors affecting survival of *Salmonella* in Cheddar and Colby cheese. *J. Milk Food Technol.*, 32:480-484.

**HARRIGAN, W.F. y Mc CANCE, M.E.** (1979). *Métodos de laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos lácteos*. Academia. León.

**JACQUET, J. y COIFFIER, O.** (1984). Coliformes et fromages à pâte molle (1). *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 2:165-169.

**JUVEN, B.J., GORDIN, S., ROSENTHAL, I. y LONGER, A.** (1981). Changes in refrigerated milk caused by Enterobacteriaceae. *J. Dairy Sci.*, 64:1781-1784.

**KLEEBERGER, A., BRAATZ, R. y BUSSE, M.C.** (1980). Zur taxonomie und ökologie der enterobakterien in milch. *Milchwissenschaft*, 35:457-460.

**KORNACKI, J.L. y MARTH, E.H.** (1982). Fate of nonpathogenic and enteropathogenic *E. coli* during the manufacture of Colby-like cheese. *J. Food Prot.*, 45:310-316.

**LAPAGE, S.P., ROWE, B., HOLMES, B. and GROSS, R.J.** (1979). Biochemical identification of Enterobacteriaceae. En *Identification Methods for Microbiologists*, Skinner, F.A. and Lovelock, D.W. (eds). Academic Press. Londres. p. 123-141.

**LARKIN, L.L., VASAVADA, P.C. y MARTH, E.H.** (1991). Incidence of *Y. enterocolitica* in raw milk as related to its quality. *Milchwissenschaft*, 46:500-502.

**LOVETT, J., BISHA, J.M. y SPAULDING, P.L.** (1979). *E. coli* enterotoxin production in beef broth at 15 to 50°C. *J. Food Prot.*, 42:838 (Abstr.).

**LÜCK, H. y DUNKELD, M.** (1981). *Enterobacteriaceae* in cheese. *S. Agr. J. Dairy Technol.*, 13:9-14.

**MAS-MAYORAL, M., TIMÓN ESTEBAN, J. y GONZÁLEZ CRESPO, J.** (1991). Queso de los Ibores: caracterización productiva, físico-química y microbiológica. *Archivos de Zootecnia*, 40:103-113.

**MISHRA, S.K., SAHAI, B.N. y SINHA, M.N.** (1978). Incidence of coliforms in raw milk samples. *Indian Journal of Dairy Science*, 31:373-380.

---

**NÚÑEZ, J.A., CHAVARRI, F.J. y NUÑEZ, M.** (1984). Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk, with particular reference to Gram negative rods. *J. Appl. Bacteriol.*, 57:23-29.

**OLSVIK, O. y KAPPERUD, G.** (1982). Enterotoxin production in milk at 22°C and 4°C by *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43:997-1000.

**RASH, K.E. y KOSIKOWSKI, F.V.** (1982). Behavior of enteropathogenic *E. coli* in Camembert cheese made from ultrafiltered milk. *J. Food Sci.*, 47:728-732 (736).

**REPORT** (1958). Report of the Enterobacteriaceae Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Association of Microbiological Societies. *Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.*, 8:25.

**RUTZINSKI, J.L., MARTH, E.H., OLSON, N.F.** (1979). Behavior of *Enterobacter aerogenes* and *Hafnia* species during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *J. Food Prot.*, 42:790-793.

**SCHIEMANN, D.A.** (1978). Association of *Yersinia enterocolitica* with the manufacture of cheese and occurrence in pasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:274-277.

**SCHIEMANN, D.A. y TOMA, S.** (1978). Isolation of *Y. enterocolitica* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:54-58.

**SHAW, C. y CLARKE, P.H.** (1955). Biochemical classification of *Proteus* and *Providencia* cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 13:155.

**STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A. e INGRAHAM, J.L.** (1984). *Microbiología*, 4ª ed. Reverté. Barcelona. p. 592-593.

**STERN, N.J. y PIERSON, M.D.** (1979). *Yersinia enterocolitica*: A review of the psychrotrophic water and foodborne pathogen. *J. Food Sci.*, 44:1736-1742.

**VIDOU, D.J.M. y DELMAS, C.L.** (1981). Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in Eastern France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:355-359.

---



# **CAPÍTULO V. ESTUDIO DE *MICROCOCCACEAE* AISLADAS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

La importancia de aislar e identificar microorganismos de la familia *Micrococcaceae* en leche y queso se debe a dos razones. La primera es higiénico-sanitaria, ya que algunos estafilococos producen enterotoxinas que causan gastroenteritis. La intoxicación estafilocócica es una de las más comunes a nivel de alimentos (Todd, 1978) y el queso ha sido protagonista de un buen número de brotes de intoxicación estafilocócica (De Buyser y col., 1987; Wineke y Gilvert, 1987; Zottola y Smith, 1991).

Muchos autores relacionan el origen de los estafilococos con infecciones subclínicas de ubres en cabras (Valle y col., 1990). La creciente aparición de estafilococos patógenos en el queso parece estar relacionado con el incremento de mastitis estafilocócicas que se producen desde el uso de antibióticos (Thatcher, 1958; Munch-Peterson, 1960).

Las enterotoxinas de estafilococos se han identificado y nombrado de la A a la E. La A es una de las más relacionadas con intoxicaciones alimentarias (Minor y Marth, 1976) y su producción se ve poco afectada por factores como bajos niveles de O<sub>2</sub>, pH, Aw o T<sup>a</sup> (Markus y Silverman, 1970).

Las enterotoxinas, que son sintetizadas en las etapas tempranas del ciclo de crecimiento (Markus y Silverman, 1970), se pueden detectar no sólo en leche o durante la elaboración sino que a veces permanecen varios meses en el queso aunque el pH sea bajo (Kéjakovic-Miljkovic, 1960).

Aunque no se tiene referencia de casos de intoxicación estafilocócica a partir del consumo de productos elaborados con leche de cabra, la presencia de estafilococos

---

enterotoxigénicos en leche de esta especie indica la necesidad de evitar condiciones en las que estos microorganismos puedan desarrollarse y producir enterotoxinas entre el periodo de producción y el de consumo (Harvey y Gilmour, 1988).

La otra razón que justifica el estudio de estos microorganismos es tecnológica. Poseen actividad proteolítica y lipolítica, contribuyendo al desarrollo de la textura y las propiedades organolépticas del queso.

Sus lipasas y proteasas actúan en rangos de pH alcalinos, disminuyendo su actividad a medida que el pH disminuye (Robertson y Perry, 1961; Desmazeaud y Hermier, 1968).

Las lipasas extracelulares de los micrococos son activas frente a triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta y larga. Al liberar ácidos grasos de cadena larga de los triglicéridos, facilitan el posterior ataque de éstos por las bacterias acidolácticas (que tienen capacidad para actuar sobre monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos de cadena corta (Ordóñez y Ortiz de Apodaca, 1977). Además aunque los micrococos descienden rápidamente durante la maduración sus lipasas extracelulares permanecen activas (Ortiz de Apodaca y col., 1993), por lo tanto la contribución de los micrococos al desarrollo del sabor del queso madurado es importante.

De una manera similar a lo que ocurre con la familia *Enterobacteriaceae*, son abundantes en la bibliografía los estudios sobre la presencia y evolución de diferentes especies y grupos de la familia Micrococcaceae en quesos de vaca y oveja. Sin embargo son prácticamente inexistentes los estudios efectuados en queso de cabra. Se han investigado los niveles de micrococos y estafilococos durante la elaboración y maduración de los quesos de Valdeteja (Gutiérrez y col., 1988), Majorero (Fontecha y col., 1990), Ibores (Mas-Mayoral y col., 1991), Gredos (Medina y col., 1992) y blanco salazonado en salmuera (Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 1992), pero la información de estos artículos se refiere únicamente a la evolución de los recuentos, sin hacer ninguna referencia a la identidad de los microorganismos presentes y a sus características. Sólo hemos podido encontrar en la literatura datos sobre las especies de estafilococos aisladas de leche de cabra (Harvey y Gilmour, 1988).

En este capítulo se pretenden identificar las especies de micrococos y estafilococos aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, estudiando sus características así como la capacidad de formar enterotoxinas por parte de las cepas de estafilococos.



## **2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO**

Además del material general que se describe en el capítulo I, para el estudio de la población de *Micrococcaceae* se utilizaron:

Membranas de diálisis MEDICELL INTERNATIONAL LTD de 7,5 cm de anchura.

Agitadores orbitales HUCOA-ERLÖSS G24 y HEIDOLPH UNIMAX 2010, empleados para mantener los cultivos de estafilococos, destinados a la producción de toxinas, en agitación permanente.

Una supercentrífuga BECKMAN J2-MC con rotor JA 20 para la centrifugación de los cultivos celulares en la determinación de enterotoxinas.

### **2.2.- MÉTODOS**

#### **2.2.1.- AISLAMIENTO DE LAS CEPAS**

De cada lote y en cada punto de muestreo se aislaron 10 colonias de las placas de MSA en las que previamente se había efectuado el recuento.

El medio MSA posee como agente selectivo un elevado contenido en sal (75 g/l) por lo que sólo crecerán en este medio los microorganismos halotolerantes. También lleva manitol y la utilización de éste se manifiesta por la formación de ácido y el consiguiente viraje del indicador. La utilización del manitol con formación de ácido está relacionada con la patogenicidad del microorganismo y sirve como indicativo de *S. aureus*.

Las colonias manitol (+), con halo amarillento y crecimiento intenso corresponden por lo general a *S. aureus*, otras sin cambio de color y de crecimiento débil casi siempre corresponden a *S. epidermidis* entre otros posibles.

Se aislaron un total de 280 cepas que se purificaron a través de 4 pases alternativos en caldo y agar BHI.

#### **2.2.2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS**

La identificación de las cepas se llevó a cabo de acuerdo con los criterios de Schleiffer (1986). Se realizaron las siguientes pruebas generales de identificación:

---

**- Gram.**

Se realizó a partir de un cultivo de 12 a 16 horas en caldo BHI.

**- Catalasa.**

Se añadieron unas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) a un cultivo de 24 horas en agar BHI.

**- Oxidación-Fermentación de la glucosa.**

Se empleó el medio de Hugh y Leifson modificado (Harrigan y McCance, 1979). Se apuntó la presencia o no de crecimiento, cambio de color del medio, y producción de gas al cabo de 48 y 72 horas.

Se consideraron micrococcos los cocos Gram (+), catalasa (+), dispuestos en parejas o tetradas, estrictamente aerobios.

Se consideraron estafilococos los cocos Gram (+), catalasa (+), dispuestos en parejas, tetradas, anaerobios facultativos.

**- Crecimiento en BHI con distintos porcentajes de sal (5%, 10% y 15% de NaCl).**

Se observó la presencia o no de crecimiento al cabo de 2 y 3 días de incubar a 37°C.

Todas las especies de micrococcos crecen en presencia del 5% de sal (Schleiffer, 1986), como las cepas se han aislado en MSA, éstas también crecerán en presencia del 7,5% de ClNa.

**- Crecimiento en Baird-Parker (Baird-Parker, 1962).**

Se observó el tipo de crecimiento después de incubar a 37°C durante 48 horas.

Se trata de un medio diseñado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos (sobre todo de *S. aureus*) a partir de alimentos y otros orígenes.

Este medio lleva yema de huevo y telurito potásico como agente selectivo. En él, la mayoría de las cepas de *S. aureus* utilizan la lipoproteína de la yema de huevo produciendo una clarificación alrededor de las colonias. Los estafilococos crecen bien, originando generalmente colonias negras brillantes, a veces con halos de aclaramiento; también es común encontrar un precipitado blanco en las áreas de aclaramiento que se debe a la formación de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados. Los micrococcos presentan crecimiento ocasional formando colonias pardas a negras y sin halos de aclaramiento.

---

Se suele emplear la reacción de la yema de huevo para el reconocimiento de los estafilococos coagulasa (+), aunque algunos autores como Jay (1966) cuestionan la validez de este criterio.

- **Pigmentación de las colonias en agar BHI** que también constituye un carácter taxonómico para los micrococos.

- Para analizar el resto de las características bioquímicas se utilizaron **galerías API 32 STAPH** que incluyen los siguientes tests: ureasa, arginina-dihidrolasa, ornitina-decarboxilasa, hidrólisis de la esculina, utilización de glucosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa, trealosa, manitol, rafinosa, ribosa, celobiosa, sacarosa, N-acetil-glucosamina, turanosa y arabinosa, reducción de los nitratos, producción de acetoína,  $\beta$ -galactosidasa, arginina arilamidasa, fosfatasa alcalina, pirrolidonil arilamidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y resistencia a la novobiocina. Las galerías se utilizaron de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante.

#### - **Coagulasa.**

Para las cepas de la especie *S. aureus* se hizo la prueba confirmatoria de la coagulasa. Todas fueron coagulasa (+).

El test de la coagulasa se ha descrito en la bibliografía como el mejor medio para detectar estafilococos potencialmente toxigénicos en el laboratorio; aunque no todos los estafilococos coagulasa (+) son productores de enterotoxinas.

La coagulasa como criterio para establecer la patogenicidad y toxicidad de los estafilococos ha sido cuestionada por Thatcher y Simon (1956), basándose en que algunos estafilococos coagulasa (-) pueden ser enterotóxicos. Smith y Farkas-Himsley (1969) describen estafilococos coagulasa (-) como agentes causantes de enfermedades.

Para las cepas que no pudieron ser identificadas utilizando los tests hasta aquí expuestos se realizaron otras pruebas clásicas, siguiendo los criterios de Schleiffer (1986):

#### - **Oxidasa.**

Por lo general los micrococos son oxidasa (+) y los estafilococos oxidasa (-).

Esta prueba se realizó después de incubar a 37°C durante 3 días en agar BHI.

#### - **Estudio del metabolismo de carbohidratos y alcoholes.**

Se utilizó el medio de Hugh y Leifson (1953), añadiendo las soluciones de carbohidratos o alcohol, previamente esterilizados por filtración, de modo que la concentración final fuese del 0,5% (Baird-Parker, 1963).

En el estudio del metabolismo de la glucosa la respuesta al test de oxidación/fermentación era débil para algunas cepas por lo que se ensayó además con el mismo medio modificado (Harrigan y Mc Cance, 1979), en este medio se comprobó también la asimilación en aerobiosis y anaerobiosis del manitol.

La producción en estos medios de ácido y también de gas, si se trata de fermentación, se leyó a los 3 y 7 días de incubación a 37°C.

#### **- Capacidad de hidrólisis de la esculina.**

Se empleó el medio Esculina Azida Agar Base. Todas las cepas presentaban buen crecimiento en este medio. A los 3 y 7 días de incubación a 37°C se evaluó la capacidad de hidrolizar la esculina, la hidrólisis produce glucosa y esculetina que con los iones  $Fe^{3+}$  forma un complejo de color verde-oliva a negro.

#### **- Crecimiento a diferentes temperaturas.**

Se estudió cultivando las cepas en caldo BHI, a 10°C, 15°C y 45°C y observando el crecimiento a los 3, 5 y 7 días de incubación.

#### **- Desaminación de la arginina.**

Se empleó caldo BHI suplementado con monoclorhidrato de L-arginina al 0,3%. Para demostrar la producción de amoniaco se utilizó el reactivo de Nessler. Se observó la reacción a los 7 días de incubación a 37°C.

#### **- Hidrólisis del almidón.**

Se utilizó el medio agar-almidón (agar nutritivo con almidón soluble al 0,2-1%).

En este medio se incubó de 8 a 14 días y para comprobar la hidrólisis se añadieron 5 - 10 ml de lugol en la superficie, si no hay hidrólisis del almidón el medio se tiñe de azul, en las líneas de hidrólisis se observan zonas claras (actividad  $\beta$ -amilasa); si el color es marrón-rojizo, indica una hidrólisis parcial a dextrinas (actividad  $\alpha$ -amilasa) (Harrigan y Mc Cance, 1979).

#### **- Hidrólisis del Tween-80.**

Se empleó el medio de Sierra (Sierra, 1957). El medio incluye una sal soluble de calcio para poder detectar los ácidos grasos que se liberan en forma de sales de calcio precipitadas.

---

Se incubó durante un periodo de hasta 7 días. Si la cepa tiene actividad lipolítica se forma un halo opaco alrededor de la colonia que se compone de sales de calcio de los ácidos grasos libres (Harrigan y Mc Cance, 1979)

#### **- Producción de acetoína.**

Después de incubar en caldo glucosa a 37°C durante un periodo de hasta 7 días, se añadió, a 1 ml del cultivo, 0,5 ml de cada uno de los dos reactivos que se emplean y se agitó. La reacción positiva se caracterizó por la formación de un precipitado rojo al cabo de 5 minutos. Este método detecta hasta 1 ppm de acetoína.

#### **- Fosfatasa.**

Las placas se incubaron a 30°C durante 3 a 5 días (Baird-Parker, 1963). La liberación de fenoltaleína se verificó poniendo una gota de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 22% en la tapa de cada placa o colocando las placas abiertas en la boca del frasco con el reactivo. Las colonias que producen fosfatasa dan color rosa.

#### **- Reducción de los nitratos.**

Esta prueba se realizó con los dos medios a los que se hace referencia en el apéndice.

Los medios se sembraron y se incubaron a 37°C durante 2 a 7 días. Para visualizar la reacción se emplearon los reactivos de Griess-Ilosvay.

La reacción positiva se caracteriza por la aparición de un color rojo que indica presencia de nitritos, si la reacción es negativa se añaden al tubo aproximadamente 0,05 g de zinc en polvo. El Zn reduce a nitrito cualquier residuo de nitrato, dando color rojo, si no se produce cambio de color la reacción es también positiva, es decir los nitratos se habían transformado en nitritos y éstos en  $\text{N}_2$  (Harrigan y Mc Cance, 1979).

#### **- Asimilación de nitrógeno inorgánico como única fuente de N.**

Se empleó un medio que llevaba sales minerales, extracto de levadura, factores de crecimiento y como fuente de carbono, bacto-dextrosa. El  $\text{KNO}_3$  se añadió a una concentración final del 0,1% (Holding, 1960).

Se sembró el medio y se incubó a 37°C durante 3 a 7 días. El crecimiento en este medio, que viene indicado por la aparición de turbidez apreciable, nos refleja la capacidad para utilizar el  $\text{N}_2$  cuando es la única fuente de nitrógeno disponible. Una turbidez escasa no siempre puede tomarse como un resultado positivo ya que puede deberse a la presencia en el medio de factores de crecimiento que proceden del medio original, resultando necesario hacer una segunda siembra.

---

### 2.2.3.- ENSAYO DE LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINAS POR LAS CEPAS DE ESTAFILOCOCOS

Una vez concluida la identificación nos pareció interesante estudiar la capacidad potencial que tenían las cepas de estafilococos para producir enterotoxinas.

Para la producción y concentración de toxinas se siguió el método del cultivo en sacos de diálisis (Donnelly y col., 1967).

Se lavaron trozos de membrana de diálisis de aproximadamente 40 cm de longitud en agua destilada, se hizo un nudo en un extremo y se sopló por el otro para obtener un saco; a continuación se introdujeron en frascos Erlenmeyer de 250 ml de modo que el extremo anudado descansara sobre el fondo del recipiente, se llenaron con 100 ml de caldo BHI preparado utilizando el doble de concentración y se anudó el otro extremo. Se ataron los dos extremos con una goma para que adquiriera forma de U y que los extremos atados quedaran en el cuello del matraz. Se esterilizaron los frascos Erlenmeyer con su contenido a 121°C durante 15 minutos y después se eliminó el líquido que salió de las membranas con una pipeta estéril. A continuación se transvasaron 18 ml de solución salina fisiológica tamponada con fosfato estéril al frasco Erlenmeyer y se sembraron con 2 ml del inóculo correspondiente (las células fueron previamente lavadas con solución salina) obteniendo un volumen final fuera de la membrana de 20 ml, se incubó a 37°C durante 24 a 48 horas en un agitador orbital a 200 rpm. Terminada la incubación se recogió el líquido situado fuera de la membrana de diálisis (que contiene células microbianas, constituyentes del medio y enterotoxinas) y se centrifugó a 23.500 x g durante 20 minutos.

La presencia de enterotoxinas en el sobrenadante se investigó empleando el SET-RPLA (Reversed passive latex agglutination) kit (Oxoid TD-900) que permite la detección de las enterotoxinas estafilocócicas A, B, C y D. La sensibilidad de este test en la detección de enterotoxinas es de aproximadamente 0,5 ng/ml.

### 3.- RESULTADOS

De 280 cepas aisladas en MSA, 66 pertenecieron a la familia *Micrococcaceae*, 185 a otras familias y 28 no crecieron en pases sucesivos durante la fase de purificación. Los estafilococos y micrococcos aislados en MSA representaron sólo el 23,57% de los aislamientos realizados en este medio.

De las 66 cepas, 44 se consideraron pertenecientes al género *Staphylococcus* y 22 al género *Micrococcus*.

---

Dentro del género *Staphylococcus* se identificaron las siguientes especies: *S. sciuri* (21), *S. saprophyticus* (6), *S. aureus* (3), *S. capitis* (2), *S. epidermidis* (2), *S. xylosus* (4), *S. warneri*(1). 5 cepas quedaron sin identificar a nivel de especie.

En el género *Micrococcus* las especies identificadas fueron *M. varians* (11), *M. roseus* (2) y 9 cepas no se pudieron identificar de un modo fiable a nivel de especie.

La tabla I recoge los valores medios de los recuentos en MSA y los porcentajes de *Micrococcaceae*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* durante la elaboración del queso de Armada.

La distribución de especies por puntos de muestreo se puede observar en la tabla II.

Las especies identificadas en leche fueron *Staphylococcus sciuri* (22,5% de los aislamientos en este punto de muestreo), *S. saprophyticus* (7,5%), *Micrococcus varians* (10%) y *M. roseus* (5%). *Staphylococcus sciuri* y *Micrococcus varians* incrementaron su proporción en cuajada (suponiendo respectivamente 30 y 17,5% de los aislamientos efectuados en este punto de muestreo) y no volvieron a ser aislados a lo largo de la maduración. Es destacable el aislamiento de *Staphylococcus aureus* en cuajada (7,5% de los aislamientos en este punto de muestreo); esta especie no se aisló de nuevo en queso. El resto de las especies se aislaron de cuajada y queso, o solamente de queso en diferentes etapas de la maduración, pero siempre en proporciones muy reducidas.

Las características bioquímicas de estas cepas se recogen en la tabla III.

Los resultados de los ensayos de producción de enterotoxinas A, B, C y D por parte de las cepas de estafilococos se recogen en la tabla IV.

De las 21 cepas de *S. sciuri*, sólo 2 de ellas produjeron enterotoxina C, el resto no produjo ninguna de las enterotoxinas ensayadas.

De las 3 cepas de *S. aureus* todas ellas produjeron enterotoxinas A y C.

En el resto de las especies, *S. xylosus* (4 cepas), *S. capitis* (2), *S. warneri* (1) y *S. epidermidis* (2), no se detectó producción de ninguna de las 4 enterotoxinas investigadas.

---

Tabla I. Valores medios de los recuentos (log ufc/g) en MSA y porcentajes de *Micrococcaceae*, *Micrococcus* y *Staphylococcus* durante la elaboración y maduración de las cuatro partidas de queso de Armada, variedad Sobado.

	Leche	Cuajada	Semanas de maduración				
			1	2	4	8	16
Recuentos en MSA	4.57 ± 0.15	5.24 ± 0.33	5.06 ± 0.45	4.48 ± 0.69	4.71 ± 1.10	3.93 ± 1.68	3.39 ± 0.98
<i>Micrococcaceae</i> (%)	55	70	10	0	17.5	0	12.5
<i>Micrococcus</i> (%)	30	50	7.5	0	15	0	7.5
<i>Staphylococcus</i> (%)	25	20	2.5	0	2.5	0	5



Tabla II.- Distribución de especies de *Micrococcaceae* por puntos de muestreo durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Especie	Leche		Cuajada		Queso (semanas)									
					1		2		4		8		16	
	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)	Nº cepas	(%)
<i>S. sciuri</i>	9	22,5	12	30	-		-		-		-		-	
<i>S. aureus</i>	-		3	7,5	-		-		-		-		-	
<i>S. xylosum</i>	-		1	2,5	-		-		1	2,5	-		2	5
<i>S. capitis</i>	-		1	2,5	-		-		1	2,5	-		-	
<i>S. warneri</i>	-		-		-		-		-		-		1	2,5
<i>S. epidermidis</i>	-		-		-		-		2	5	-		-	
<i>S. saprophyticus</i>	3	7,5	3	7,5	-		-		-		-		-	
<i>Staph. spp.</i>	-		-		3	7,5	-		2	5	-		-	
<i>M. varians</i>	4	10	7	17,5	-		-		-		-		-	
<i>M. roseus</i>	2	5	-		-		-		-		-		-	
<i>Microc. spp.</i>	4	10	1	2,5	1	2,5	-		1	2,5	-		2	5

Tabla III.- Características bioquímicas a 30°C de las 66 cepas de *Micrococcaceae* aisladas durante la fabricación y maduración del queso de Armada, Sobado. Los números incluidos en la tabla corresponden al número de aislamientos positivos en cada prueba. (ND = no determinado).

	<i>Staph. sciuri</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. xylosus</i>	<i>Staph. capitis</i>	<i>Staph. warneri</i>	<i>Staph. epidermidis</i>	<i>Staph. saprophyticus</i>	<i>Staph. spp.</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Micrococcus roseus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
No.de aislamientos	21	3	4	2	1	2	6	5	11	2	9
Oxidación Glucosa	21	3	4	2	1	2	6	5	11	0	3
Fermentación Glucosa	21	3	4	2	1	2	6	5	0	0	0
Crecimiento a 10 °C	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	9	ND	9
Crecimiento a 37 °C	21	3	4	2	1	2	6	5	11	2	9
Crecimiento a 45 °C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	ND	1
Crecimiento a 7,5 % NaCl	21	3	4	2	1	2	6	5	11	2	9
Crecimiento a 10 % NaCl	20	3	4	2	1	2	6	3	4	2	9
Crecimiento a 15 % NaCl	ND	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND	0	ND	9
Utilización Citrato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	1
Crecimiento agar N inorg.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	0
Hidrólisis almidón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	0
Hidrólisis Tween 80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	0
Hidrólisis esculina	21	0	1	0	0	0	0	4	0	0	2
Coagulasa	0	3	0	0	0	0	0	0	ND	ND	ND
Ureasa	0	3	4	0	1	2	6	0	0	2	8
Arginina dihidrolasa	0	3	0	1	0	2	0	3	0	0	0
Ornitina decarboxilasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatasa alcalina	21	3	1	0	0	2	0	0	2	0	1
Pirrolidonil arilamidasa	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0
β-galactosidasa	0	0	4	0	0	0	6	0	0	0	6
Arginina arilamidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxidasa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	ND	0
β-Glucuronidasa	20	0	4	0	0	2	0	0	0	0	6
Voges-Proskauer	0	3	0	2	1	2	6	5	11	0	1
Reducción Nitrato	21	3	4	2	1	2	0	0	11	2	9
Resistencia Novobiocina	21	0	3	0	0	0	6	0	0	0	2

Tabla III.- (Continuación) Características bioquímicas a 30°C de las 66 cepas de *Micrococcaceae* obtenidas durante la elaboración y maduración del queso de Armada-Sobado. Los números incluidos en la tabla corresponden al número de aislamientos positivos en cada prueba. (ND = no determinado).

	<i>Staph. sciuri</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. xylosus</i>	<i>Staph. capitis</i>	<i>Staph. warneri</i>	<i>Staph. epidermidis</i>	<i>Staph. saprophyticus</i>	<i>Staph. spp.</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Micrococcus roseus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
No. de aislamientos	21	3	4	2	1	2	6	5	11	2	9
Acido de:											
Galactosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	4
Glicerol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	ND	5
Lactosa	21	3	4	2	0	2	6	5	11	0	1
D-Manitol	21	3	4	1	0	0	6	4	0	0	ND
D-Manosa	21	3	4	1	0	1	0	4	0	0	1
N-acetil glucosamina	21	3	4	0	0	0	4	5	0	0	3
Asimilación de:											
L-Arabinosa	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
D-Celobiosa	20	0	2	0	0	0	0	4	0	0	1
D-Fructosa	21	3	4	2	1	2	6	4	11	0	5
Glucosa	21	3	4	2	1	2	6	5	11	0	3
Maltosa	21	3	2	1	1	2	6	4	11	0	3
Rafinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Ribosa	16	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1
Sacarosa	21	3	4	2	1	2	6	4	0	0	8
D-Trealosa	21	3	2	0	1	0	6	4	2	0	5
D-Turanosa	20	3	1	0	0	0	6	1	0	0	0

Tabla IV.- Tipos de enterotoxinas (ES) producidas por las especies de *Staphylococcus* aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Especies	Nº cepas	Nº cepas que producen ES			
		ESA	ESB	ESC	ESD
<i>Staphylococcus sciuri</i>	21	0	0	2	0
<i>S. aureus</i>	3	3	0	3	0
<i>S. xylosus</i>	4	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	2	0	0	0	0
<i>S. warneri</i>	1	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	2	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	6	0	0	0	0
<i>Staph.</i> no identif.	5	0	0	0	0
Total	44	3	0	5	0
%		6,81	0	11,36	0

#### 4.- DISCUSIÓN

En este estudio el MSA se comportó como un medio muy poco selectivo para el aislamiento de micrococáceas. A este fenómeno posiblemente contribuya el bajo porcentaje en que, de hecho, se encuentran estos microorganismos a lo largo de la maduración. El recuento de *Micrococcaceae* experimentó un descenso pronunciado al final de la primera semana de maduración, permaneciendo en bajos niveles durante el resto del proceso. Otros autores (Devoyod, 1969) describieron este mismo fenómeno durante la elaboración y maduración del queso Roquefort.

Los valores de pH alcanzados en el queso de Armada, variedad Sobado, a la semana de maduración (ver capítulo I) pueden contribuir al descenso y/o desaparición de algunas especies. Según Mattick y col. (1959) los estafilococos desaparecen cuando el pH de los quesos es de aproximadamente 5,0. Sharpe y col.(1962) relacionan los valores de pH relativamente altos (6,6) con la permanencia de estos microorganismos en el queso durante un periodo de tiempo largo.

Otro factor que puede contribuir a la desaparición de estos microorganismos es la baja  $A_w$  y la concentración de sal, ya que aunque se trata de gérmenes halotolerantes los bajos niveles de pH pueden aumentar su sensibilidad a la sal.

Además, la flora microbiana de este queso está compuesta fundamentalmente por bacterias acidolácticas (ver capítulo I) que podrían ejercer un control sobre la población de *Micrococcaceae* no sólo por la producción de ácido láctico, sino también mediante la elaboración de bacteriocinas específicas frente a ese grupo microbiano. Algunos autores (Gaya y col., 1988; Stecchini y col., 1991) han observado la influencia de la flora acidoláctica, procedente de la leche cruda y/o de cultivos iniciadores, sobre la población de micrococos y estafilococos.

A lo largo del proceso de elaboración y maduración hemos aislado estafilococos siempre en mayor número que micrococos. El predominio de los estafilococos se podría explicar en parte porque las muestras se tomaron siempre del interior del queso, donde los microorganismos anaerobios facultativos (estafilococos) encuentran condiciones más apropiadas para desarrollarse que los aerobios estrictos (micrococos). Si bien aunque se hubieran tomado muestras de superficie probablemente tampoco se hubieran obtenido porcentajes mucho mayores de micrococos, ya que el salazonado (origen importante de micrococos) en este queso no se realiza en superficie, sino añadiendo sal a la cuajada durante las operaciones de sobado, con lo cual la superficie del queso no recibe un aporte adicional de micrococos que podrían después desarrollarse a ese nivel.

*Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus saprophyticus* fueron las dos únicas especies de estafilococos aisladas en leche. Estas especies no concuerdan con las halladas por otros autores en leche de cabra (Harvey y Gilmour, 1988; Valle y col., 1990). En la cuajada *S. sciuri* aumentó su proporción, mientras que la proporción de *S. saprophyticus* se mantuvo. Ambas especies no volvieron a ser aisladas en queso.

*S. aureus* fue únicamente aislado en la cuajada de uno de los cuatro lotes y no volvió a ser aislado en queso a lo largo de la maduración. A la semana de maduración se obtienen en este queso valores medios de pH (4,53) y de actividad del agua (0,967) que son suficientes para evitar el crecimiento de *S. aureus*. Notermans y Heuvelman (1983) indican que no se da crecimiento de este microorganismo a 12°C (aproximadamente la temperatura de maduración del queso de Armada, variedad Sobado) cuando la  $A_w$  es de 0,96 y el pH es de 4,9 o inferior. A lo largo de la maduración el pH se eleva hasta alcanzar valores de  $5,04 \pm 0,15$  al final del proceso, pero la  $A_w$  desciende hasta valores finales de  $0,902 \pm 0,023$ . Notermans y Heuvelman (1983) señalan que una  $A_w$  de 0,90 o bien de 0,93 combinada con un pH inferior a 5,5 impiden el crecimiento de *S. aureus*. Así pues, los valores de  $A_w$  y pH en el queso de Armada a lo largo de la maduración explicarían el no aislamiento de *S. aureus* durante el proceso.

*S. xylosus* se aisló en cuajada y en queso de 4 y 16 semanas de maduración, *S. capitis* fue aislado en cuajada y en queso de 4 semanas, *S. epidermidis* se aisló únicamente en queso de 4 semanas, mientras que *S. warneri* se aisló únicamente en queso de 16 semanas.

Finalmente 5 cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, aisladas en queso de 1 y 4 semanas, no pudieron ser identificadas a nivel de especie.

No hemos podido encontrar en la bibliografía información sobre identificación de estafilococos en queso de cabra por lo que no nos es posible discutir ni comparar nuestros datos con los de otros autores. Algunas especies de estafilococos aisladas en el queso de Armada (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. xylosus*) fueron también aisladas en leche de cabra en diferentes países (De Buyser y col., 1987; Harvey y Gilmour, 1988; Valle y col., 1990). *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* y *S. xylosus* fueron también identificados en quesos de leche de oveja como el Manchego (García y col., 1988) y el de Burgos (García y col., 1988, 1990).

Por lo que respecta al origen de los estafilococos presentes en el queso de Armada y en la leche utilizada para su elaboración, la mayoría de las especies parecen tener un origen animal. *S. sciuri* ha sido la especie aislada con mayor frecuencia a partir de cabras (Devriese y col., 1985). A juzgar por los datos de varios autores (Devriese y col., 1985; Valle y col., 1990), *S. saprophyticus*, *S. warneri* y *S. xylosus* podrían provenir también de estos animales. En cuanto a *S. aureus*, este microorganismo es el patógeno que más frecuentemente se asocia con la mastitis caprina (Smith y Roguinsky, 1977). Finalmente, *S. epidermidis* es una de las especies más frecuentemente aisladas del hombre (Kloos, 1980) y su presencia en nuestro queso podría sugerir una contaminación accidental debido a la manipulación.

*Micrococcus varians* y *M. roseus* fueron las especies de micrococcos aisladas en leche. *M. varians* incrementó su proporción en cuajada y no volvió a ser aislado en queso. *M. roseus* no se volvió a aislar ni de cuajada ni de queso. Finalmente 4 cepas aisladas en leche, 1 aislada de cuajada y 4 de queso no pudieron ser identificadas a nivel de especie con suficiente exactitud.

Tampoco hemos podido encontrar en la bibliografía datos sobre especies de micrococcos aisladas de leche o queso de cabra. *M. varians* ha sido aislada como la especie predominante en el queso Cabrales (Núñez y Medina, 1980). Ambas especies (*M. varians* y *M. roseus*) han sido también aisladas de queso Manchego (García y col., 1988; Ortiz de Apodaca y Ordóñez, 1979), y de la superficie del queso Roquefort (Vivier y col., 1994). En cuanto al origen de estas especies, *M. varians* se encuentra con frecuencia en la piel de los mamíferos y en el agua (Schleiffer, 1986) y ésta podría ser su procedencia. En cuanto a *M. roseus* podría proceder del agua, que es, conjuntamente con el suelo, (Schleiffer, 1986) su hábitat habitual.

Por lo que respecta a la producción de enterotoxinas por las especies de estafilococos, se asocia generalmente esta propiedad con la propiedad coagulasa positiva (Evans y col., 1950), aunque algunos autores han observado que no todas las cepas coagulasa-positivas

---

producen enterotoxinas y que algunas coagulasa-negativas pertenecientes a las especies *S. epidermidis* (Breckindge y Bergdoll, 1971; Crass y Bergdoll, 1986; Hoover y col., 1983; Olsvik y col., 1982), *S. xylosus* (Bautista y col., 1988), *S. sciuri* (Valle y col., 1990), *S. warneri* (Valle y col., 1990) y *S. saprophyticus* (Valle y col., 1990) también pueden ser toxigénicas. Es por esta razón por lo que se ha ensayado la producción de enterotoxinas A, B, C y D en todas las cepas aisladas pertenecientes al género *Staphylococcus*. De todas las cepas de estafilococos coagulasa-negativas sólo dos cepas de *S. sciuri* aisladas de leche produjeron enterotoxina C, el resto no produjo ninguna de las 4 enterotoxinas ensayadas. Las 3 cepas coagulasa-positivas (*S. aureus*) produjeron enterotoxina A y C, pero no B y D. Hay que tener en cuenta que la producción de enterotoxinas depende del sustrato de crecimiento, pudiéndose obtener resultados distintos si la cepa es cultivada en otro medio sintético o en condiciones naturales (Gómez Lucía y col., 1989). Por lo tanto, nosotros sólo hemos averiguado la capacidad potencial que tienen las cepas aisladas para producir enterotoxinas.

Todas las cepas enterotoxigénicas produjeron SEC (enterotoxina estafilocócica C) sólo o en combinación con SEA. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por De Buyser y col. (1987); Harvey y Gilmour, (1988) y Valle y col. (1990) en cepas aisladas de cabras lo que parece confirmar que nuestras cepas podrían tener el mismo origen. A pesar de que la presencia de estafilococos enterotoxigénicos en leche y cuajada podría parecer que representa un riesgo de intoxicación, ya que las enterotoxinas producidas no se inactivan sino que permanecen en el queso largo tiempo (Kéjakovic-Miljkovic, 1960), los bajos recuentos de estafilococos registrados durante la elaboración y maduración del queso de Armada resultan tranquilizadores. Noleto y Bergdoll (1980) han puesto de manifiesto que las enterotoxinas estafilocócicas sólo son detectables en leche cuando las cepas enterotoxigénicas alcanzan recuentos de  $10^7$  ufc/ml.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**BAIRD-PARKER, A.C.** (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.*, 25:12-19.

**BAIRD-PARKER, A.C.** (1963). A classification of Micrococci and Staphylococci based on physiological and biochemical tests. *Journal of General Microbiology*, 30:409-427.

**BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDINA, M. y NUÑEZ, M.** (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk Staphylococci. *Appl. Environm. Microbiol.*, 54:566-569.

**BRECKINRIDGE, J.C. y BERGDOLL, M.S.** (1971). Outbreak of food borne gastroenteritis due to a coagulase negative enterotoxin producing Staphylococcus. *N. Engl. J. Med.*, 284:541-543.

---

**CRASS, B.A. y BERGDOLL, M.S.** (1986). Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 23:43-45.

**DE BUYSER, M.L., DILASSER, F., HUMMEL, R. y BERGDOLL, M.S.** (1987). Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goat's milk. *I. J. Food Microbiol.*, 5:301-309.

**DESMAZEAUD, M. y HERMIER, J.** (1968). Isolation, purification and properties of an extracellular proteinase from *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 8:565-577.

**DEVOYOD, J.J.** (1969). Flore microbienne du fromage Roquefort. II. Staphylocoques et Microcoques. *Lait* 481-482:20-39.

**DEVRIESE, L.A., SCHLEIFFER, K.H. y ADEGOKE, G.O.** (1985). Identification of coagulase negative Staphylococci from farm animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 58:45-55.

**DONNELLY, C.B., LESLIE, J.E., BLACK, L.A. y LEWIS, K.H.** (1967). Serological identification of enterotoxigenic Staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 15:1382-1387.

**EVANS, J.B., BEUTTNER, L.G. y NIVEN, C.F.** (1950). Evaluation of the coagulase tests in the study of Staphylococci associated with food poisoning. *J. Bacteriol.* 60:481-484.

**FONTECHA, J., PELÁEZ, C., JUÁREZ, M., REQUENA, T., GÓMEZ, C. y RAMOS, M.** (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science*, 73:1150-1157.

**GARCÍA, M.C., OTERO, A., GARCÍA, M.L., GARCÍA, M.R. y MORENO, B.** (1988). Species identification of staphylococci and micrococci isolated from ewes' milk cheeses. *J. Dairy Res.*, 55:269-276.

**GARCÍA, M.C., OTERO, A., GARCÍA, M.L., SIERRA, M. y MORENO, B.** (1990). Numerical taxonomy of Micrococcaceae isolated from Spanish sheep's milk cheeses. *J. Appl. Bacteriol.*, 68:33-41.

**GAYA, P., MEDINA, M., BAUTISTA, L. y NUÑEZ, M.** (1988). Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *I. J. Food Microbiol.*, 6:249-257.

**GÓMEZ-LUCIA, E.G., GOYACHE, J., ORDEN, J.A., BLANCO, J.L., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., DOMINGUEZ, L. y SUAREZ, G.** (1989). Production of

---



enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environm. Microbiol.*, 55:1447-1451.

**GUTIÉRREZ, L.M., CARBALLO, J., VIDAL, I., GONZÁLEZ PRIETO, J., MARTÍN SARMIENTO, R. y BERNARDO, A.** (1988). Evolución de los principales grupos de microorganismos durante la elaboración y maduración del queso de Valdeteja. *An. Fac. Vet. León*, 34:119-126.

**HARRIGAN, W.F. y Mc CANCE, M.E.** (1979). *Métodos de laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos lácteos*. Academia. León.

**HARVEY, J. y GILMOUR, A.** (1988). Isolation and characterization of Staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Lett. Appl. Microbiol.*, 7:79-82.

**HOOVER, D.G., TATINI, S.R. y MALTAIS, J.B.** (1983). Characterization of Staphylococci. *Appl. Environm. Microbiol.*, 46:649-660.

**HUGH, R. y LEIFSON, E.** (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria. *J. Bact.*, 66:24.

**JAY, J.M.** (1966). *J. Bact.*, 91:1804. Citado por Keogh, B.P. (1971). Reviews of the progress of Dairy Science. *J. Dairy Res.*, 38:91-111.

**KÉJAKOVIC-MILJKOVIC, V.** (1960). *Arch. Lebensmittelhyg.*, 11:103. Citado por Reiter, B., Fewins, B.G., Fryer, T.F. y Sharpe, M.E. (1964). Factors affecting the multiplication and survival of coagulase positive Staphylococci in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 31:261-272.

**KLOOS, W.E.** (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology*, 34:559-592.

**LITOPOULOU-TZANETAKI, E. y TZANETAKIS, N.** (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology*, 9:13-19.

**MARKUS, Z.H. y SILVERMAN, G.J.** (1970). Factors affecting the secretion of staphylococcae enterotoxin. *J. Appl. Microbiol.*, 20:492-496.

**MAS MAYORAL, M., TIMÓN ESTEBAN, J. y GONZÁLEZ-CRESPO, J.** (1991). Queso de los Ibores: caracterización productiva, físico-química y microbiológica. *Archivos de Zootecnia*, 40:103-113.

**MATTICK, A., NEAVE, T.R. y CHAPMAN, H.R.** (1959). *Staphylococcus aureus* in Cheddar cheese. *Proceedings IV International Dairy Congress.*, 3:1914.

---

**MEDINA, M., GAYA, P. y NÚÑEZ, M.** (1992). Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes through ripening. *J. Dairy Res.*, 59:563-566.

**MINOR, T.E. y MARTH, E.H.** (1976). Staphylococci and their significance in foods. Elsevier, Nueva York.

**MUNCH-PETERSEN, E.** (1960). *Aust. J. Dairy Technol.*, 15:25. Citado por Keogh (1971).

**NOTERMANS, S. y HEUVELMAN, C.J.** (1983). Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *S. aureus*. *J. Food Sci.*, 48:1832-1840.

**NÚÑEZ, M y MEDINA, M.** (1980). Les microcoques et les staphylocoques dans le fromage bleu Cabrales. *Lait*, 50:171-183.

**OLSVIK, O., FOSSUM, K. y BERDAL, B.P.** (1982). Staphylococcae enterotoxin A, B y C produced by coagulase-negative strains within the family Micrococcaceae. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.*, 90:441-444.

**ORDÓÑEZ, J.A. y ORTIZ DE APODACA, M.J.** (1977). Lipolytic activity of Micrococci isolated from cheese. *Milchwissenschaft*, 32:531-533.

**ORTIZ DE APODACA, M.J. y ORDÓÑEZ, J.A.** (1979). Microflora del queso Manchego: micrococcos. *Anal. Bromatol.*, 31:11-18.

**ORTIZ DE APODACA, M.J., SELGAS, M.D. y ORDOÑEZ, J.A.** (1993). Lipolytic and proteolytic activities of Micrococci isolated from cheese. *Food Research International*, 26:319-325.

**ROBERTSON, P.S. y PERRY, K.D.** (1961). Enhancement of the flavour of Cheddar cheese by adding a strain of Micrococcus to the milk. *J. Dairy Res.*, 28:245.

**SHARPE, M.E., NEAVE, F.K., REITER, B.** (1962). Staphylococci and micrococci associated with dairying. *J. Appl. Bacteriol.*, 25:403.

**SCHLEIFFER, K.H.** (1986). Gram-positive cocci. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, T.C. (ed.). Williams & Wilkins. Baltimore. p. 999-1103.

**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.

---

**SMITH, H.B.H. y FARKAS-HIMSLEY, H.** (1969). *Can. J. Microbiol.*, 15:879. Citado por Keogh (1971).

**SMITH, M.C. y ROGUINSKY, M.** (1977). Mastitis and other diseases of goats' udder. *Journal of the American Veterinary and Medical Association*, 171:1241-1248.

**STECCHINI, M.L., SARAIS, I. y DE BERTOLDI, M.** (1991). The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 14:99-110.

**THATCHER, F.S. y SIMON, W.** (1956). A comparative appraisal of the properties of Staphylococci isolated from clinical sites and from dairy products. *Can. J. Microbiol.*, 2703-714.

**THATCHER, F.S.** (1958). *Can. J. publ. Hlth.*, 49:58. Citado por Keogh, B.P. (1971). Reviews of the progress of Dairy Science. *J. Dairy Res.*, 38:91-111.

**TODD, E.C.D.** (1978). Foodborne disease in six countries. A comparison. *J. Food Protect.*, 41:559-565.

**VALLE, J., GOMEZ-LUCIA, E., PIRIZ, S., GOYACHE, J., ORDEN, J.A. y VADILLO, S.** (1990). Enterotoxin production by Staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1323-1326.

**VIVIER, D., RATOMAHENINA, R. y GALZY, P.** (1994). Characteristics of Micrococci from the surface of Roquefort cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, 76:546-552.

**WINEKE, A.A. y GILVERT, R.J.** (1987). Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxins in foods from outbreaks of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 4:135-143.

**ZOTTOLA, E.A. y SMITH, L.B.** (1991). Pathogens in cheese. *Food Microbiology*, 8:171-182.

---



# **CAPÍTULO VI. ESTUDIO DE LAS LEVADURAS AISLADAS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen vegetativamente por gemación, en algún caso lo hacen por fisión o por una combinación de ambas formas.

Su taxonomía atendiendo a los criterios de Kreger-van Rij (1984) es la siguiente:

Reino: FUNGI

División: EUMYCOTA

Subdivisión: - ASCOMYCOTINA

- BASIDIOMYCOTINA

- DEUTEROMYCOTINA

Subdivisión:

I- ASCOMYCOTINA:

Se incluyen las levaduras que se reproducen sexualmente por medio de ascosporas localizadas en el interior de cuerpos fructíferos, llamados ascas.

Dentro de esta subdivisión se establece:

Orden: ENDOMYCETALES, se distinguen dos familias:

Familia: SACCHAROMYCETACEAE

---

- Subfamilia: - SCHIZOSACCHAROMYCETOIDEAE
- NADSONIOIDEAE
- SACCHAROMYCETOIDEAE
- LIPOMYCETOIDEAE

Familia: SPERMOPHTHORACEAE

## II- BASIDIOMYCOTINA:

Los basidiomicetos se reproducen sexualmente por medio de basidiosporas.

## III- DEUTEROMYCOTINA:

No se observa reproducción sexual. Se diferencian dos familias:

Familia: CRYPTOCOCCACEAE

Familia: SPOROBOLOMYCETACEAE

Las levaduras que asimilan lactosa contribuyen conjuntamente con las bacterias acidolácticas al descenso de pH que tiene lugar en las etapas tempranas de la maduración. Aquellas levaduras que además tienen capacidad fermentativa hidrolizan la lactosa a etanol y CO<sub>2</sub> y a partir del etanol se originan ésteres de ácidos grasos que son responsables del desarrollo del sabor en determinados tipos de quesos. La producción de CO<sub>2</sub> es proporcional a la concentración de lactosa disponible, si la fermentación de la lactosa por las levaduras ocurre en las primeras etapas los riesgos de que ocurran hinchamientos en etapas posteriores disminuyen considerablemente (Millet y col., 1974). Las levaduras pueden también participar junto con los lactobacilos heterofermentativos y los leuconostoc en la apertura de la cuajada, si bien un exceso en la producción de CO<sub>2</sub> es indeseable ya que puede provocar hinchamientos.

Algunas levaduras tienen capacidad proteolítica y lipolítica, además influyen en la eliminación de aminas y pueden jugar un papel importante en el desarrollo del aroma y el sabor del queso.

Otra actividad interesante de las levaduras es la capacidad para metabolizar el ácido láctico permitiendo así el asentamiento de otros grupos microbianos sensibles a pH ácidos como por ejemplo los micrococos.

Las levaduras, por tanto, participan activamente en las transformaciones que ocurren durante la maduración ya que poseen un gran potencial enzimático y contribuyen al desarrollo

---

del sabor y la textura (Nahabieh y Schmidt, 1990). También han sido muy estudiadas por representar los contaminantes más importantes en algunos tipos de productos lácteos en los que los bajos valores de pH ofrecen un medio selectivo para su crecimiento (Rohm y col., 1992).

Las levaduras, al contrario de lo que ocurre con ciertas bacterias, contribuyen poco al deterioro de los productos lácteos, aunque pueden tener importancia si la presencia es muy elevada, el tiempo de exposición es largo, si se produce contaminación a lo largo de la transformación del producto, o bien si se parte de leche cruda para la elaboración (las células y esporas de levaduras y los hongos filamentosos no sobreviven generalmente a las temperaturas de pasteurización (Cooke y Brazis, 1968)). Vadillo (1987) aisló levaduras sólo después de tratamientos térmicos a baja temperatura y durante largos periodos de tiempo, como 63°C durante 30 minutos, y en muy bajos porcentajes.

La población de levaduras que se aísla normalmente de los quesos incluye aquéllas que llegan accidentalmente a la leche o al queso procedentes del agua, aire, sal, por contaminación humana o a través de vectores como insectos, además de las levaduras que forman parte de la flora normal de la leche cruda. Entre los géneros de levaduras que se aíslan frecuentemente de derivados lácteos figuran *Dipodascus*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulasporea*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* que pertenecen a la subfamilia SACCHAROMYCETOIDEA y *Lipomyces* que pertenece a la subfamilia LIPOMYCETOIDEAE, todos tienen reproducción sexual y asexual por ascosporas. Dentro de la familia CRYPTOCOCCACEAE se aíslan frecuentemente géneros como *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* o *Trichosporon*. Sin embargo, en el queso la flora de levaduras está poco diversificada (Baroiller y Schmidt 1984), ya que diferentes factores ejercen una selección durante las fases de elaboración y maduración del queso.

Vivier y col. (1994) estudiaron el efecto de varios parámetros (pH, concentración de NaCl, Aw y T<sup>a</sup>) sobre el crecimiento de las levaduras concluyendo que mientras el pH prácticamente no afecta al crecimiento, ya que crecen en rangos de pH de 2,5 a 8 (aunque su pH óptimo es de 5,5), aumentos en la concentración de NaCl provocan descensos lineales en la población de levaduras y sólo las cepas de algunas especies más halotolerantes (*C. sphaerica*) podían crecer al 14% de sal. También demostraron que descensos en la Aw provocan descensos lineales de la población de levaduras.

El salado es un factor importante que suele provocar un descenso pronunciado en el número de estos gérmenes. En general el número de todos los grupos de bacterias y levaduras disminuye tras el salado (Galzin y col., 1970).

Después del salado se suele observar un predominio de las formas no esporuladas (Galzin y col., 1970; Besançon y col., 1992), mientras que desaparecen las levaduras acidógenas que parecen ser particularmente sensibles a la sal y al incremento de extracto seco (Galzin y col., 1970).

Cuando el salado se efectúa en seco, la población de levaduras se mantiene más estable en el centro del queso que en la superficie ya que la sal penetra gradualmente al interior y su efecto es menos intenso que en la superficie.

La concentración de sal también influye en la concentración de CO<sub>2</sub> producida por las levaduras que fermentan la lactosa, concentraciones de NaCl del 0,5 al 1% incrementan la producción de CO<sub>2</sub> mientras que concentraciones mayores del 3% de NaCl la disminuyen (Millet y col., 1974).

- Por lo que respecta a la disponibilidad de fuentes de carbono (lactosa), algunas levaduras tienen capacidad asimilativa y a veces también fermentativa de la lactosa. Estas levaduras se suelen desarrollar en las primeras 48 horas después de la adición del cuajo.

La hidrólisis enzimática de la lactosa en sus dos componentes (glucosa y galactosa) no parece ser necesaria para la fermentación de la lactosa por las levaduras.

- Muchas levaduras se desarrollan a valores de pH entre 3 y 8 ó entre 3 y 11, aunque su pH óptimo está por lo general entre 3,5 y 6,5 (Skinner y col., 1980). Este factor quizá no tenga demasiado efecto ya que las levaduras son microorganismos acidófilos con márgenes amplios de pH en los que su crecimiento se ve poco afectado, pero el salado puede provocar una sensibilización de las levaduras al pH ácido.

Las levaduras fermentadoras de la lactosa ven afectada su producción de CO<sub>2</sub> en función del pH (Millet y col., 1974). Así a pH 5,0 la producción de CO<sub>2</sub> es máxima y a pH 6,0 es todavía importante.

- Aunque la temperatura óptima para las levaduras es 25-28°C o incluso 32°C, algunas especies como *Kluyveromyces thermotolerans* tienen posibilidad de crecer en márgenes más amplios (de 4 a 44°C) (Vivier y col., 1994).

- En cuanto a la influencia del O<sub>2</sub> se ha observado que bajas concentraciones de O<sub>2</sub> provocan descensos en la población de levaduras esporuladas, en la de cepas nitrato (-) y, aunque parezca extraño, incluso en la de levaduras de metabolismo fermentativo (en determinados casos el proceso fermentativo se ve estimulado por concentraciones bajas de O<sub>2</sub>). En condiciones de bajos niveles de O<sub>2</sub> las levaduras se pueden ver desplazadas por otros grupos microbianos más resistentes a condiciones microaerófilas o anaerobias como son algunas micrococáceas, o pueden ver retrasado su asentamiento.



Según Ghoniem (1968) los antibióticos han contribuido al incremento de infecciones causadas por levaduras tanto en el hombre como en el ganado, así como a su mayor severidad. Esto también parece tener relación con la marcada incidencia de levaduras en la leche y productos lácteos. Las levaduras acceden a la leche a partir de animales con mastitis micóticas o a partir del ambiente.

En los últimos 15 años se han implicado varios tipos de levaduras en la producción de mastitis en el ganado. Este incremento parece coincidir con la introducción de antibióticos para el tratamiento de infecciones en las ubres.

## **2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO**

Además del material general descrito en el capítulo I para el examen microscópico se utilizaron los microscopios ópticos OLYMPUS CHB CO11 y de contraste de fases NIKON 8TR-Ke-Ph.

Para realizar las microfotografías se empleó un microscopio NIKON OPTIPHOT acoplado con un transformador NIKON UFX-DX y una cámara fotográfica NIKON FX 35 DX.

### **2.2.- MÉTODOS**

#### **2.2.1.- AISLAMIENTO DE LAS CEPAS**

En cada lote y en cada punto de muestreo se aislaron al azar 10 cepas a partir de las placas de OGYEA con un número de colonias entre 30 y 300. Estas cepas se mantuvieron en agar Sabouraud antes de proceder a su purificación e identificación y se cubrieron con parafina estéril para reducir su actividad metabólica. Para las resiembras de las cepas de levaduras se empleó el medio 2% Glucose Yeast Peptone.

#### **2.2.2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS**

Los métodos seguidos fueron los propuestos por Lodder (1970), Kreger-van Rij (1984) y Barnett y col. (1990). En cada cepa se estudiaron características morfológicas, culturales, sexuales y bioquímicas.

---

### **Características morfológicas.**

Las pruebas morfológicas son muy importantes en la identificación de las levaduras:

- Permiten diferenciar entre géneros, ya que en las claves dicotómicas tienen gran poder discriminante en etapas tempranas de la identificación.
- Ciertas levaduras anascosporógenas tienen un perfil bioquímico similar al de levaduras ascosporógenas, siendo necesario recurrir a caracteres morfológicos para poder diferenciarlas.

En cada cepa se observó:

1.- Morfología de las células y tipo de reproducción vegetativa: la morfología de las células y el tipo de reproducción vegetativa, que puede tener lugar por gemación (en cuyo caso se observa si es unipolar, bipolar o multipolar), fisión, o por combinación de ambas, se observó en preparaciones en fresco, a partir de cultivos en 2% GYP caldo e incubados 2-3 días a la temperatura óptima (25-28°C). Se observó al microscopio con objetivo de inmersión y empleando como contraste una gota de lugol o una solución acuosa de nigrosina al 5%.

2.- Presencia de pseudomicelio y/o micelio verdadero: se estudió en agar maíz y en agar morfológico después de 1 a 2 semanas de incubación a la T<sup>a</sup> óptima.

Con el cultivo en agar maíz se hizo una extensión en portas con una gota de lugol y se observó al microscopio.

Por lo que respecta a la observación en agar morfológico, se esterilizaron en primer lugar portaobjetos y sobre cada uno se dejó solidificar una capa fina de dicho medio, por otro lado se prepararon placas de petri con discos de papel de filtro humedecidos con agua o glicerol al 20% para evitar que se desecara el cultivo y varillas de vidrio en forma de U (todo el material estaba estéril). El porta con el medio solidificado se sembró con el cultivo de levadura y a continuación se colocó sobre él un cubre estéril. Se colocó en la placa sobre la varilla de vidrio y se incubó de 1 a 2 semanas a 25°C. Al cabo de este tiempo se observó directamente al microscopio. También se probó separando el cubre y colocándolo en otro porta limpio con una gota de agua o de lugol.

Para distinguir un pseudomicelio de un micelio verdadero hay que tener en cuenta que:

- El pseudomicelio está constituido por una cadena de células que se reproducen exclusivamente por gemación, no presenta septos discernibles, las células terminales son más cortas o aproximadamente iguales a las precedentes y hay marcadas constricciones (fig. 1).

- Si las células se reproducen sólo por fisión se constituye un micelio verdadero. Éste se caracteriza por presentar septos que se perciben por su refractividad, las células terminales son más largas que las precedentes, tiene pocas constricciones y a veces se aprecian artrosporas (fig. 2). También hay que tener presente que pueden darse formas intermedias que presentan algunos septos y a veces células terminales más largas que las precedentes.

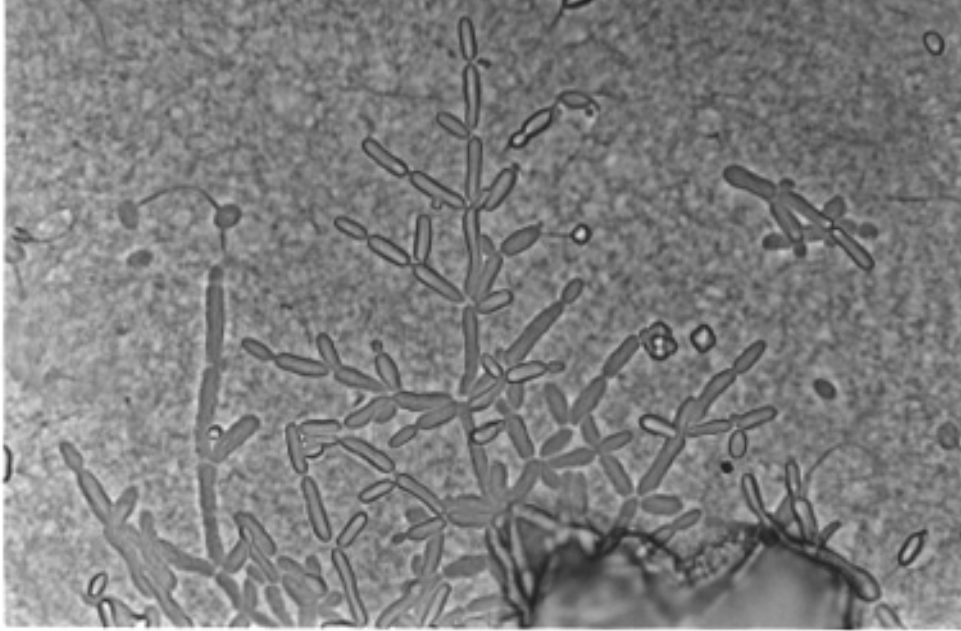


Figura 1.- Microfotografía mostrando un pseudomicelio (preparación de *Candida lambica* aislada del queso de Armada, variedad Sobado).

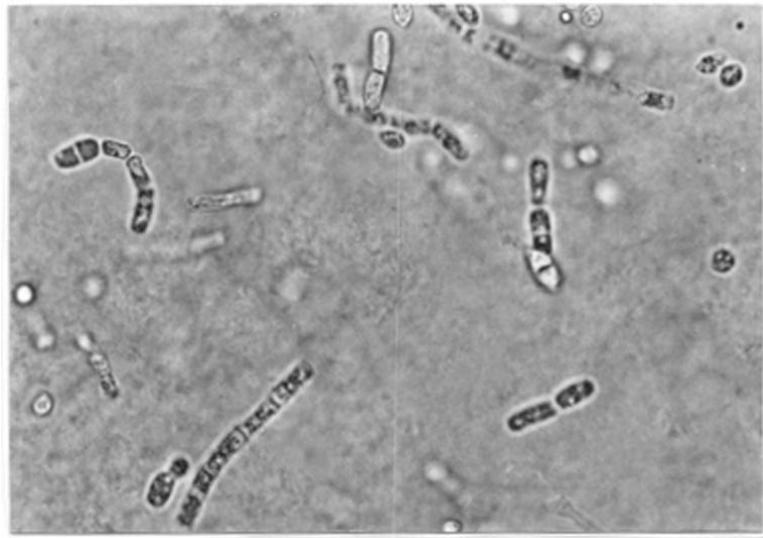


Figura 2.- Microfotografía mostrando un micelio verdadero (preparación de *Trychosporon beigelii* aislada del queso de Armada, variedad Sobado).

3.- Producción de balistosporas: es característico de las levaduras del género *Sporobolomyces* y aunque éste no es un género que se aísla normalmente de productos lácteos algunas especies son comunes en el ambiente.

Las balistosporas se producen en estructuras que sobresalen de las células, denominadas esterigmas, a partir de las cuales son expulsadas al aire. En los cultivos en placa se observan imágenes invertidas en las tapas debido a la descarga de esporas.

El medio utilizado para su observación fue el agar Gorodkova. La técnica que se siguió fue la del cultivo en portaobjetos modificada (Lodder y Kreger-van Rij, 1952).

Se prepararon portaobjetos con el medio y una vez sembrados se colocaron invertidos sobre un segundo porta con una varilla en forma de U entre ambos y se incubaron en placas de petri con discos de papel de filtro humedecidos en agua o glicerol.

Se incubó durante 4-5 días a 25°C, al cabo de este tiempo se determinó la presencia o ausencia de balistosporas por examen microscópico del porta inferior, también se examinó el porta con el cultivo.

### **CARACTERÍSTICAS CULTURALES.**

En cada aislamiento se estudió:

1.- Crecimiento en medio sólido (2% GYP (Glucose-yeast-peptone) agar después de 2-3 días a 25°C). Se observó el aspecto de las colonias (lisas, rugosas, planas, en forma de cúpula, mucosas), el color, la producción de pigmentos, etc.

2.- Crecimiento en medio líquido (2% GYP caldo después de 2-3 días a 25°C). Se observó la formación de película, el aspecto de la misma, la formación de anillo, de sedimento, etc.

### **CARACTERÍSTICAS SEXUALES.**

Se observó:

1.- Formación de ascas y ascosporas, para ver si tenía lugar la reproducción sexual por medio de ascas y ascosporas se empleó:

- Medio de preesporulación: YM (Yeast-Malt) caldo y YM agar (Wickerham, 1951a). Se incubó a 25°C durante 1-2 días, pudiendo hacerse una resiembra en este medio.

- Medio de esporulación: A partir del cultivo crecido en el medio de preesporulación se sembraron diferentes medios de esporulación para observar en cada uno de

---

ellos si tenía lugar la formación de ascosporas. Los medios empleados fueron agar Gorodkowa, agar acetato, agar de Kleyn, agar V8, agar maíz, patata-dextrosa-agar y agar etanol de Starkey.

A veces las células mal nutridas tienen dificultad para producir ascosporas, por ello se cultivaron previamente en un medio rico (medio de preesporulación) y luego fueron transferidas al medio de esporulación. En muchos de estos medios de esporulación la concentración de algún azúcar u otro nutriente es limitada, entonces las células de levadura detienen su reproducción vegetativa y comienza la formación de ascosporas (se inicia la meiosis).

Se incubó a la temperatura óptima (25-28°C) y a 20°C, examinando la producción de ascosporas a los 3, 7, 14 y 21 días.

Para el examen microscópico se siguió la modificación del método de Wirtz-Schaeffer-Fulton (1933), como lo describe McClung (1943) y que consiste en hacer una extensión fina de células en un porta que luego se fija al calor. A continuación se tiñe con verde malaquita (solución acuosa al 5% ó 1% en fenol acuoso al 1%) durante 30-60 segundos, se pasa por la llama sin que hierva 3 ó 4 veces, aproximadamente 2 minutos, se lava durante medio minuto y se hace una tinción de contraste con una solución de safranina acuosa al 0,5%, durante 30 segundos. Después de lavar y secar se observa al microscopio óptico con objetivo de inmersión. Las esporas de las levaduras aparecen verdes mientras que las ascas y las células son de color rosa fuerte.

## 2.- Interfertilidad de las levaduras:

Para afirmar que una levadura no forma ascosporas se debe ensayar la producción de ascas en una gran variedad de medios, pero además es necesario comprobar que no se trata de tipos haploides de especies heterotálicas. Para comprobar la interfertilidad entre las cepas se sembraron varias, presumiblemente de la misma especie, en los medios de esporulación, tomándolas de 4 en 4, se incubaron a 25°C durante 3 semanas y se observó la formación de ascas y ascosporas cada 7 días.

## **CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.**

En cada aislamiento se efectuaron las siguientes pruebas:

1.- Asimilación de azúcares: se siguió el método auxanográfico de Beijerinck y se empleó el medio basal II (Lodder, 1970).

En una placa se vertieron 2 ml del cultivo, previamente "lavado" en solución salina fisiológica (para "lavar" las células se centrifugó el cultivo, se decantó y resuspendió en la solución salina, repitiendo esta operación una vez más), y se añadieron 15-20 ml del medio

---

basal II, fundido y enfriado a 40°C, mezclando bien. Una vez que el medio se solidificó completamente se colocaron en la superficie aproximadamente 0,05 gramos del azúcar a ensayar y se incubó a 25°C durante 3 días, cuando los resultados no fueron claros se prolongó 4 días más la incubación. La asimilación del azúcar estimuló el crecimiento de las cepas en la zona de difusión del mismo.

Los azúcares ensayados fueron glucosa, maltosa, rafinosa, celobiosa, galactosa, sucrosa, trealosa, ribitol, L-sorbosa, D-xilosa, L-arabinosa e inositol.

La glucosa es asimilada por todas las levaduras. Si una cepa asimila un azúcar cualquiera, necesariamente asimila también la glucosa.

2.- Fermentación de azúcares: se empleó el medio basal de Wickerham (Wickerham, 1951a). Se sembró cada tubo, con el azúcar a ensayar, con 0,1 ml del cultivo. Se añadieron aproximadamente 2 ml de agar bacteriológico para que al solidificar formara un tapón que crease anaerobiosis. Se incubó a 25°C y se observó el viraje del color y la producción de gas a los 3, 7 y 14 días de incubación.

Los azúcares ensayados fueron glucosa, lactosa, galactosa, sucrosa, maltosa y melibiosa.

Hay que tener en cuenta que cualquier azúcar fermentado es también asimilado (salvo pocas excepciones), el fenómeno inverso no ocurre siempre. Además si una cepa fermenta un azúcar cualquiera, esa cepa fermentará también la glucosa.

3.- Asimilación de nitratos: la capacidad de asimilación depende del sistema reductasa que permite llevar a cabo la reducción asimilatoria del nitrato a otros compuestos más reducidos.

La asimilación de nitratos se estudió en medio líquido (Wickerham, 1946), para lo cual se preparó una solución de 100 ml con Bacto Yeast Carbon Base (11,7 g/l), esterilizada a 115°C/15' y nitrato potásico (0,78 g/l), esterilizado por filtración. Se mezclaron 0,5 ml de esta solución con 4,5 ml de agua destilada estéril, obteniendo así una dilución 1/10, se sembró e incubó a 25°C durante 3 días. Transcurrido ese tiempo se hizo una segunda siembra (aunque la fuente de nitrógeno no sea asimilada se suele observar cierto crecimiento en los tubos, debido a que las células bien nutridas excretan al medio nitrógeno asimilable y también a la presencia de ciertas cantidades de sulfato amónico en el medio de cultivo) y se observó la presencia o no de turbidez en el medio.

4.- Ureasa: las levaduras difieren en su capacidad para hidrolizar elevadas concentraciones de urea en medios completos conteniendo una fuente de nitrógeno orgánico como la peptona.

---

Se empleó como medio el agar urea de Christensen (Christensen, 1946). El cultivo se incubó a 25°C durante 5 días. La reacción se consideró positiva tras la aparición de un color rosa fuerte. Cuando la cepa produce ureasa tiene lugar la hidrólisis de la urea con la consiguiente formación de amoníaco, esto hace aumentar el pH del medio y éste vira de amarillo a rojo.

Para algunas cepas se ensayó también:

5.- Crecimiento en un medio sin vitaminas (Wickerham, 1951b): muchas especies de levadura son auxoheterotróficas y requieren una o más vitaminas, a partir de una fuente externa, para sintetizar nutrientes esenciales. Se estudió la capacidad para crecer o no en un medio carente de factores de crecimiento (vitaminas del grupo B) en condiciones de aerobiosis. El medio empleado se obtuvo mezclando 0,5 ml de Bacto-vitamin-free-yeast base al 16,7% (esterilizado por filtración) con 4,5 ml de agua destilada estéril, y se incubó a 25°C durante 7 días.

Las células de levadura que están bien nutridas pueden crecer en este medio a costa de factores de crecimiento que hayan podido acumular, por lo que la proliferación en el primer tubo del test líquido no concluye la capacidad de las cepas para crecer en un medio libre de vitaminas; es necesario hacer una segunda siembra en otro tubo para eliminar esa fuente interna de factores de crecimiento.

6.- Crecimiento en presencia de 100 ppm de cicloheximida (actidiona): se mezclaron 4,5 ml de una dilución 1/10 de actidiona (esterilizada por filtración) con 0,5 ml de Bacto Yeast Nitrogen Base, concentrado 10 veces, que llevaba glucosa. Se sembró e incubó a 25°C durante 3 semanas. El crecimiento a los 7 días, que se apreció por la turbidez, indica que la cepa era altamente resistente a la cicloheximida, en cambio un crecimiento débil a las 4 semanas indica la sensibilidad al antibiótico.

Dada la complejidad de la identificación de levaduras en base a características morfológicas, culturales, sexuales, y bioquímicas (utilización de claves dicotómicas que pueden inducir a fácil error) se decidió contrastar la identificación utilizando galerías API 32C. Para ello 34 cepas previamente identificadas por los métodos convencionales (Lodder, 1970; Kreger-van Rij, 1984 y Barnett y col., 1990) se sometieron al veredicto de las galerías API.

### 2.2.3.- ENSAYO DE ALGUNAS PROPIEDADES DE INTERÉS TECNOLÓGICO EN LAS CEPAS IDENTIFICADAS.

Se siguieron los criterios de Besançon y col. (1992). En cada cepa se ensayó:

- Crecimiento a diferentes concentraciones de sal (5%, 10%, 15% y 20% NaCl). El medio empleado fue Bacto Yeast Nitrogen Base al 0,67% p/v con glucosa al 0,5% p/v y con cada una de las diferentes concentraciones salinas.

- Asimilación de lactosa al 0,5%. Como medio se empleó Bacto Yeast Nitrogen Base al 0,67% p/v con lactosa al 0,5% p/v en tampón fosfato 0,1M, pH 7.

- Asimilación de ácido láctico al 0,5%. Se empleó como medio Bacto Yeast Nitrogen Base al 0,67% p/v con ácido láctico al 0,5% p/p en tampón tartrato 0,1 M, pH 4.

- Asimilación de tributirina (glicerol tributirato). Se empleó como medio Bacto Yeast Nitrogen Base al 0,67% p/v con glicerol tributirato al 0,3% p/p, agitando diariamente los tubos.

- Asimilación de aminas (histamina, tiramina, putrescina y cadaverina). El medio empleado fue Bacto Yeast Carbon Base al 1,17% p/v con 0,8 g/l de la amina correspondiente.

En estas cinco pruebas la temperatura de incubación fue 25°C y el tiempo de 3 a 7 días.

### 3.- RESULTADOS

De las 274 cepas aisladas en OGYEA durante la elaboración y maduración de los 4 lotes de queso de Armada, 128 cepas (46,71%) se consideraron levaduras y fueron identificadas como *Candida lambica* (58 cepas), *C. krusei* (11), *C. catenulata* (1), *C. ingens* (2), *Kluyveromyces marxianus* (11), *K. lactis* (19), *Saccharomyces unisporus* (10), *Candida lipolytica* (4), *C. pintolopesii* (1), *C. colliculosa* (1) y *Trichosporon beigelii* (3). Dada la complejidad de la identificación de las levaduras se recogen seguidamente los pormenores de la clasificación:

#### **Género *Candida* (78 cepas):**

- 58 cepas asimilaron glucosa y xilosa, sólo fermentaron la glucosa y no asimilaron ningún otro azúcar ensayado, sólo dos cepas asimilaron muy débilmente la lactosa, las 58 asimilaron el ácido láctico así como las 4 aminas ensayadas, no mostraron capacidad lipolítica



sobre la tributirina, todas formaron pseudomicelio (salvo 2 cepas que sólo formaron en agar maíz un pseudomicelio rudimentario). Estas cepas se identificaron como *Candida lambica*.

- 11 cepas no fueron capaces de asimilar la D-xilosa, en el resto de las pruebas ensayadas coincidieron con la especie anterior; se identificaron como *C. krusei*.

- 1 cepa fermentó la glucosa, galactosa y maltosa y no asimiló la tiramina; se identificó como *C. catenulata*.

- 2 cepas que sólo formaron pseudomicelio en agar maíz, no fermentaron ningún azúcar pero asimilaron la glucosa, galactosa y sorbosa, no asimilaron tampoco el lactato, presentaron actividad lipolítica sobre la tributirina e hidrolizaron las cuatro aminas ensayadas; se identificaron como *C. ingens*.

- 4 cepas mostraron características bioquímicas y morfológicas que nos llevaron a adscribir las a la especie *C. lipolytica*.

- 1 cepa mostró el perfil típico de *C. colliculosa*.

- 1 cepa que formó pseudomicelio muy rudimentario, sólo en agar maíz, se consideró perteneciente a la especie *C. pintolopesii*. En agar maíz se observó la presencia de cadenas ramificadas de células ovoides y alargadas, al igual que las descritas por Lodder (1970) en su monografía sobre las levaduras.

### **Género *Kluyveromyces* (30 cepas):**

La taxonomía del género *Kluyveromyces* ha sido controvertida.

Lodder (1970) incluye dentro de este género 4 especies, *Kluyveromyces bulgaricus*, *K. wikenii*, *K. lactis* y *K. marxianus*. Barnett y col (1979) consideran *K. lactis* y *K. bulgaricus* no totalmente diferentes de *K. marxianus*. Actualmente Barnett y col. (1990) agrupan en la especie *K. marxianus* a *K. marxianus* var. *bulgaricus* y *K. marxianus* var. *wikenii* (variedades establecidas por Kreger-van Rij (1984)) y consideran *K. lactis* como una especie diferenciada.

Las principales diferencias en los caracteres bioquímicos radican en que *K. marxianus* no asimila la maltosa, la L-sorbosa ni la trealosa, puede o no asimilar la celobiosa y fermenta la galactosa aunque a veces débilmente; en cambio *K. lactis* asimila la celobiosa, la maltosa, la trealosa y la L-sorbosa (si bien esta última a veces débilmente) y fermenta la galactosa.

- 11 cepas se adscribieron a la especie *K. marxianus*.

- 11 cepas no asimilaron, en su mayoría, la celobiosa. Lodder (1970) utilizó esta prueba como discriminante entre *K. bulgaricus* y *K. lactis*. Sin embargo estas 11 cepas se adscribieron a la especie *K. lactis* ya que en la mayoría de las pruebas se asemejaron a esta

especie, y otros criterios de identificación no consideran la prueba de la asimilación de la celobiosa tan discriminante.

- 8 cepas coincidieron en la mayoría de las características bioquímicas y morfológicas con *Candida sphaerica*, aunque difirieron en algunas pruebas. A estas cepas se les hizo la prueba de interfertilidad tomando las cepas de 4 en 4, se observaron células conjugantes y/o ascosporas, según estos resultados concluimos que se trata de *Kluyveromyces lactis*, especie más avanzada del género *Kluyveromyces* y la única en la que se observa heterotalismo (Lodder,1970)).

Aunque Barnett considera actualmente *K. marxianus* y *K. lactis* especies claramente diferentes no cabe duda de que ambas especies presentan gran similitud como han demostrado nuevas técnicas de identificación basadas en hibridación de ácidos nucleicos, comparación del porcentajes en (G+C) y estudio de las estructuras de la pared o estructuras antigénicas, que tienden a agrupar o diferenciar las especies sin considerar sus características bioquímicas.

#### ***Saccharomyces* (10 cepas):**

Las cepas incluídas en este género se caracterizaron porque la formación de las ascas no fue precedida de células conjugantes, presentaron capacidad para asimilar y fermentar la glucosa y la galactosa, sólo una cepa asimiló la cadaverina, 4 cepas asimilaron la histamina (3 de ellas débilmente), no asimilaron la putrescina, asimilaron la tiramina, no presentaron acción sobre la tributirina y no asimilaron el ácido láctico. Se identificaron como *Saccharomyces unisporus*.

Según Kreger-van Rij (1984) son caracteres decisivos para la identificación de *S. unisporus* la capacidad asimilatoria de L-Lys y etilamina, la asimilación de cadaverina, la capacidad para crecer en presencia de 100 y 1000 ppm de cicloheximida y la asimilación de sucrosa. Las cepas ensayadas difirieron en el hecho de que no asimilaban la cadaverina (sólo una cepa débilmente) pero dado que en el resto de las pruebas bioquímicas y morfológicas coincidieron con esta especie se adscribieron a *S. unisporus*.

#### ***Trichosporon beigelii* (3 cepas):**

Las 3 cepas formaron micelio verdadero y artrosporas y se adscribieron a la especie *Trichosporon beigelii*. Las células se reproducían por fisión, observándose también células gemantes. Estas cepas no mostraron capacidad fermentativa.

En la tabla I se presenta la distribución de las especies a lo largo de la elaboración y maduración del queso.

Se puede observar un claro predominio de las formas anascosporógenas. *Candida lambica* (45% de las cepas aisladas) es la especie dominante a lo largo del proceso, salvo en queso de 1 semana donde predominan *K. lactis* y *K. marxianus* (47,62% y 23,81% de los aislamientos en esta etapa, respectivamente) y en queso de 16 semanas donde predomina *C. krusei* (87,5% de los aislamientos en esta etapa). Entre las levaduras esporógenas predominan *Kluyveromyces marxianus* (16%) y *Saccharomyces unisporus* (8%).

En la tabla II aparecen las características bioquímicas y en la III se recogen las características morfológicas, culturales y sexuales de las distintas cepas.

Las características de interés tecnológico aparecen recogidas en la tabla IV. Por lo que respecta al crecimiento a distintos porcentajes de sal todas crecieron al 5%, al 10% crecieron las cepas de *Candida krusei*, *C. inconspicua*, *Kluyveromyces marxianus* y *K. lactis*. Muy pocas cepas pudieron crecer a porcentajes de sal del 15% y las que lo hicieron fue muy débilmente, se trata de cepas de *K. lactis* y algunas de *K. marxianus*, que son las especies más halotolerantes.

Tabla I.- Distribución por puntos de muestreo de las especies de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Especie	Leche		Cuajada		Queso (semanas)									
		(%)		(%)	1	(%)	2	(%)	4	(%)	8	(%)	16	(%)
<i>C. lambica</i>	12	63,16	7	38,89	3	14,28	8	47,06	15	68,18	12	52,17	1	12,5
<i>C. krusei</i>	-		1	5,55	1	4,76	1	5,88	-		1	4,35	7	87,5
<i>C. catenulata</i>	-		1	5,55	-		-		-		-		-	
<i>C. ingens</i>	-		-		-		-		-		2	8,69	-	
<i>C. lipolytica</i>	-		2	11,11	1	4,76	-		-		1	4,35	-	
<i>C. pintolopesii</i>	1	5,26	-		-		-		-		-		-	
<i>C. coliicullosa</i>	-		-		-		-		-		1	4,35	-	
<i>K. marxianus</i>	1	5,26	1	5,55	5	23,81	2	11,76	2	9,09	-		-	
<i>K. lactis</i>	-		2	11,11	10	47,62	3	17,65	2	9,09	2	8,69	-	
<i>S. unisporus</i>	-		1	5,55	-		3	17,65	3	13,64	3	13,04	-	
<i>Tr. beigeli</i>	1	5,26	2	11,11	-		-		-		-		-	
Sin ident.	4	21,05	1	5,55	1	4,76	-		-		-	4,35	-	

Tabla II.- Asimilación de los azúcares por parte de las cepas de levaduras aisladas del queso de Armada, variedad Sobado.

Especie	ASIMILACIÓN DE:													
	GLC	LAC	GAL	MAL	SOR	TREA	XIL	CEL	L-ARA	SAC	RAFI	RIBI	NIT	L-LIS
<i>C. lambica</i>	58	0	0	0	0	0	58	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. krusei</i>	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. catenulata</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. ingens</i>	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. lipolytica</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. pintolopesii</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. coliicullosa</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	N.D.
<i>K. marxianus</i>	11	11	6	0	2	0	0	0	0	11	11	0	0	N.D.
<i>K. lactis</i>	19	19	19	16	15	9	1	2	1	18	17	1	0	N.D.
<i>S. unisporus</i>	10	0	10	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	10
<i>Tr. beigelii</i>	3	3	3	3	0	3	2	2	0	3	1 y 1?	0	0	N.D.

Tabla II (continuación).- Fermentación de los azúcares por parte de las cepas de levaduras aisladas del queso de Armada, variedad Sobado.

Especie	FERMENTACIÓN DE:					
	GLC	GAL	MAL	SAC	MEL	LAC
<i>C. lambica</i>	58	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	11	0	0	0	0	0
<i>C. catenulata</i>	1	1	1	0	0	0
<i>C. ingens</i>	0	0	0	0	0	0
<i>C. lipolytica</i>	0	0	0	0	0	0
<i>C. pintolopesii</i>	1	0	0	0	0	0
<i>C. collicullosa</i>	1	1	0	1	0	0
<i>K. marxianus</i>	11	0	0	11	0	11
<i>K. lactis</i>	19	19	19 (3↓)	18	0	19
<i>S. unisporus</i>	10	10	0	0	0	0
<i>Tr. beigelii</i>	0	0	0	0	0	0

Tabla III.- Caracteres morfológicos, culturales y sexuales de las cepas de levaduras aisladas del queso de Armada, variedad Sobado.

Especie	Gemación multipolar	Anillo superficial	Sedimento que se disuelve	Sedimento en grumos	Ascosporas	Células conjugantes → Ascas	Ascosporas (maduran fuera)	Pseudomicelio	Micelio verdadero	Crec. 20-25°C
<i>C. lambica</i>	58	58	0	0	0	0	0	58	0	58
<i>C. krusei</i>	11	11	0	0	0	0	0	11	0	11
<i>C. catenulata</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>C. ingens</i>	2	2	0	0	0	0	0	2	0	N.D.
<i>C. lipolytica</i>	4	4	0	0	0	0	0	0	0	N.D.
<i>C. pintolopesii</i>	1	1	0	0	0	0	0	*	0	N.D.
<i>C. collicullosa</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	N.D.
<i>K. marxianus</i>	11	0	11	0	11	0	0	0	0	N.D.
<i>K. lactis</i>	19	1	6	12	11	0	0	0	0	N.D.
<i>S. unisporus</i>	10	0	10	0	10	0	0	0	0	N.D.
<i>Tr. beigelii</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	3	N.D.

\* Forma un pseudomicelio rudimentario en agar maíz.

Tabla IV.- Características de interés tecnológico de las cepas de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

Especie	Crecimiento en:				Asimilación de:		Hidrólisis	Asimilación de las aminas:			
	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl	0,5% Lactosa	0,5% Lactato		TRIBUT	CADA	HISTA	PUTRE
<i>C. lambica</i> (58)	58	2 y 6*	0	0	2*	58	0	58	58	58	58
<i>C. krusei</i> (11)	11	11	2*	0	0	11	0	11	11	11	11
<i>C. catenulata</i> (1)	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
<i>C. ingens</i> (2)	2*	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2
<i>C. lipolytica</i> (4)	4	4	0	0	0	4	4	4	4	4	4
<i>C. pintolopesii</i> (1)	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
<i>C. collicullosa</i> (1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>K. marxianus</i> (11)	11	11 y 2*	4*	0	11	9 y 2*	0	9	4 y 7*	11	2 y 3*
<i>K. lactis</i> (19)	19	17 y 1*	12*	0	17	18	0	13	18	18	4
<i>S. unisporus</i> (10)	8 y 2*	6*	0	0	0	0	0	1*	1 y 3*	0	10
<i>Tr. beigeli</i> (3)	3*	0	0	0	3	0	3	3	3	3	3*

\* Crecimiento débil.

Los números entre paréntesis corresponden al número de cepas ensayadas de cada especie.



Al comparar los resultados de la identificación clásica con los obtenidos utilizando galerías API ATB 32C, el grado de coincidencia fue bastante satisfactorio (tabla V). Sin embargo este ejercicio nos ha permitido comprobar que un buen número de cepas no podrían haberse identificado correctamente haciendo únicamente uso de las galerías API, sin la ayuda de algunas pruebas convencionales, ya que a veces se hace imprescindible diferenciar entre el estado amorfo y el sexual.

\* De las 6 cepas identificadas por los métodos clásicos como *Candida lambica*, utilizando galerías API se identificaron 4 como *C. lambica* y 2 no se pudieron adscribir a especie.

\* 2 cepas identificadas por los métodos clásicos como *Kluyveromyces marxianus*, utilizando galerías API se identificaron como *Candida kefir* (anamorfo de *K. marxianus*).

\* De 7 cepas identificadas como *Kluyveromyces lactis* (métodos clásicos), 3 se identificaron por galerías API como *Candida sphaerica* (anamorfo de *K. lactis*) y 4 no pudieron ser identificadas.

\* 4 cepas identificadas por los métodos clásicos como *Saccharomyces unisporus* no fueron identificadas con los API (esta especie no figura en la base de datos del sistema ATB 32 C).

\* 3 cepas de *Trichosporon beigeli* (métodos clásicos) no pudieron ser identificadas haciendo uso de las galerías API.

\* 3 cepas identificadas como *Candida krusei* (métodos clásicos), por medio de galerías API se adscribieron a la misma especie.

\* 2 cepas identificadas como *Candida ingens* (métodos clásicos) por medio de los API se identificaron como *Zygosaccharomyces* spp. Estas cepas se habían considerado *C. ingens* en base a la característica principal de no realizar ninguna fermentación y esta característica la diferenciaba de *Zygosaccharomyces*. En los API no se contemplan pruebas asimilatorias de azúcares en ausencia de oxígeno.

\* 1 cepa identificada como *Candida catenulata* (métodos clásicos), con galerías API se adscribió a la misma especie.

\* 1 cepa identificada como *Candida pintolopesii* (métodos clásicos) se identificó a través de las galerías API como *C. lambica*. Esta cepa se mantuvo en duda entre ambas especies pero finalmente se adscribió a la especie *C. pintolopesii* debido al tipo de pseudomicelio que formaba.

---

\* 1 cepa se identificó como *Candida collicullosa* por los métodos clásicos y las galerías API.

4 cepas de *Candida inconspicua* identificadas por los métodos clásicos se identificaron con las galerías API como *Candida lipolytica*. Estas cepas inicialmente se habían considerado pertenecientes al género *Torulopsis* y se identificaron como *Torulopsis inconspicua* (*Candida inconspicua*) ya que entre otras características no formaban micelio en agar morfológico ni en agar maíz, sólo se podía apreciar en una cepa la formación de una cadena alargada de células que podría representar un pseudomicelio rudimentario mientras *Candida* por lo general forma pseudomicelio. Si se consideran pertenecientes al género *Candida*, utilizando los métodos convencionales se identificarían también como *C. lipolytica*. Además se sabe que aunque *C. lipolytica* normalmente produce pseudohifas, en algún aislamiento realizado en Industrias de Alimentos no llegaba a formarlas. Este hecho, junto con la característica de las cepas de crecer en presencia de cicloheximida al 100 y 1000 ppm, carácter que no presenta *C. inconspicua*, nos llevó a incluir finalmente estas cepas en la especie *C. lipolytica*.

Tabla V.- Relación entre los resultados de la identificación de levaduras obtenidos utilizando métodos clásicos y galerías API ATB 32C.

Nº de cepas	Métodos clásicos	Nº de cepas	API ATB 32C
4	<i>Candida inconspicua</i>	4	<i>Candida lipolytica</i>
1	<i>Candida collicullosa</i>	1	<i>Candida collicullosa</i>
1	<i>Candida catenulata</i>	1	<i>Candida catenulata</i>
1	<i>Candida pintolopesii</i>	1	<i>Candida lambica</i>
2	<i>Candida ingens</i>	2	<i>Zygosaccharomyces</i> sp.
6	<i>Candida lambica</i>	4	<i>Candida lambica</i>
		2	Sin identificar
2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2	<i>Candida kefyri</i>
7	<i>Kluyveromyces lactis</i>	3	<i>Candida sphaerica</i>
		4	Sin identificar
4	<i>Saccharomyces unisporus</i>	4	Sin identificar
3	<i>Trichosporon beigeli</i>	3	Sin identificar
3	<i>Candida krusei</i>	3	<i>Candida krusei</i>

#### 4.- DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos aislado *Candida lambica* en altas proporciones en leche, cuajada y a lo largo de la maduración, lo que indica que podría adaptarse bien a las condiciones de Aw, pH y concentración de sal de este queso y que es altamente competitiva.

Baroiller y Schmidt (1990) aislaron levaduras anascosporógenas en altas proporciones a partir de explotaciones agrícolas (ensilados, heces, agua, suelo,...) siendo particularmente importante *C. lambica*. Estos autores no aislan esta especie en leche ni durante la maduración de los quesos, la consideran como flora "contaminante" que en el queso se vería desplazada por otras especies mejor adaptadas a este alimento como *Kluyveromyces lactis* y su forma asexual *Candida sphaerica*.

En la evolución de *C. lambica* a lo largo de la maduración del queso de Armada sólo se observa un ligero descenso en queso de 1 semana donde predominan *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* y en queso de 16 semanas donde está escasamente representada y se ve superada por *Candida krusei*, si bien se observa también la ausencia de otras especies.

Es inusual aislar a partir de quesos *C. lambica* como especie mayoritaria aunque sí se suele encontrar en porcentajes elevados en muchos estudios. *C. lambica* se aisló también de quesos franceses de cabra (Nahabieh y Schmidt, 1990) como el Crottin de Chavignol y el Pouligny Saint-Pierre aunque no en niveles importantes. El género *Candida* se aisló en estos quesos en porcentajes del 60% del total de la flora (Nahabieh y Schmidt, 1990). En nuestro estudio este género representó el 61% del total de levaduras aisladas.

Otras especies del género *Candida* aisladas en el queso de Armada fueron *C. krusei*, *C. pintolopesii* y *C. lipolytica*. *C. krusei* fue también aislada por Deiana y col. (1977) en quesos de cabra de diversas localidades de Cerdeña y por Cooke y Brazis (1968) a partir de leche cruda, leche pasteurizada y diversos productos lácteos, entre ellos queso. Nahabieh y Schmidt (1990) aislaron también *C. pintolopesii* en queso de cabra en un porcentaje del 15%, si bien estos autores señalan su presencia como inusual. *C. lipolytica* puede jugar un papel importante en el desarrollo del aroma del queso al aumentar el contenido en ácidos grasos volátiles (Devoyod y Sponem, 1970; Parmelee y Nelson, 1949). Nahabieh y Schmidt (1990) aislaron esta especie en quesos franceses de cabra en su forma sexual y asexual en proporciones del 13% de los aislamientos, siendo la especie dominante en el Crottin de Chavignol durante la 1ª fase de la maduración.

En general se puede observar que a lo largo de la maduración predominaron las levaduras anascosporógenas del género *Candida*, hecho que ya señalaron en otros estudios autores como Devoyod y Sponem (1970).

*Kluyveromyces lactis* se aisló en porcentajes importantes a la semana de maduración representando aproximadamente el 48% de las levaduras aisladas en este punto de muestreo. Esta especie constituyó aproximadamente el 15% del total de levaduras aisladas. Nahabieh y Schmidt (1990) aislaron *K. lactis*/*C. sphaerica* como dominante en algunas etapas de la maduración de los quesos, normalmente en las etapas iniciales en las que puede multiplicarse activamente ya que es una especie con capacidad para asimilar y fermentar la lactosa además de poder metabolizar el ácido láctico; esta especie ha sido también aislada de los quesos Roquefort (Devoyod y Sponem, 1970), Mahón (Suárez e Íñigo, 1982), Cabrales (Núñez y col., 1981), Saint-Nectaire (Vergeade y col., 1976), Kopanisti (Kaminarides y Anifantakis, 1989), Telémé (Georgantas, 1979) y Cantal (Millet y col., 1974).

Baroiller y Schmidt (1990) no la aislaron de ensilados, agua, alimentos o heces, en su forma perfecta o imperfecta, sin embargo es una especie muy comúnmente encontrada en quesos; estos autores lo explican considerando que en realidad dicha especie está bien representada en los ambientes mencionados pero se ve dominada por otras especies mayoritarias como *C. lambica*.

*K. lactis* tiene capacidad para asimilar y fermentar la lactosa por lo que parece tener un papel importante en el desarrollo del sabor y aroma del queso. A partir de la lactosa se forma etanol y CO<sub>2</sub> y a partir del etanol pueden originarse ésteres de ácidos grasos que contribuyen al desarrollo del sabor y el aroma.

Además algunos autores (Devoyod y Sponem, 1970) asignan a esta especie la capacidad de poder actuar sobre *Penicillium roqueforti* estimulándole en la producción de metilcetonas. Georgantas (1979) le asigna también un efecto estimulante de la producción de ácido por parte de los lactococos.

18 de las 19 cepas de *K. lactis* aisladas por nosotros presentaron también capacidad asimilatoria del ácido láctico.

*Kluyveromyces marxianus* representó el 9% del total de aislamientos siendo más notable su presencia a la semana de maduración. Esta especie se ha aislado en porcentajes importantes en el queso Pouligny-Saint-Pierre, representando la única levadura ascospórogena presente en proporciones significativas en los primeros estadíos de la maduración (Nahabieh y Schmidt, 1990). En el Chevrotin des Aravis, *K. marxianus* y su forma asexual *C. kefyri* representan un porcentaje no despreciable del total de la flora (el 13%), en el Sainte-Maure, en cambio, se observó una ausencia total de esta especie. Según Nahabieh y Schmidt (1990) esta levadura (en su forma sexual y asexual) representa el 5% del total de aislamientos de levaduras realizados en los quesos franceses de cabra estudiados por ellos.

La especie *K. marxianus* (Barnett y col., 1990) se corresponde con las especies *K. bulgaricus* y *K. wikenii* descritas por Lodder (1970) y con las variedades *K. marxianus* var.

---

*bulgaricus* y var. *wikenii* de Kreger-van Rij (1984). Esta especie tiene capacidad de asimilación de la lactosa y también de ácido láctico.

*Saccharomyces unisporus* fue la única especie identificada del género *Saccharomyces* y supuso el 7% del total de levaduras identificadas. Esta especie fue también aislada por Núñez y col. (1981) en el estudio del queso de Cabrales en proporciones del 3%. Las especies de este género que han sido aisladas más frecuentemente de leche y productos lácteos son *S. fragilis* y *S. cerevisiae* (Devoyod y Sponem, 1970; Schmidt y Lenoir, 1978, 1980). Sin embargo hay que tener en cuenta que actualmente *S. fragilis* se corresponde con la especie *K. marxianus*. Nahabieh y Schmidt (1990) aislan tanto *S. cerevisiae* como su forma asexual *C. robusta* en un porcentaje del 14,5% en quesos de cabra franceses. Otros autores como Baroiller y Schmidt (1990), estudiando el queso Camembert a lo largo de la maduración sólo aislaron cepas de la especie *S. cerevisiae* y en una proporción muy baja (3% de los aislamientos).

*Trichosporon beigelii* es una especie que procede siempre de contaminaciones. En nuestro estudio representó sólo el 2% de los aislamientos. Núñez y col. (1981) la aislaron en leche en el estudio del queso de Cabrales. En algunos quesos llega a constituir una especie mayoritaria, por ejemplo, en el queso Damietta, Ghoniem (1968) aisló este género en el 44% de los casos. Nahabieh y Schmidt (1990) aislaron *Tr. beigelii* aproximadamente en la misma proporción que nosotros.

Sólo las cepas de *K. lactis* y *K. marxianus* fueron capaces de asimilar y fermentar la lactosa lo que de acuerdo con Cooke y Brazis (1968) nos llevaría a considerar que la mayoría de las especies de la población de levaduras serían contaminantes casuales antes que flora "propia" de la leche y el queso.

Posiblemente las cepas de *K. marxianus* y *K. lactis* contribuyan junto con las bacterias lácticas a la degradación de la lactosa. Aunque no predominan las especies con capacidad para metabolizar la lactosa, en queso de 1 semana son precisamente *K. lactis* y *K. marxianus* las que presentan valores más altos, considerando además que se aislan de la dilución  $10^{-4}$ .

*K. marxianus*, *K. lactis*, *C. krusei* y *C. lambica* mostraron capacidad de asimilación del ácido láctico. Estas especies podrían participar activamente en el consumo de ácido láctico y ser las responsables del descenso de los contenidos en ácidos D y L-láctico observado a partir de la primera semana de maduración (Fresno, 1994).

Las levaduras aisladas del queso de Armada no parecen tener gran participación en la hidrólisis lipídica. De todas las cepas aisladas, sólo 9 han presentado esa actividad: 2 cepas de *C. ingens*, 4 de *C. lipolytica* y 3 de *Tr. beigelii*.

Podemos concluir que la flora de levadura dominante en este queso está constituida por especies del género *Candida*, sobre todo *C. lambica* y *C. krusei* (levaduras anascosporógenas). Como levaduras esporógenas están presentes las especies *K. lactis*, *K. marxianus* y *S. unisporus*. Nahabieh y Schmidt (1990) aislaron de quesos franceses de cabra las mismas especies del género *Candida* (*C. lipolytica* y *C. lambica*) que constituyen la flora dominante y como representantes de las levaduras ascosporógenas *K. marxianus* var. *lactis* (= *K. lactis*) y *K. bulgaricus* (= *K. marxianus*).

Los resultados de identificación utilizando galerías ATB 32 C no coinciden estrictamente con el veredicto de los métodos clásicos. Esto es debido sin lugar a dudas a que las galerías API están adaptadas a la identificación de levaduras de origen clínico y no incluyen algunas pruebas de capital importancia para la identificación de levaduras de origen alimentario. Nuestros resultados en este sentido prueban una vez más la importancia de las pruebas morfológicas para hacer una identificación fiable. Sin embargo, como ya indicaron otros autores (Rohm y col., 1990), las galerías API pueden tener aplicación en combinación con los métodos clásicos.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

**BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. y YARROW, D.** (1979). A Guide to Identifying and Classifying Yeasts. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

**BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. and YARROW, D.** (1990). *Yeasts: characteristics and identification*, 2nd. Cambridge University Press. Cambridge.

**BAROILLER, C. Y SCHMIDT, J.L.** (1984). Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures présentes dans les fromages. *Lait*, 64:16-28.

**BAROILLER, C. y SCHMIDT, J.L.** (1990). Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Lait* 70, 67-84.

**BESANÇON, X., SMET, C., CHABALIER, C., RIVEMALE, M., REVERBEL, J.P., RATOMAHENINA, R. y GALZY, P.** (1992). Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 17:9-18.

**CHRISTENSEN, W.B.** (1946). *J. Bacteriol.*, 52:461. Citado por Lodder (1970) en "The yeasts", pg. 97.

**COOKE, W.B. y BRAZIS, A.R.** (1968). Occurrence of molds and yeasts in dairy products. *Mycopath. Mycol. Appl.* 35, 281-289.

---

**DEIANA, P., FATICHENTI, F. y FARRIS, G.A.** (1977). Indagini microbiologiche su latte e sul formaggio di capra in Sardegna. Nota I: I lieviti. *L'Industria del Latte*, 13:49-56.

**DEVOYOD, J.J., SPONEM, D.** (1970). La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Lait*, 50:524-543.

**GALZIN, M., GALZY, P. y BRET, G.** (1970). Étude de la flore de levure dans le fromage de Roquefort. *Lait*, 50:1-37.

**GEORGANTAS, St.** (1979). The blastomycetic flora during the ripening of Télémés cheese. *Milchwissenschaft*, 34:24-27.

**GHONIEM, N.A.** (1968). Incidence of yeasts other than *Candida* species in Damietta cheese. *Milchwissenschaft*, 23:482-483.

**KAMINARIDES, S.E. y ANIFANTAKIS, E.M.** (1989). Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening. Study of the yeast flora. *Lait*, 69:537-546.

**KREGER-VAN RIJ, N.J.W.** (1984). *The yeasts, a taxonomic study*. 3rd ed. Elsevier Science Publishers. Amsterdam:

**LODDER, J. y KREGER-VAN RIJ, N.J.W.** (1952). *The yeasts, a taxonomic study*. John Wiley & Sons. New York. Citado por Lodder (1970) en "The yeasts", pg. 47.

**LODDER, J.** (1970). *The yeasts: a taxonomic study*. 2 nd ed. North-Holland Publishing Company. Amsterdam - London.

**McCLUNG, L.S.** (1943). On the staining of yeast spores. *Science* 98, 159-160.

**MILLET, L., MELCION, D. y DEVOYOD, J.J.** (1974). La flore microbienne du fromage de Camembert fabriqué à partir de lait cru. III. Rôle des levures dans la maturation de la "tome". *Lait*, 54:616-626.

**NAHABIEH, F. y SCHMIDT, J.L.** (1990). Contribution à l'étude de la flore levure de quelques grands types de fromages de chèvre. *Lait*, 70:325-343.

**NÚÑEZ, M., MEDINA, M., GAYA, P. y DIAZ-AMADO, C.** (1981). Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. *Lait* 61, 62-79.

**PARMELEE, C.E. y NELSON, F.E.** (1949). The use of *C. lipolytica* cultures in the manufacture of blue cheese from pasteurized homogenized milk. *J. Dairy Sci.* 32, 993-1000.

---

**RHOM, H., ELISKASES-LECHNER, F. Y LEHNER, M.** (1990). Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 215-224.

**RHOM, H., ELISKASES-LECHNER, F. y BRÄUER, M.** (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 370-376.

**SCHMIDT, J.L. y LENOIR, J.** (1978). Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son évolution au cours de la maturation. *Lait* 58:355-370.

**SCHMIDT, J.L. y LENOIR, J.** (1980). Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert (II). *Lait*, 60:272-282.

**SKINNER, F.A, PASSMORE, S.M. y DAVENPORT, R.R.** (1980). *Biology and activities of yeasts*, Academic Press, London.

**SUÁREZ, J.A. E IÑIGO, B.** (1982). Contribution to study of Mahon cheese II. Yeast microflora. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 7, 173-175.

**VADILLO, S.** (1987). Mycoflora of milk after several types of pasteurization. *Lait* 67, 265-273.

**VERGEADE, J., GUIRAUD, J., LARPENT, J.P. y GALZY, P.** (1976). Étude de la flore de levure du Saint-Nectaire. *Lait* 56, 275-285.

**VIVIER, D., RIVEMALE, M., REVERBEL, J.P., RATOMAHENINA, R. y GALZY, P.** (1994). Study of the growth of yeasts from Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 207-215.

**WICKERHAM, L.J.** (1946). A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. *J. Bacteriol.*, 52:293-301. Citado por Lodder (1970), en "The yeasts", pg. 88.

**WICKERHAM, L.J.** (1951a y b). Taxonomy of yeasts. *Tech. Bull.* No. 1029, V.S. Dept. Agric. Washington, D.C., citado por Lodder (1970) en "The yeasts", pg. 72 (a), 90 (b).

**WIRTZ-SCHAEFFER, A.B. y FULTON, M.** (1933). *Science*, 77:194. Citado por Mc Clung (1943).

---



# **CAPÍTULO VII. ESTUDIO DE LOS MOHOS AISLADOS DURANTE LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO DE ARMADA**

## **1.- INTRODUCCION.**

### **1.1.- PAPEL DE LOS MOHOS EN LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS. ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y LIPOLITICA.**

Las enzimas proteolíticas y lipolíticas de los mohos intervienen en la maduración de los quesos. Varios autores han estudiado los sistemas proteolítico y lipolítico de *Penicillium roqueforti*.

Tanto el micelio de *P. roqueforti* como sus esporas poseen enzimas que intervienen en el proceso de maduración de los quesos (Hawke, 1966). En los quesos azules la actividad proteolítica se puede deber en parte a los microorganismos que constituyen el cultivo iniciador y a la renina pero sobre todo a los enzimas de *P. roqueforti* (Kinsella y Hwang, 1976).

Su sistema proteolítico actúa sobre un amplio espectro de proteínas incluídas las  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas.

*P. roqueforti* posee una proteasa intracelular que está sujeta a represión por la presencia de aminoácidos en el medio (Bolcato y col., 1973), y cuya actividad está en el rango de pH de 3 a 6 (Kinsella y Hwang, 1976), y otra extracelular cuya actividad tiende a incrementarse con la presencia de aminoácidos en el medio (Bolcato y col., 1973) y cuyo pH óptimo está entre 5 y 6, aunque también tiene actividad a pH 4,5 a 7 (Kinsella y Hwang, 1976).

Las proteinasas extracelulares de *P. roqueforti* (ácida y neutra) actúan sinérgicamente con las proteinasas y peptidasas del estarter (Desmazeaud y col., 1976; Gripon y col., 1977).

---

Estas proteinasas liberan péptidos con P.M. > 1000, que serán hidrolizados por las bacterias lácticas a péptidos más pequeños y aminoácidos.

*P. roqueforti* también produce amino y carboxipeptidasas intra y extra celulares (Paquet y Gripon, 1980).

El contenido en sal actúa controlando la proteólisis en los quesos madurados por mohos (Kinsella y Hwang, 1976). La proteasa extracelular se ve inhibida por el NaCl, mientras el CaCl<sub>2</sub> tiende a estimularla (Gripon y Hermier, 1974).

La proteólisis es necesaria para el desarrollo de una textura apropiada y del sabor. Los aminoácidos son precursores de aldehídos, metilcetonas, alcoholes y ésteres y son estimulantes de la germinación de las esporas fúngicas (Kinsella y Hwang, 1976). A su vez se pueden producir desaminaciones de aminoácidos, siendo importante en este sentido la presencia de cepas del género *Geotrichum* (Hemme y col., 1982), el amoníaco liberado contribuye igualmente a la formación del aroma.

Niki y col. (1966) han observado que cepas de *P. roqueforti* con elevada actividad proteolítica poseen baja actividad lipolítica y viceversa y que son las cepas con menor actividad proteolítica y mayor actividad lipolítica las que parecen producir quesos de mejor calidad en periodos más cortos.

Los aromas generados en la **lipolisis** son posiblemente los más determinantes en el desarrollo del sabor de los quesos azules (Kinsella y Hwang, 1976). Los ácidos grasos libres son compuestos con sabor por sí mismos y también son precursores de metilcetonas. En ausencia de una lipolisis adecuada, el sabor del queso es pobre o se desarrolla ligeramente (Morris y col., 1963).

El sistema lipolítico de *P. roqueforti* también ha sido estudiado y es muy importante ya que la manufactura de un queso azul de calidad depende principalmente del metabolismo lipídico en el queso. Los triglicéridos son progresivamente hidrolizados a monoglicéridos y ácidos grasos libres y los ácidos grasos son parcialmente oxidados, originando sobre todo metilcetonas (Gehrig y Knight, 1963; Parks y col., 1964).

La hidrólisis lipídica depende de varios factores: la actividad lipasa de los mohos, la actividad lipolítica residual de la leche (que se destruye con la pasterización), microorganismos que constituyen el cultivo iniciador, eficiencia de la homogeneización de la leche (que al romper la membrana que rodea a los lípidos facilita el acceso de éstos a las lipasas), el pH, la temperatura y la concentración de NaCl.

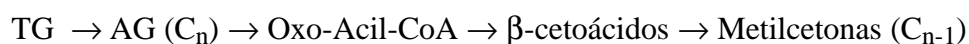
*P. roqueforti* produce dos lipasas pero sólo la enzima ácida tiene un papel significativo en la maduración del queso (citado por Law, B.A., 1984-congreso). La lipasa de *P. roqueforti* parece tener gran importancia en el desarrollo de sabor del queso azul.

En general las condiciones óptimas para la producción de esta lipasa coinciden con las de maduración de los quesos azules (Kinsella y Hwang, 1976). En la producción de esta lipasa influyen varios factores: la lactosa, glucosa o galactosa inhiben su producción y la adición de grasa de la mantequilla la activa (Kataoka-1963).

La temperatura óptima para la lipasa de *P. roqueforti* está entre 30 y 35°C (Morris y Jezeski, 1973; Shipe, 1951) o incluso 37°C para algunas cepas (Eitenmiller y col., 1970), siendo función también de otras condiciones de crecimiento. El sistema lipasa del moho se mantiene bastante activo a baja temperatura (10°C) (Kinsella y Hwang, 1976).

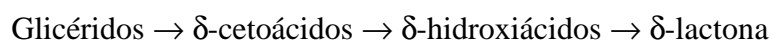
Los mohos tienen capacidad para oxidar los ácidos grasos a metilcetonas y CO<sub>2</sub>. Diversos estudios indican que los ácidos grasos libres son tóxicos para el micelio y en elevada cantidad podrían inhibir la formación de metilcetonas (Kinsella y Hwang, 1976). Como en el queso los ácidos grasos se encuentran más bien asociados con la fase lipídica (se solubilizan en la grasa de la leche) sin entrar en contacto con el moho, es posible que la actividad lipasa del moho oxide los ácidos grasos a metilcetonas y CO<sub>2</sub> (Kinsella y Hwang, 1976).

La ruta metabólica para la formación de metilcetonas por el micelio y las esporas de *P. roqueforti* es la siguiente (Law, 1984):



$$n=6,8,10 \text{ ó } 12$$

Las  $\delta$ -lactonas también contribuyen al desarrollo del aroma del queso (Wong y col., 1973). Boldingh y Taylor (1962) citan ejemplos de mohos y levaduras que producen lactonas por la vía:



## 1.2.- IMPORTANCIA DE LOS MOHOS Y SUS TOXINAS EN EL QUESO.

Las especies de mohos empleadas en la elaboración de determinados alimentos son muy limitadas y están representadas exclusivamente por especies del género *Penicillium*: *P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. nalgiovense* y *P. chrysogenum*.

Los mohos del género *Penicillium* son muy empleados (al menos en Europa, EEUU y Canadá) en la elaboración de queso, salchichas, jamón crudo curado y embutidos (Leistner, 1986).

Entre los quesos elaborados con *P. roqueforti* se encuentran el Roquefort (Francia), Gorgonzola (Italia), Stilton (Gran Bretaña), Danish Blue (Dinamarca), Blanschimmelkäse (Suíza), Tulum (Turkía). Entre los que emplean como cultivo iniciador *P. camemberti* (= *P. caseicolum* = *P. candidum*) destacan el Camembert, Brie y otros quesos de moho blanco. También son frecuentes los quesos elaborados con *P. camemberti* en la superficie y *P. roqueforti* en el interior, por ejemplo el queso Bayrisch Blau de Alemania.

Las cepas de *Penicillium* seleccionadas en Industria Alimentaria no deben ser toxigénicas lo que resulta difícil ya que en estudios realizados por Leistner (1986) el 75% de las cepas de *Penicillium* aisladas de alimentos eran toxigénicas y la mayoría de las cepas de *P. roqueforti* producen alguna micotoxina. Sin embargo, esto no es muy problemático ya que aunque el queso es un excelente sustrato para el crecimiento de los mohos no lo es para la producción de micotoxinas (Bullerman, 1981). Aún teniendo en cuenta esto se prefieren como cultivos iniciadores aquellas cepas que no producen ninguna toxina, al menos conocida y por ello en las cepas comerciales de *P. roqueforti* no se aprecia producción de micotoxinas como patulina, ácido penicílico y citrinina (Bullerman, 1981).

El crecimiento incontrolado de mohos debe también ser evitado porque en estudios futuros se puede poner de manifiesto la presencia de alguna otra toxina hasta ahora desconocida (Aran y Eke, 1987).

Debido a que la producción de micotoxinas es un aspecto muy importante en los mohos utilizados en Tecnología de los Alimentos es necesario hacer alguna consideración a este respecto:

Entre las toxinas que puede producir *P. roqueforti* se encuentra la PR-toxina, roquefortina A, C, etc. *P. camemberti* produce ácido ciclopiazónico.

La PR-toxina posee gran toxicidad. También son bastante tóxicas otras como la patulina y el ácido penicílico (sin embargo estas micotoxinas o bien no son producidas en el queso o bien son inestables).

El Dairouty y col. (1990) examinaron muestras de queso Roquefort comprobando que en ninguna se detectaba la presencia de PR-toxina. Sin embargo el 16,6% de los aislamientos de *P. roqueforti* producían esta toxina cuando se cultivaban en medios artificiales.

Los reducidos niveles de micotoxinas detectados en el queso con respecto a cereales puede ser debida a que ciertas micotoxinas son menos estables en productos con elevado contenido proteico y bajo en carbohidratos como queso y productos cárnicos (Lieu y Bullerman, 1977). Este fenómeno se atribuye a la combinación de las toxinas con aminoácidos y compuestos que contienen grupos sulfhidrilo, reduciendo así su actividad biológica (Bullerman, 1981). Algunas toxinas como la patulina, el ácido penicílico y la PR-

---

toxina se vuelven químicamente indetectables en el queso. La PR-toxina se combina con compuestos amino como la glutatona y la cisteína (Nakamura y col., 1977), esta toxina reacciona también con las sales de amonio y con el amoniaco originando PR-iminas que son productos inactivos y no tienen acción biológica (Scott y Kanhere, 1979).

Según Northolt, y col. (1979), los niveles de determinadas micotoxinas en el queso se deben no sólo a su inestabilidad sino también a que son producidas en cantidades insignificantes. Micotoxinas como la roquefortina (de toxicidad ligera), isofumigaclavina A y ácido micofenólico (de toxicidad muy ligera) se producen en el queso únicamente en cantidades de ppm (Scott, 1981).

Para evitar la ingestión de determinadas micotoxinas como el ácido ciclopiazónico, que es medianamente tóxico, basta eliminar la corteza del queso ya que al ser una sustancia poco soluble su localización se limita a la corteza. Además esta micotoxina sólo es producida en cantidades importantes a altas temperaturas, no a las temperaturas de refrigeración.

A pesar de que la presencia de micotoxinas en determinados alimentos es apenas detectable, cuando los mohos son aislados y cultivados en medios de laboratorio apropiados, la mayoría de ellos presentan capacidad de producir micotoxinas.

El crecimiento y esporulación de un cultivo fúngico no necesariamente va seguido de la producción de micotoxinas ya que aunque muchos sustratos son buenos para el crecimiento no lo son para la producción de estos metabolitos.

El mejor medio para la producción de toxinas depende de la especie y a veces también de la cepa. En general la producción óptima de micotoxinas ocurre después de 14 días de incubación a 25°C en medios como YES (Yeast extract sucrose) agar, OA (Oatmeal agar) o CYA (Czapek yeast extract agar) (Leistner, 1986).

Como hemos visto anteriormente el queso es un sustrato excelente para el crecimiento de los mohos pudiendo desarrollarse tanto durante el proceso de maduración como de conservación a refrigeración. La mayoría de los mohos que se aíslan pertenecen al género *Penicillium*. Dentro de este género algunas especies como *P. commune*, *P. solitum*, *P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum* o *P. verrucosum* son difíciles de separar en base sólo a criterios morfológicos por lo que se hace necesaria la utilización de tests fisiológicos (entre los que se encuentra la producción de metabolitos secundarios) (Frisvad, 1988).

En la utilización de micotoxinas como ayuda a la identificación hay que tener en cuenta que, una toxina determinada no siempre es producida por todos los aislamientos de una misma especie y diferentes especies pueden producir la misma toxina (Leistner, 1986), siendo

---

igualmente importante detectar al menos tres metabolitos secundarios diferentes para aplicar criterios de identificación (Frisvad y Filtenborg, 1983).

Taniwaki y van Dender (1992) determinaron micotoxinas en muestras de queso Prato (una variedad de quesos brasileños) y no detectaron ninguna de las micotoxinas conocidas después de 20 días de incubación a 25°C, aunque el crecimiento de los mohos era considerable. Posiblemente las muestras contenían exclusivamente cepas de *Penicillium* incapaces de producir las micotoxinas testadas o, si eran producidas, no eran estables en el queso. Todas las variedades de queso brasileño examinadas (Prato, Parmesan, queso procesado) tenían valores elevados de actividad de agua lo que favorece el crecimiento de muchos mohos, sin embargo el queso no parece ser un buen sustrato para la producción de patulina aunque haya elevada Aw pues como vimos anteriormente algunas micotoxinas (patulina, ácido penicílico (Leistner, 1986), citrinina (Scott, 1980) y PR-toxina (Leistner, 1986) no son estables en el queso. Además la difusión de metabolitos en quesos madurados es baja (Bullerman, 1981).

### **1.3.- FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LOS MOHOS Y A LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.**

#### **1.3.1.- CONDICIONES DE DESARROLLO DE LOS MOHOS.**

- Temperatura: Los mohos y concretamente los del género *Penicillium* se incluyen en el grupo de los microorganismos mesófilos. El óptimo de crecimiento se encuentra hacia los 20-25°C. Algunos crecen también a temperaturas de refrigeración, pero por lo general no pueden desarrollarse por encima de 35°C, aunque existen algunas especies termófilas (Smith, 1963). La capacidad para crecer a 37°C se ha empleado a veces como criterio taxonómico. *P. viridicatum* tiene una temperatura óptima de crecimiento próxima a 36°C, *P. citrinum* y *P. chrysogenum* pueden presentar crecimiento a 37°C pero no es un carácter muy estable (Frisvad, 1981), en cambio la temperatura máxima de crecimiento para *P. aurantiogriseum* está próxima a 30°C.

- Disponibilidad de oxígeno: En general, todos los mohos necesitan oxígeno para su desarrollo, aunque algunos parecen reabsorber parte del CO<sub>2</sub> producido en la respiración y lo aprovechan para formar (a partir también de productos residuales de la glucosa) productos metabólicos (Smith, 1963).

Algunos mohos pueden desarrollarse en presencia de CO<sub>2</sub> y en ausencia completa de O<sub>2</sub> (Escoula y Le Bars, 1973). Según Veau y col. (1981) el aporte de CO<sub>2</sub> estimula ligeramente a *P. roqueforti*, en cambio sobre *P. verrucosum* var. *cyclopium* tiene reacción inversa. Por otro lado *P. roqueforti*, al igual que *P. cyclopium* toleran bien una atmósfera

---

pobre en O<sub>2</sub> (con aproximadamente un 5% de O<sub>2</sub>) (Moreau, 1980; Veau y col, 1981). *P. roqueforti* tolera bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y altas de CO<sub>2</sub> y aunque el crecimiento del micelio se retarda en estas condiciones, puede verse favorecido frente a otros mohos competidores (Kinsella y Hwang, 1976). Concentraciones altas de O<sub>2</sub> pueden ser perjudiciales para algunas especies, así niveles de O<sub>2</sub> del 100% inhiben a *P. roqueforti* (más bien microaerófilo) aunque no a *P. cyclopium* (que es muy aerófilo), una concentración de O<sub>2</sub> del 10% es la más favorable para el cultivo de las dos especies (Veau y col.,1981).

- Acidez: Muchas especies de *Penicillium* crecen mejor en un sustrato ácido (Raper y Thom, 1968). Hay especies que toleran mejor las variaciones del pH que otras, por ejemplo *P. roqueforti* tiene gran capacidad de adaptación a pH ácidos y la mayoría de las cepas de esta especie se desarrollan en un pH entre 3 y 10,5, siendo buena la producción de micelio en un margen de 4,5 a 7,5 (Jacquet y col., 1957), además pueden crecer con 0,2% de ácido propiónico (pH 4,5) y 4% de ácido láctico (pH 2,0). Esta capacidad de adaptación a pH ácidos les permite también crecer en presencia de fungicidas como el ácido acético (Engel y Teuber, 1978).

- Efecto de los fungicidas: Los mecanismos de acción de los agentes antifúngicos pueden estar basados (De Boer, 1988) en:

- a) Destrucción de la pared celular o membrana celular.
- b) Inhibición de varios sistemas enzimáticos.
- c) Destrucción de la estructura genética del protoplasto.

Algunos ácidos orgánicos actúan como agentes antimicrobianos debido a su efecto de reducir el pH (De Boer, 1988). Para muchos agentes antimicrobianos el pH al que se disocia el 50% del ácido oscila entre los valores de 3 y 5. Cuando el pH desciende la concentración de ácido no disociado se incrementa aumentando así su actividad antimicrobiana (Dziezak, 1986).

El ácido acético y sus sales tienen acción antimicrobiana hasta pH 4,5 (Dziezak, 1986). Aunque la forma no disociada del ácido acético tiene acción antimicrobiana es principalmente el ión hidrógeno y el descenso resultante del pH lo que inhibe a estos microorganismos (Levine y Fillers, 1939).

Los ácidos sórbico, benzoico y propiónico muestran actividad antimicrobiana cuando se encuentran en forma no disociada y, por tanto su acción es también dependiente del pH (Liewen y Marth, 1985). El porcentaje de ácido no disociado se incrementa con el descenso del pH, siendo por tanto activos a pH bajo (De Boer, 1988).

El ácido benzoico tiene actividad máxima en el rango de pH de 2,5 a 4,0 ó 4,5, el pH máximo límite para su actividad es 4,0-4,5 (Liewen y Marth, 1985) (Dziezak, 1986). La sal sódica del ácido benzoico es más soluble y generalmente más empleada (Dziezak, 1986).

El ácido propiónico al ser un líquido muy corrosivo se suele emplear menos que sus sales de sodio y de calcio en la industria alimentaria. El pH límite para su actividad está entre 5 y 5,5 (Dziezak, 1986, Liewen y Marth, 1985).

El ácido sórbico junto con el sorbato potásico es más efectivo frente a mohos y levaduras que frente a bacterias (Dziezak, 1986). El pH límite para su actividad es de 6 a 6,5 (Dziezak, 1986) (Liewen y Marth, 1985). Se emplean varios agentes antimicrobianos junto con el ácido sórbico para intensificar su acción antimicrobiana. El sorbato es muy usado para inhibir el crecimiento de mohos en quesos (Liewen y Marth, 1985). Liewen y Marth (1984) examinaron varias cepas de *Penicillium* y *Aspergillus* en relación con su capacidad para crecer en presencia de sorbato y observaron que sólo los mohos del género *Penicillium*, aislados de quesos tratados con sorbatos eran capaces de crecer en presencia de un porcentaje igual o superior a 0,3% (3000 ppm) de sorbato potásico (niveles permitidos por la Federal Standard of Identifity) y ninguno de los *Aspergillus* examinados crecían en presencia de más del 0,1% (1000 ppm) de sorbato. Los mohos del género *Aspergillus* son generalmente más sensibles al sorbato que los del *Penicillium* ya que algunos mohos del género *Penicillium* pueden degradar el sorbato a 1,3 pentadieno (un compuesto volátil de muy fuerte olor) a través de una reacción de descarboxilación (Marth y col., 1966).

- Concentración de NaCl: El crecimiento de los mohos es también parcialmente controlado por la concentración de NaCl en el queso (Kinsella y Hwand, 1976). Por ejemplo *P. roqueforti* crece más rápidamente con un porcentaje de sal del 1 al 3% (Godinho y Fox, 1981 a y b).

### 1.3.2.- CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

La  $A_w$  y la temperatura son los dos factores más importantes que afectan a la producción de micotoxinas.

Con respecto a la **temperatura** en general se considera que hay un amplio margen de temperatura en el que las especies de *Penicillium* pueden producir micotoxinas (por encima de 4 u 8 °C) aunque tienen una temperatura óptima que dentro de una especie varía con la cepa. Northolt y col. (1979) observaron que la producción de ácido penicílico en unas cepas de *P. cyclopium* ocurría a 24°C y en otras a 31°C. A temperaturas de refrigeración crecen casi exclusivamente especies de *Penicillium* y el porcentaje de micotoxinas conocidas, producidas por estos mohos, parece ser muy bajo. La producción de patulina y ácido penicílico por ejemplo, no ocurre o bien ocurre a tan bajos niveles que las toxinas sólo se detectan en el



micelio del mohó (Bullerman, 1981). La ocratoxina puede ser producida en el queso a temperaturas de refrigeración pero en muy baja cantidad, de ahí la importancia de mantener el queso a bajas temperaturas (aproximadamente 5°C). El caso de otros mohos como *Aspergillus* es similar, la producción de esterigmatocistina (carcinógeno potencial), producida por *A. versicolor* puede prevenirse al igual que el crecimiento del mohó a temperaturas inferiores a 5°C (Bullerman, 1981). *A. flavus* no crece por debajo de 11-13°C pero crece bien y produce aflatoxinas a 25°C (Lieu y Bullerman, 1977).

A temperaturas de 5-7°C los mohos que se desarrollan son especies del género *Penicillium* que no producen aflatoxinas o esterigmatocistina. Así el almacenamiento a esas temperaturas podría prevenir la producción de esas micotoxinas. Pero no hay que olvidar que la aflatoxina puede contaminar el queso y otros productos fermentados también por otras vías como es la leche que producen animales que consumen alimentos contaminados con aflatoxinas, en tal caso sólo se detectaría la aflatoxina M<sub>1</sub> ya que el animal convierte la aflatoxina B<sub>1</sub> en M<sub>1</sub> antes de la secreción láctea. No hay evidencia de que otras micotoxinas puedan ser transmitidas por esta vía (Bullerman, 1981).

Northolt y col. (1979) estudiaron la influencia de la Aw en la producción de ácido penicílico por varias cepas de las especies *P. cyclopium*, *P. martensii*, *P. viridicatum* y *A. ochraceus* deduciendo que dependía de la composición del sustrato de crecimiento. En cultivos en MES (Malt extract sucrose) la Aw límite para la producción de ácido penicílico por esas especies era de 0,97. El rango de Aw que presentan los quesos no resulta óptimo para la producción de micotoxinas.

La cantidad final de toxina detectable en los quesos depende de la cantidad producida y de las pérdidas por reacción con otros componentes (Northolt y col., 1979).

No se puede asegurar que los mohos que se desarrollan en el queso son inofensivos, sin embargo sí que predominan los mohos no toxigénicos (género *Penicillium*) sobre los toxigénicos, además de que éstos no producen micotoxinas por debajo de los 5°C.

## **2.- MATERIAL Y METODOS.**

### **2.1.- MATERIAL.**

Además del material general descrito en el capítulo I, para visualizar los caracteres macroscópicos de las colonias se empleó una lupa estereoscópica WILD M3 y para el estudio de la micromorfología un microscopio OLYMPUS CHB con una cámara lúcida OLYMPUS BH2-DA acoplada para medir estructuras y realizar dibujos.

---

Las fotografías se realizaron empleando una lupa MEIJI con una cámara OLYMPUS OM-101 y un transformador NIKON, y un microscopio NIKON acoplado a una cámara NIKON FX-35DX y un transformador NIKON UFX-DX.

Las fotografías de los mohos en placa se hicieron con una cámara NIKON FG y una NIKON 4004 S.

Para el análisis de micotoxinas se emplearon placas de cromatografía en capa fina (cromatofolios de aluminio silicagel 60 WF<sub>254</sub>S de MERCK).

Para visualizar las micotoxinas se empleó una lámpara de U.V. (SVL) (Wilber Lourmat) con  $\lambda$  254 nm.

## **2.2.- MÉTODOS.**

### **2.2.1.- AISLAMIENTO DE LAS CEPAS.**

A partir de las placas de OGYEA que presentaban entre 30 y 300 colonias se aislaron al azar 10 cepas en cada lote y punto de muestreo. Las cepas se mantuvieron hasta su estudio en viales con agar Sabouraud y cubiertos con parafina estéril para reducir su actividad metabólica y para evitar la deshidratación del medio de cultivo.

### **2.2.2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS.**

Los mohos se diferenciaron de las levaduras en base a la morfología y tipo de crecimiento que presentaban: se caracterizan por la formación de micelio que da a las colonias un aspecto algodonoso o aterciopelado y normalmente presentan color verdoso, al menos en alguna parte del micelio.

Para el cultivo se emplearon diferentes medios, en cada uno adquieren una morfología característica:

- Czapek agar (Cz).
- Czapek yeast autolysate extract agar (CYA).
- Malt extract agar (MEA).

La inoculación en los medios se realizó en tres puntos equidistantes a partir de una suspensión de esporas en 0,2-0,4 ml de un medio semisólido (Pitt, 1988) que lleva en su composición agar fundido (0,2%) y Tween 80 (0,5%) por evitar en la medida de lo posible la diseminación de las esporas en el medio de cultivo.

---

Después de 7 días a 25°C los cultivos en cada medio se examinaron macroscópicamente y se anotó el diámetro de las colonias, el color, la textura, la producción de pigmento, producción de exudado, etc.

Para el examen microscópico se realizaron preparaciones tomando con una aguja estéril una porción del micelio y empleando como colorante lactofenol, lactofenol-ácido pícrico o más comúnmente lactofenol-azul algodón.

Según las características del cultivo se podía emplear cinta adhesiva para visualizar las estructuras fúngicas sin romperlas.

### **2.2.2.1.- IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE GÉNERO.**

Para adscribir a género se siguieron los criterios de Samson y van-Reenen-Hoekstra (1988). Se observaron las características siguientes:

- Presencia de micelios septados y producción de esporas asexuales dentro de esporangios o bien a partir de hifas.

- Presencia de cuerpos fructíferos (todas las cepas se incluyeron en el grupo de los Deuteromycetes ("Fungi imperfecti") de los que sólo se conoce el estado asexual o también llamado conidial).

- Modo de formación de los conidios, que puede ser a partir de células conidiógenas, por ejemplo fiálides (con forma de botella o de lanza) de las cuales surgen por sucesión basípeta los conidios, como es el caso de *Penicillium*, o bien por fragmentación de las hifas. Si además los conidios son de desarrollo sólo ártrico y las hifas son bifurcadas se trataría del género *Geotrichum* y dentro de este género a la especie más común en alimentos que es *G. candidum*. Se puede presentar también en el estado sexual (*Galactomyces geotrichum*).

- Disposición de los conidióforos, que cuando están ramificados en verticilos son característicos del género *Verticillium* y dentro de este género de la especie *V. lecanii*.

- La forma de los conidios, ovoides, piriformes o elipsoidales; si éstos son de buen tamaño, tienen un cuello corto y surgen de cadenas largas y ramificadas se adscriben las cepas al género *Alternaria* y dentro de este género a la especie *A. alternata* o *A. tenuis*.

### **2.2.2.2.- IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE.**

La identificación a nivel de especie de los mohos del género *Penicillium* se efectuó examinando las características morfológicas y fisiológicas.

---

**Características morfológicas:**

El estudio de los caracteres macro y micromorfológicos nos han permitido una identificación previa a nivel de especie, según criterios de Pitt (1988), Samson y van Reenen-Hoekstra (1988), Ramírez (1982) y Raper y Thom (1968). Esta identificación fue luego confirmada empleando tests fisiológicos.

Las cepas se cultivaron en los medios siguientes:

- MEA
- Czapek
- CYA

Después de incubar a 25°C durante 7 días en cada medio se observaron características macroscópicas y características microscópicas.

**Características macroscópicas:**

Color, textura (aterciopelada, fasciculada, lanosa, funiculosa), olor, producción de exudado, producción de pigmento, diámetro de las colonias, etc.

**Características microscópicas:**

Estructura del conidióforo (grado de ramificación entre fiálides y estipe, que en función de que tengan un punto de ramificación, dos, tres o cuatro se clasifican en mono, bi, ter o cuaterverticilados,), forma y dimensiones de fiálides, métulas y rami, superficie de los estipes (lisos, rugosos, verrucosos), tamaño, forma, superficie y color de los conidios.

En el género *Penicillium* suele haber una proporción de aislamientos difíciles de identificar en función únicamente de características morfológicas ya que algunos criterios como la textura y el color son bastante artificiales y subjetivos. Además algunas especies son difíciles de distinguir en base a sus características microscópicas. Frisvad (1981, 85) y Pitt (1988) aplican criterios fisiológicos como ayuda para la identificación sobre todo de los *Penicillia* terverticilados.

**Características fisiológicas:**

Se estudiaron las siguientes:

\* Reacción con FeCl<sub>3</sub>: se dejó crecer el moho en tubos de ensayo con pequeños volúmenes de solución Czapek. Al cabo de 7 días se observó el color del medio antes y después de la reacción con cloruro férrico (Smith, 1963).

---

\* Capacidad para producir podredumbre en manzanas y/o cítricos: tras limpiar la superficie de la fruta con un agente desinfectante se realizó una punción, manteniendo la esterilidad y se inoculó la cepa. Se incubó a 25°C hasta 7 días (Frisvad, 1981).

\* Digestión de la leche: se sembró en el medio agar-leche al 30% y después de incubar a 25°C durante 7 a 14 días se observó la formación de halos de aclaramiento alrededor de las colonias (Harrigan, 1979).

\* Crecimiento en agar creatina-sucrosa (CREA): se observó la capacidad de crecer en este medio, así como la de producir ácido y posteriormente álcali, se realizaron lecturas a la primera, segunda y tercera semana de incubación a 25°C (Frisvad, 1981, 1985).

\* Crecimiento en agar y en solución  $\text{NO}_2^-$ : se comparó el crecimiento de las cepas en un medio con nitritos como única fuente de nitrógeno con el presentado en CYA y en agar-agua después de 7, 14 y 21 días de incubación. Al ser el crecimiento igual que en CYA se le asignó un crecimiento (++) , si es algo más bajo se le dió (+) y si el crecimiento es como en agar-agua se le dió (-) (Frisvad, 1981).

\* Crecimiento a 5, 30, 34 y 37°C): se observó tras incubar en CYA durante 7 días. *P. aurantiogriseum* tiene una temperatura óptima de crecimiento próxima a 30°C, mientras que *P. viridicatum* la tiene próxima a 36°C.

\* Inhibición de *S. aureus*, *Candida*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*: se realizó según los criterios de Smith (1963). Las placas de Petri con el medio de Raper y Thom se sembraron con esporas de *Penicillium* haciendo una línea a un lado de la placa y se incubaron a 25°C durante 3 ó 4 días. A continuación se sembraron las suspensiones de los microorganismos problema formando ángulo recto con la colonia del moho y las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas. Se observó la inhibición del crecimiento de los microorganismos problema en la proximidad del moho.

\* Capacidad lipolítica: se observó el crecimiento en agar tricaproína y agar tributirina a los 5, 7 y 14 días de incubación. Se realizó la prueba primero en agar tricaproína y se observó el aclaramiento del medio (Frisvad, 1981), como apenas se observó crecimiento se determinó entonces la capacidad de crecer o no en el medio cuando la única fuente de C disponible era la tributirina para lo cual se suprimió la sacarosa de la composición del medio basal Czapek.

\* Crecimiento en presencia de fungicidas: se emplearon los medios GYBS (GY agar con 50 ppm de ácido sórbico y 50 ppm de ácido benzoico), GYP (GY agar con 1000 ppm de ácido propiónico) y GYA (GY agar con 5000 ppm de ácido acético). El crecimiento se observó los 5, 7 y 14 días de incubación y se comparó con el crecimiento en GY agar. Cuando

el crecimiento no se ve afectado se le asignó (++), si es algo más ligero que en GY agar (+) y si no había crecimiento (-), (Frisvad, 1981).

\* Análisis de metabolitos secundarios (micotoxinas), mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Según Frisvad y Filtenborg (1983) los *Penicillia* terverticilados se podrían definir en función de los perfiles metabólicos secundarios, pudiendo ser usados como un criterio primario en la taxonomía de *Penicillium*.

Las cepas se cultivaron en diferentes medios (CYA, OA y YES) a 25°C, durante 7 a 14 días.

El análisis se realizó mediante la técnica de extracción de toxinas y la del "tapón de agar".

- Extracción de toxinas (Frisvad, 1981): las cepas se cultivaron en YES agar y tras 21 días se dividió el agar y el cultivo en tres porciones iguales. Con una se siguió el método del círculo de agar y las otras dos se metieron en una bolsa de Stomacher protegida por otras dos. Se añadieron 50 ml de cloroformo y se homogeneizó durante 2 minutos. Se secaron aproximadamente 30 ml de la fase de cloroformo sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. El solvente se concentró (en vacío a 55°C) hasta aproximadamente 2 ml. En las placas de silicagel se colocaron alícuotas de 10 µl.

- Técnica del "tapón de agar" (Filtenborg y Frisvad, 1980; Filtenborg y col., 1983): del centro de la colonia del moho se recortó un círculo de agar de un diámetro de aproximadamente 0,4 cm (la producción de la toxina es normalmente más alta en el centro de la colonia). El tapón fue extraído de la placa de agar con una aguja estéril y luego aplicado directamente en la placa de cromatografía o bien humedecida con una gota de cloroformo/metanol (2:1) o diclorometano/acetona (2:1) y aplicado presionando rápidamente con la cara del micelio en la placa. Una vez seco el sitio de aplicación se pusieron más tapones en el mismo sitio siempre que la aplicación no fuera mayor de 8 mm de diámetro.

Se emplearon como patrones externos e internos griseofulvina, ácido micofenólico, ácido penicílico, roquefortina y penitrem A, en concentraciones de 0,5 mg/ml.

En las tablas 1 y 2 se recogen los valores de R<sub>f</sub> y las condiciones de revelado de estos patrones, utilizando como eluyentes TEF y CAP, respectivamente.

Algunos ensayos se hicieron impregnando previamente las placas en ácido oxálico al 8%, en agua o en metanol, secándolas luego al aire. De esta manera se pretendieron obtener mejores resultados para las micotoxinas ácidas como el ácido ciclopiazónico, citrinina, ocratoxina, etc.

---

Como eluyentes se utilizaron el TEF (tolueno-etilacetato-ácido fórmico al 90%) (5:4:1) y el CAP (cloroformo-acetona-propano-2-ol) (85:15:20) que es más específico para la roquefortina C y la griseofulvina.

Una vez finalizada la carrera se observaron las placas (antes y después de los tratamientos químicos) con luz visible y ultravioleta a 254 nm, algunas micotoxinas eran visibles sin ningún tratamiento químico.

Para el revelado se emplearon reactivos químicos que pulverizados sobre las placas o a través de sus vapores originaban productos coloreados o fluorescentes (Frisvad, 1981; Frisvad y Filtenborg, 1983; Filtenborg y col., 1983; Samson y van Reenen-Hoekstra, 1988), ensayando primero con las micotoxinas patrón.

Los reactivos empleados en las placas cuyo eluyente fue el TEF, y las micotoxinas patrón que se visualizaron con cada uno de ellos fueron los siguientes:

- Reactivo 1 (R1):  $\text{FeCl}_3$  al 1% (p/v) en butano-1-ol. Permitió visualizar griseofulvina y ácido micofenólico.

- Reactivo 2 (R2):  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 50%, calentando unos 5 minutos a 120-130°C. Visualizó griseofulvina y ácido penicílico.

- Reactivo 3 (R3): ANIS: p-anisaldehído al 0,5% en metanol o etanol/ácido acético/sulfúrico concentrado (17:2:1) y calentando la placa durante unos 5 minutos a 120°C. Principalmente para griseofulvina, ácido micofenólico y ácido penicílico.

- Reactivo 4 (R4): Vapores de  $\text{NH}_3$  durante 1 a 3 minutos, posteriormente las placas se pulverizaron con ANIS y se calentaron. Visualizó griseofulvina y ácido penicílico.

- Reactivo 5 (R5):  $\text{AlCl}_3$  al 20% (p/v) en etanol al 96%, luego se calentaron 5 minutos a 120°C. Visualizó penitrem A.

- Reactivo 6 (R6):  $\text{FeCl}_3$  al 1% (p/v) en butano-1-ol y ANIS calentando las placas a 120°C durante 10 minutos. Visualizó griseofulvina y penitrem A.

Para las placas eluidas en CAP se empleó el siguiente reactivo:

- Reactivo 7 (R7):  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  al 1% (p/v) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (6 N). Permitió visualizar roquefortina, penitrem A, griseofulvina, ácido micofenólico y ácido penicílico.

Para la identificación de las micotoxinas se midió el valor  $R_f$  (Factor de retraso) que indica la relación entre la velocidad de desplazamiento del soluto y la velocidad de desplazamiento de la fase móvil.

En las tablas 1 y 2 se recogen los valores Rf y las condiciones de revelado de estos patrones, utilizando como eluyentes TEF y CAP, respectivamente.

Tabla 1. Valores Rf y condiciones de revelado de las microtoxinas patrón en TEF

Micotoxina	Rf	Tratamiento químico	Color	Luz empleada
Griseofulvina	0,36 - 0,38		violeta	U.V.
		R1	violeta	U.V.
		R2	amarilla	U.V.
		R3	rosa	visible
		R4	verde-amarillo	U.V.
		R6	rosa-violeta	visible
		En Oxálico	violeta/Blanca	U.V.
Micofenólico	0,47-0,48		oscura	U.V.
		R3	rojiza	visible
		R1	violeta claro	visible
		En oxálico	oscura	U.V.
Penicílico	0,37-0,38		oscura	U.V.
		R3	azul	visible
		R4	azul	visible y U.V.
		R2	Blanca	U.V.
Roquefortina	0,02		oscura	U.V.
Penitrem A	0,60-0,62		oscura	U.V.
		R5	azul	visible
	0,56	R6	azul oscuro	visible



Tabla 2. Valores Rf y condiciones de revelado de las micotoxinas patrón, utilizando como eluyente CAP

Micotoxina	Rf	Tratamiento químico	Color	Luz empleada
Griseofulvina	0,65-0,70		violeta	U.V.
		R7	oscura	visible
Micofenólico	0,70		oscura	U.V.
		R7	amarilla oscura	U.V. visible
Penicílico	0,57-0,59		oscura	U.V.
		R7	azul	U.V.
Roquefortina	0,18-0,19		oscura	U.V.
		R7	roja	visible
Penitrem A	0,73-0,76		oscura	U.V.
		R7	oscura	visible

Como los Rf dependen de las circunstancias experimentales (tipo de fase móvil y estacionaria, temperatura, etc) se empleó el Rfg que nos da la relación entre la distancia recorrida por la zona de soluto y la recorrida por la griseofulvina, corrigiendo así las posibles diferencias debidas a variaciones en los experimentos y pudiéndose entonces comparar con los valores Rfg conocidos para algunas micotoxinas.

### 3.- RESULTADOS

De las 274 cepas aisladas en OGYEA 90 (el 32,48%) resultaron ser mohos. A continuación se dan algunas descripciones referentes a la morfología que presentan en diferentes medios de cultivo, siempre refiriéndonos a un periodo de incubación de 7 días a 25°C.

- 60 cepas fueron identificadas como pertenecientes a la especie *Geotrichum candidum*. Las cepas de la especie *G. candidum* presentan buen crecimiento en MEA (fig. 1), las colonias son planas, hialinas, mucosas, con fino micelio de aspecto aterciopelado,

similares en cierto modo a las colonias de levaduras, el diámetro de las colonias es de aproximadamente 6,5 cm. En Czapek apenas se aprecia crecimiento. Microscópicamente las hifas son bifurcadas, los arthroconidios de 6-8-10  $\mu$  x 2-3-5  $\mu$ . También se observan clamidosporas intercalares y terminales (fig. 2).

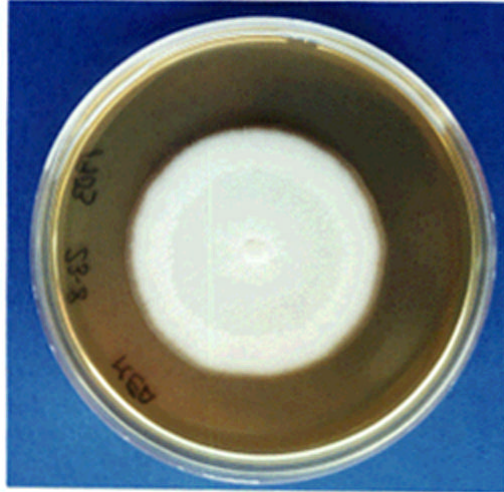


Fig. 1.- Colonia de *G. candidum* en MEA. Fig. 2.- Aspecto microscópico de *G. candidum*.

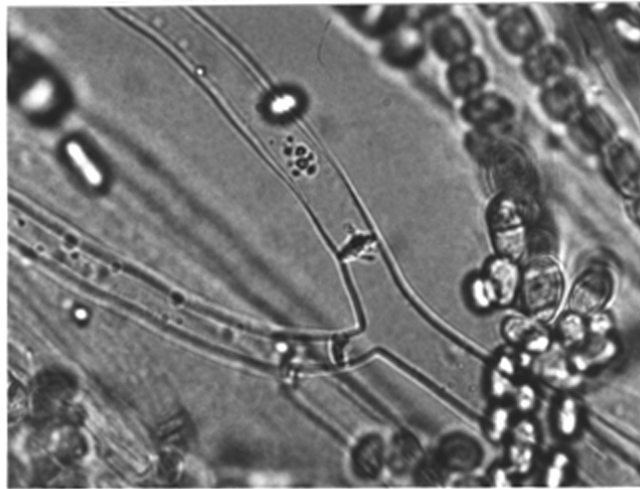


Fig. 2.: Aspecto microscópico de *G. candidum*

-1 cepa se adscribió a la especie *Verticillium lecanii*. En MEA (fig. 3a) las colonias son blancas, algodonosas, de aproximadamente 1 cm de diámetro, el reverso de las colonias es ligeramente amarillento. En Czapek (fig. 3b) las colonias son blancas, planas, de 1,5 cm de diámetro, al cabo de varios días comienza a difundir levemente un pigmento rosa. En CYA (fig. 3c) las colonias son blancas y surcadas radialmente, se observa también la producción de pigmento rosa que difunde al medio y forma un halo alrededor de las colonias, al cabo de más tiempo el medio se vuelve completamente rojo. Microscópicamente se observa que las fiálides se disponen aisladas o bien ramificadas cerca de la base, en verticilos, los conidios son muy pequeños, de aproximadamente 1  $\mu$  de diámetro y se disponen aislados o en grupos en el extremo de las fiálides (fig. 4).

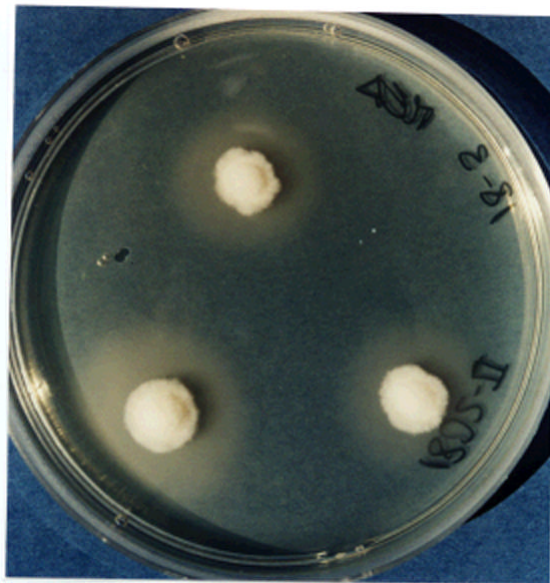


Fig. 3<sup>a</sup>. Colonias de *V. Lecanii* en MEA

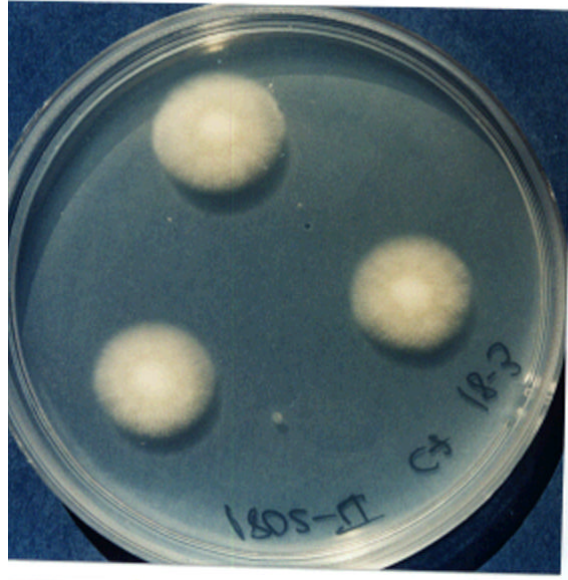


Fig.3b.- Colonias de *V. lecanii* en Czapek

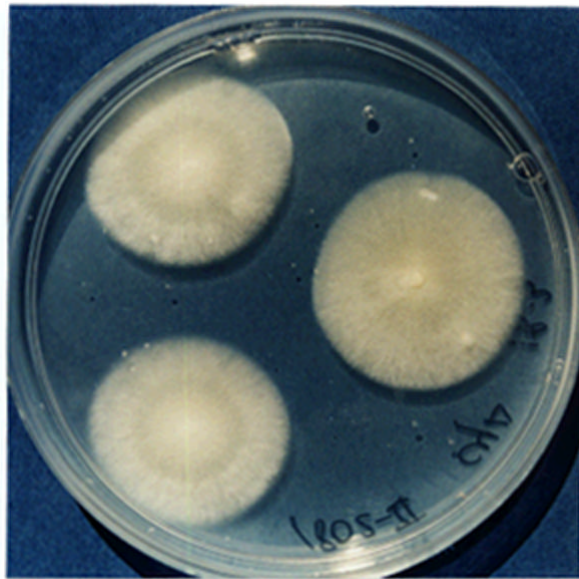


Fig. 3c.- Colonias de *V. lecanii* en CYA.

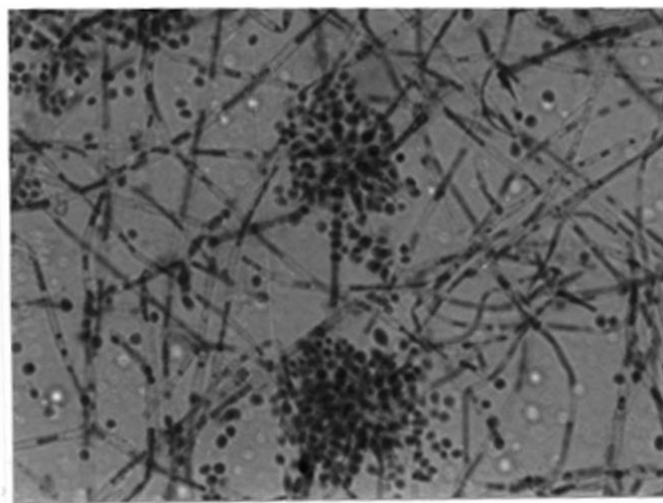


Fig. 4.- Aspecto microscópico de *V. lecanii*.

- 1 cepa perteneció a la especie *Alternaria alternata* (= *A. tenuis*). En MEA (fig. 5a) el micelio es grisáceo, oscuro, con abundante micelio aéreo que toma un aspecto algodonoso. Después de 1 mes en Czapek adquirió un tono ligeramente rosado y en contacto con el sustrato se apreciaba micelio oscuro con borde blanquecino (fig. 5b). Las hifas son muy tabicadas y los conidios muy característicos, son grandes, de aspecto piriforme y de base redondeada, con desarrollo blástico (fig. 6).



Fig. 5a.- Colonia de *A. alternata* en MEA

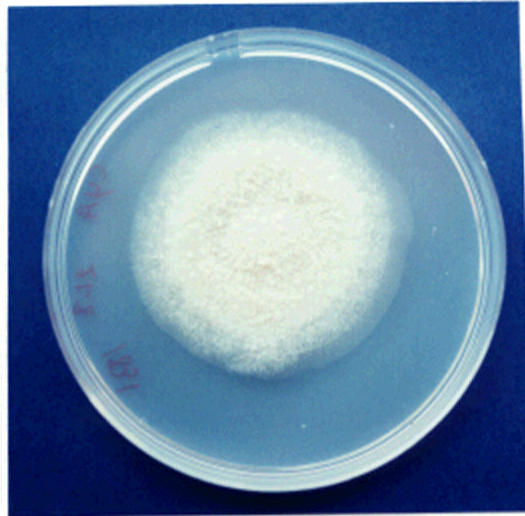


Fig. 5b.- Colonia de *A. alternata* en CYA

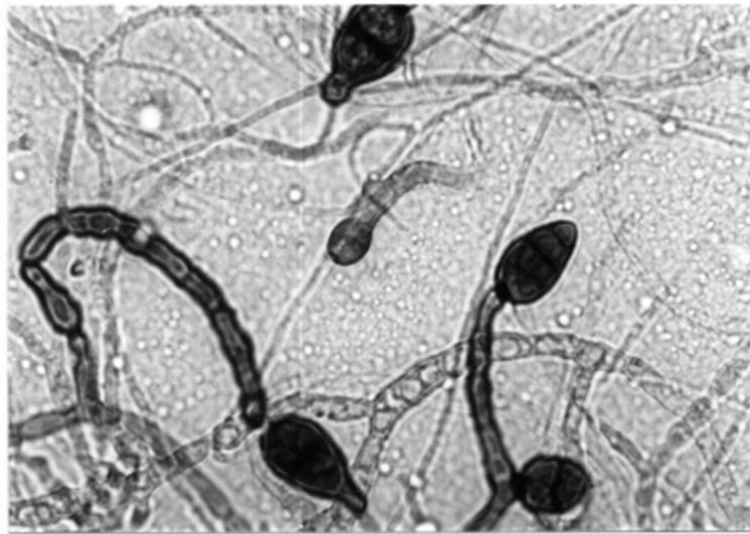


Fig. 6.- Aspecto microscópico de *A. alternata*

28 cepas se adscribieron al género *Penicillium*. Entre las características que presentaban destacan un micelio verde o blanco con buena esporulación, conidióforos en forma de pincel (penicilio), presencia de células conidiógenas (fiálides), métulas y rami que son ramificaciones del conidióforo o hifa fértil. Las fiálides tienen forma de botella o si son más alargadas, de lanza, los conidios surgen de ellas por sucesión basípeta.

Los caracteres fisiológicos y las micotoxinas producidas por las cepas adscritas a especies del género *Penicillium* se recogen en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. Características fisiológicas de las cepas adscritas al género *Penicillium* aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado.

	<i>P. roqueforti</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. verrucosum</i> Quimiotipo I	<i>P. commune</i>	<i>P. aurantio griseum</i>
Nº de cepas	10	3	6	2	4	3
Podre. de manzanas	0	0	6 (Pequeña zona)	0	2 (Pequeña zona)	0
Podre. de cítricos	10*	2*	0	1*	1*	1*
Coagul. leche**	0	3	0	0	0	0
Tricaproína	0	0	0	0	0	0
Tributirina	10	3	6	2	4	3
Crec. 5°C	0	0	0	0	0	0
Crec. 30°C	N.D.	N.D.	0	N.D.	0	0
Crec. 34°C	N.D.	N.D.	0	N.D.	0	0
Crec. 37°C	0	0	0	0	0	0
FeCl <sub>3</sub>	10 amarillo	3 naranja	3 amarillo 3 naranja	1 amarillo 1 naranja	2 amarillo	
Inhib. de: <i>Candida</i>	0	0	0	0	0 y 1 N.D.	3
<i>S. aureus</i>	0	3 y 1 (↓)	1 y 3 (↓)	1 (↓)	0 y 1 N.D.	2 (↓)
<i>B. cereus</i>	0	3 (↓)	2 y 3 (↓)	0	3 (↓)	2 (↓)
<i>B. subtilis</i>	10 (↓)	3	4 y 1 (↓)	1 (↓)	2, 1 (↓) y 1 N.D.	1 y 1 (↓)
Crec. CREA	10	3	6	0	4	0
Acido en CREA	0	3	6	0	4	+/-
Alcali en CREA	0	0	6	0	4	0
Agar NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	10	0	+/-	2	0	0
Caseína	10	3	6	2	3	3
GYBS	10	3	6	0	4	0
GYP	10	0	6	0	2	0
GYA	10	0	0	0	0	0

\* Presencia de moho blanco y gris-verdoso que recubre la corteza.

\*\* Se aprecia un crecimiento muy débil en todas las cepas, que se considera negativo.

Tabla 4. Micotoxinas producidas por las cepas adscritas al género *Penicillium* aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado

Especie	Rfg en TEF	Micotoxina	Revelado	Rfg en CAP	Revelado	Cepas
<i>P. roqueforti</i>	0,07-0,08	Roquefortina C	ninguno R6-visible	0,22-0,21	R7-rojo	10
	1,26-1,34	Micofenólico	ninguno R2-amarillo	1,04-1,03	ninguno	10
	1,05-1,08	Penicílico	R2-amarillo	0,83-0,88	R7-azul	10
	1,41	PR-toxina	R1			10
<i>P. chrysogenum</i>	0,11-0,14	Roquefortina C	R6-naranja R1-marrón	0,43-0,47	R7-azul-verde	3
	1,39-1,43	PR-toxina	ninguno R2-oscura	1,11-1,13	ninguno	3
<i>P. crustosum</i>	0,57-0,64	Terréstrico	ninguno			3
	0,72-0,80		R3-amarillo			5
	0,05-0,06	Rugulovasina	R6-oscura			2
	0,07-0,14	Roquefortina C	R3-violeta	0,41-0,42		5
<i>P. verrucosum</i> quimiotipo I	1,51-1,55	Penitrem A	R2-naranja	1,12-1,22	R7	6
	1,56-1,74		R3-violeta			
<i>P. commune</i>	1,35-1,39	Ocratoxina A	ninguno R1-azul	0,31		2
<i>P. commune</i>	0,05-0,08	Rugulovasina	R6-oscura R2-azul	0,08	R7-azul	1 2
	1,51-1,60	Penitrem A	R2-naranja	1,09-1,14		3
	1,55-1,70		R3-violeta			
	1,30-1,39	Ciclopiazónico	ninguno R2-azul R6-azul			2
1,03-1,05	Ciclopenol/Ciclopenina	ninguno oxálico-R2-azul	0,84-0,92	R7-azul	3	



Tabla 4 (Continuación). Micotoxinas producidas por las cepas adscritas al género *Penicilium* aisladas durante la elaboración y maduración del queso de Armada, variedad Sobado

Especie	Rfg	Micotoxina	Revelado	Rfg en CAP	Revelado	Nº cepas productoras
<i>P. aurantiogriseum</i>	1,51-1,55	Penitrem A	R2-naranja R3-violeta	1,09-1,13 1,22	ninguno	2
	0,58-0,69	Terréstrico	ninguno			3
	1,39	Ciclopiazónico	ninguno			1
	0,05-0,06	Rugulovasina	R6-oscuro			2

- 10 cepas se adscribieron a la especie *P. roqueforti*.

La adscripción a esta especie no planteó mayores dificultades ya que la morfología tanto macro como microscópica es muy característica.

Macromorfológicamente las colonias de estas cepas no tienen olor apreciable. Presentan en MEA (fig. 7a) un color verde-gris, con un diámetro de 7 cm, la colonia tiene un aspecto que recuerda al de la tela de araña y por eso se hace referencia a él como aspecto aracnoideo, la textura es aterciopelada. En Czapek las colonias tienen un crecimiento más restringido, color verde-grisáceo y un diámetro de 1,5 a 2 cm. En CYA (fig. 7b) las colonias son planas con la zona central más elevada, de color verde-gris y con el borde blanco. El reverso es verde oscuro, casi negro (1 cepa de las adscritas a esta especie presentaba ligera variación en las características morfológicas examinadas).

Microscópicamente presentan conidióforos terverticilados sobre todo, con estipes verrucosos, los conidios son bastante grandes, con un diámetro de hasta 6  $\mu\text{m}$  (fig. 8).

Entre los caracteres fisiológicos más destacables se encuentra la incapacidad de producir podredumbre en manzanas, mientras en cítricos crecen formando una capa de moho blanco y gris-verdoso en la corteza, en el medio CREA presentan crecimiento sin producción de ácido, asimilan los nitritos como única fuente de N disponible, no inhiben el crecimiento de *Candida* y tampoco el de bacterias como *S. aureus* y *B. cereus* y sólo ligeramente el de *B. subtilis*, pueden crecer en presencia de tributirina pero sólo lo hacen ligeramente en presencia de tricaproína, no coagulan la leche, tienen actividad casinolítica moderada a los 7 días y más intensa a los 14 días y presentan buen crecimiento en presencia de los tres fungicidas ensayados (GYBS, GYP, GYA) (Tabla 3).

En cuanto a la producción de micotoxinas se identificaron roquefortina C, ácido micofenólico y ácido penicílico (tabla 4).

- 6 cepas se identificaron como pertenecientes a la especie *P. crustosum*. Macroscópicamente se caracterizan por colonias en MEA (fig. 9a) de diámetro aproximadamente 2,5 cm, de color verde-gris, con marcada zonación, olor acentuado, como afrutado, muy esporuladas, se desprenden masas de conidios fácilmente al golpear la placa (es una característica muy típica de *P. crustosum*). En Czapek (fig. 9b) el diámetro es de 2,5 cm aproximadamente, las colonias son también verde-grisáceas, con surcos radiales y concéntricos, en algunas cepas se observa exudado abundante a modo de gotas incoloras, el reverso es amarillo-crema, a veces anaranjado, los bordes tienen halos amarillo-brillante. En CYA (fig. 9c) presentan un diámetro de aproximadamente 3 cm, las colonias están muy surcadas radialmente, son verdes con el borde blanco y tienen abundante exudado, el reverso es similar al observado en Czapek y la textura parece fasciculada.

Micromorfológicamente se caracterizan porque los conidióforos presentan estipes lisos o finamente rugosos, bi y terverticilados, los conidios son elipsoidales, globosos y subglobosos de 4  $\mu$  de diámetro (fig. 10).

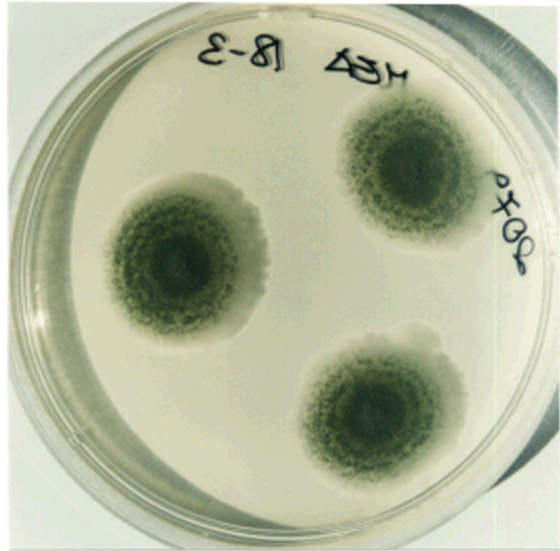


Fig. 9a.- Colonias de *P. crustosum* en MEA

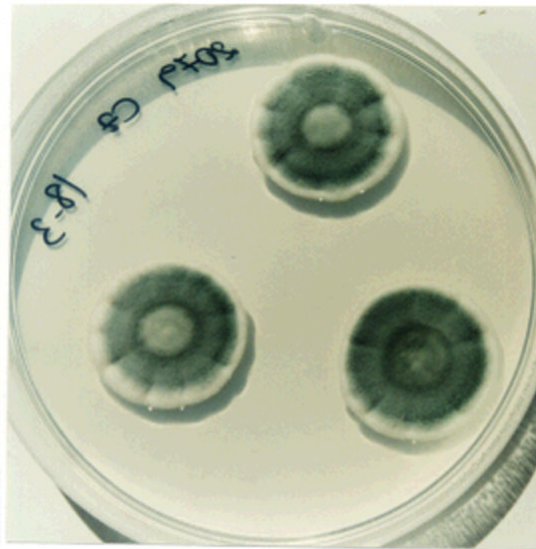


Fig. 9b.- Colonias de *P. crustosum* en Czapek

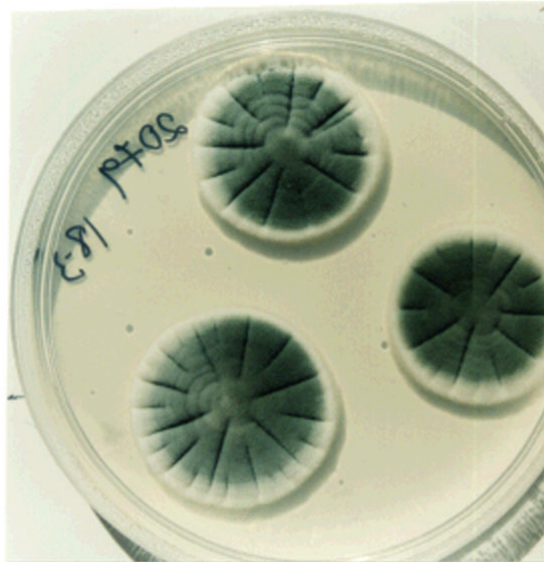


Fig. 9c.- Colonias de *P. crustosum* en CYA

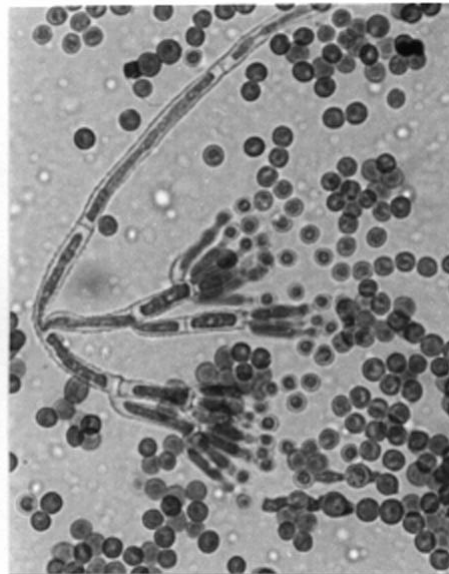


Fig. 10.- Aspecto microscópico de *P. crustosum*

Entre las características fisiológicas (tabla 3) más destacables al ser inoculadas en manzanas producen una pequeña zona de podredumbre, en CREA presentan crecimiento con producción de ácido y posteriormente de base, el crecimiento en presencia de  $\text{NO}_2$  como única fuente de N disponible es débil, no inhiben el crecimiento de *Candida*, tampoco tienen capacidad (o bien es muy ligera) para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, algunas cepas pueden inhibir el crecimiento de *B. cereus* y *B. subtilis*, no coagulan la leche, tienen actividad caseinolítica a los 7 días que se hace muy notable a los 14 días de incubación, las 5 cepas demostraron resistencia a dos fungicidas (GYBS y GYP) y fueron sensibles a GYA, 3 cepas reaccionan con el  $\text{FeCl}_3$  dando un color naranja fuerte.

En todas las cepas se identificaron las Micotoxinas siguientes: penitrem A, roquefortina C, ácido terrétrico y posiblemente rugulovasina (esta micotoxina no figura en la bibliografía entre las producidas por *P. crustosum*) (tabla 4).

9 cepas se incluyeron en el grupo *P. verrucosum* COMPLEX (según Samson y van Reenen Hoekstra (1988)) y dentro de este grupo atendiendo sobre todo a las características fisiológicas se pudieron diferenciar en las siguientes especies:

- *P. commune* (4 cepas):

Macromorfología: en MEA (fig. 11a) presentaban colonias de color verde, con reverso verde-amarillo pálido. Los cultivos viejos tienen fuerte olor a moho. En Czapek (fig. 11b) el micelio era blanco, algo verde en el centro, las colonias surcadas radialmente, con exudado incoloro y amarillo muy claro, el diámetro es de aproximadamente 1,5 cm. El reverso es de color blanco-crema. En CYA (fig. 11c) las colonias son verde-azules, en algunas cepas cubiertas de micelio blanco y con surcos radiales, más elevadas en el centro, de 2-2,5 hasta 3,5 cm de diámetro.

Micromorfológicamente se observan conidióforos biverticilados y también terverticilados, los estipes son lisos o muy finamente rugosos. Los conidios son globosos o subglobosos de 3 a 5  $\mu$  de diámetro (fig. 12).



Fig. 11a.- Colonias de *P. commune* en MEA

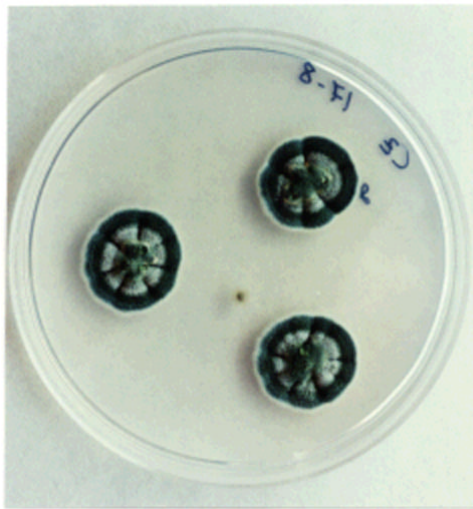


Fig. 11b.- Colonias de *P. commune* en Czapek

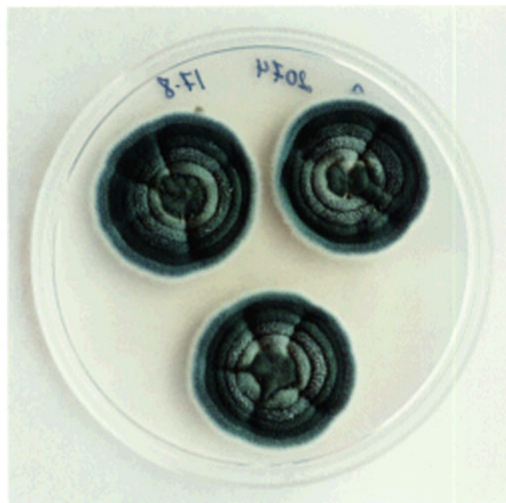


Fig. 11c.- Colonias de *P. commune* en CYA

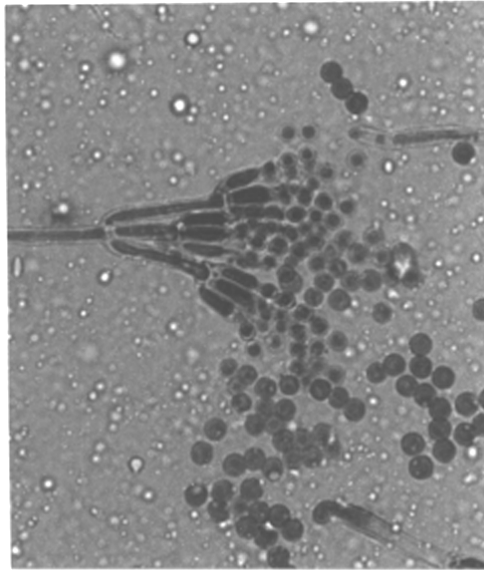


Fig. 12.- Aspecto microscópico de *P. commune*

En cuanto a las características fisiológicas (tabla 3) presentan crecimiento en CREA, con producción primero de ácido y luego de álcali, no crecen en presencia de nitritos cuando son la única fuente de N disponible (sólo algunas cepas lo hacen ligeramente en agar-NO<sub>2</sub> después de 14 días, no coagulan la leche, 3 cepas tienen actividad caseinolítica (a los 7 días se aprecia un halo de aclaramiento alrededor de las colonias en agar-leche que se hace más marcado al cabo de 2 semanas), presentan crecimiento en presencia de GYBS, en presencia de GYP crecen 2 cepas y ninguna lo hace con GYA, no inhiben el crecimiento de *Candida* ni de *S. aureus* (sólo 1 cepa ligeramente), algunas cepas inhiben el crecimiento de *Bacillus subtilis* y ligeramente el de *B.cereus*.

1 de las 4 cepas adscritas a esta especie difiere ligeramente en algunas características morfológicas y fisiológicas como por ejemplo en que no degrada la caseína.

En todas las cepas se identificaron las micotoxinas: rugulovasina, penitrem A, ácido ciclopiazónico y una que no ha podido ser identificada pero que podría ser ciclopenol o ciclopenina, aunque en la bibliografía no figura esta micotoxina entre las producidas por *P. commune* (tabla 4).

- 3 cepas se adscribieron a la especie *P. aurantiogriseum*.

Macromorfología: crecieron en MEA (fig. 13a) originando colonias verdes, de bordes blancos, no planas, algo más elevadas en el centro, de 1 cm aproximadamente de diámetro, el reverso es amarillo-naranja brillante, la textura es aterciopelada, abundante zonación, aislamientos sucesivos originaron colonias de mayor diámetro, hasta 25 cm, olor afrutado. En Czapek (fig. 13b) originan colonias blancas, algodonosas, con surcos radiales, de 1 cm aproximadamente de diámetro, con el reverso de color blanco, en algunas colonias se observa algo de exudado a modo de gotas incoloras. En CYA (fig. 13c) las colonias están radialmente surcadas, son verdes en el centro, con los bordes blancos y un diámetro de aproximadamente 1,5 cm, el reverso es de color crema y en el centro algo más oscuro, aspecto estrellado.

Microscópicamente los conidióforos son bi y terverticilados, los estipes lisos o muy finamente rugosos, a veces se ve más rugoso en la parte basal (fig. 14).



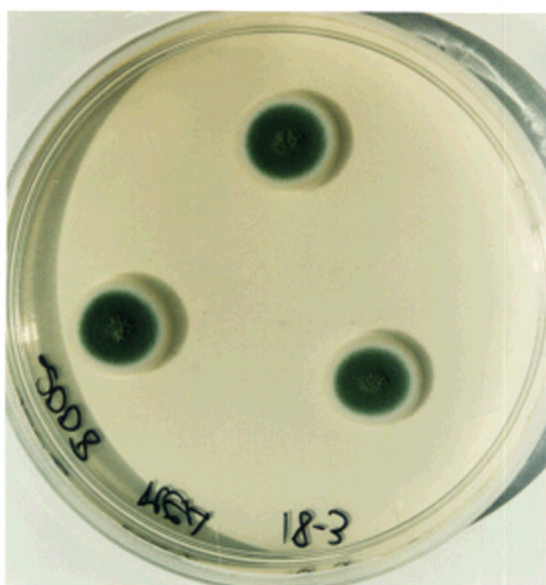


Fig. 13a.- *P. aurantiigriseum* en MEA

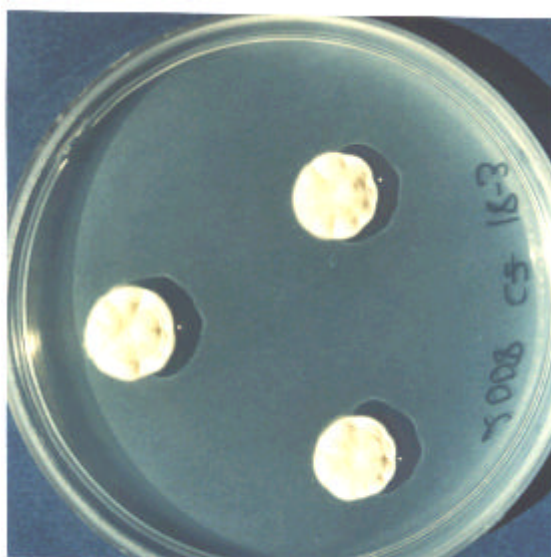


Fig. 13b.- *P. aurantiigriseum* en Czapek

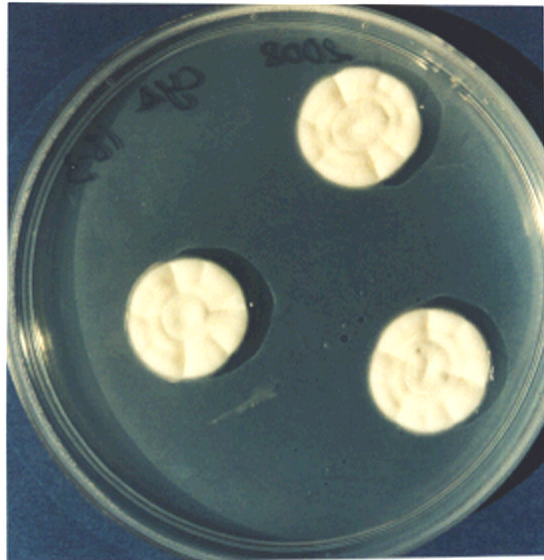


Fig. 13c.- *P. aurantiigriseum* en CYA

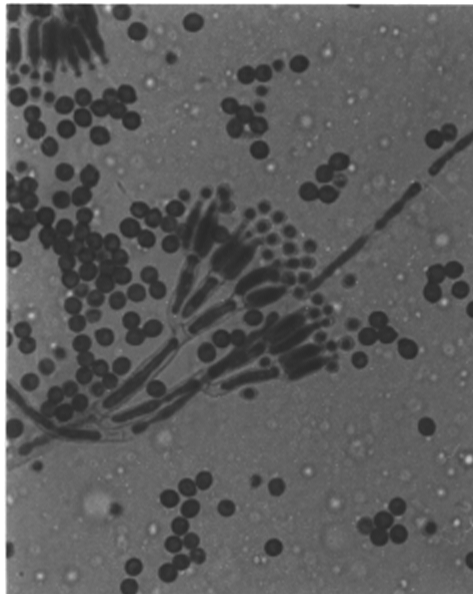


Fig. 14.- Aspecto microscópico de *P. aurantiigriseum*

En cuanto a los caracteres fisiológicos: apenas presentan crecimiento en agar CREA, sin embargo a las 3 semanas de incubación hay una producción muy ligera de ácido, no presentan crecimiento en presencia de  $\text{NO}_2$ , no coagulan la leche, tienen actividad caseinolítica a los 7 días y más acentuada a los 14 días, no crece en presencia de ninguno de los fungicidas ensayados, a diferencia del resto de las cepas estudiadas tiene capacidad inhibitoria de *Candida* (tabla 3).

Por lo que respecta a la producción de micotoxinas se identificaron para las tres cepas ácido terrástrico, rugulovasinas, penitrem A y ácido ciclopiazónico (tabla 4).

- 2 cepas se adscribieron a la especie *P. verrucosum* quimiotipo I.

Macromorfología: en MEA (fig. 15a) presentaban colonias de diámetro 1,1 cm a 1,2 cm, de aspecto algodonoso aunque en cultivos viejos la textura es más bien aterciopelada o en los bordes incluso fasciculada, la zona central es más elevada y de color verde oscuro, el resto del micelio es más claro y con los bordes blancos, el reverso tiene la zona central más clara y los bordes con halos marrón-canela y otros más claros, presentan zonación, recuerdan a "panecillos", se distingue un olor fuerte, como a pegamento o acetona. En Czapek (fig. 15b) las colonias tienen un diámetro de 1,1 cm, son blancas, algodonosas, con relieve, en la parte central se deja entrever algo verde, el reverso carece de color, se aprecia exudado (gotitas claras) en la zona central, sin olor apreciable. En CYA (fig. 15c) presenta colonias de 1,5 cm de diámetro, son blancas, algodonosas, surcadas radialmente, en la zona central se puede ver algo de micelio verde, el reverso carece de color o si lo tiene es amarillo, presencia de exudado (gotitas incoloras o amarillo muy pálido). En algún aislamiento de estas cepas apareció un ligero viraje del medio (CYA y Czapek) hacia violeta.

Microscópicamente presenta conidióforos ter y cuaterverticilados, estipes por lo general finamente espinulosos y de 4 a 5  $\mu$  de diámetro, las métulas y fiálides están bastante comprimidas, los conidióforos forman ramilletes muy frondosos y compactos, los conidios son globosos o subglobosos aunque nacen elipsoidales, verdes, de 2 a 3  $\mu$  de diámetro (fig. 16).



Fig. 15a.- *P. verrucosum* quimiotipo I en MEA



Fig. 15 b.- *P. verrucosum* quimiotipo I en Czapek



Fig 15c.- *P. verrucosum* quimiotipo I en CYA

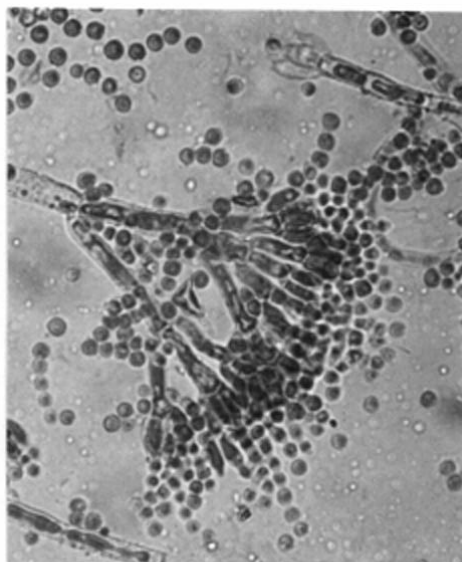


Fig. 16.- Aspecto microscópico de *P. verrucosum* quimiotipo I

Características fisiológicas (tabla 3): no producen podredumbre en las manzanas, no coagulan la leche, capacidad caseinolítica en 1 cepa y en la otra a los 14 días, tiene un crecimiento muy escaso en CREA, sin producción de ácido (siempre se aprecia algo de crecimiento por restos de N. en el medio), crecen en presencia de  $\text{NO}_2$  como única fuente de N, no inhiben el crecimiento de *Candida* así como tampoco el de los otros microorganismos ensayados, no crecen en presencia de ninguno de los tres fungicidas.

En cuanto a las micotoxinas (tabla 4) destacar la producción de ocratoxina A (es exclusivamente producida por *P. verrucosum* y constituye pues un carácter diferenciable).

Estas cepas se pudieron adscribir a esta especie atendiendo sobre todo a las características fisiológicas.

- 3 cepas se adscribieron a la especie *P. chrysogenum*.

La adscripción a especie de estas cepas no entraña mayores dificultades.

Macromorfología: en MEA (fig. 17a) originan colonias verde-gris, de textura aterciopelada, diámetro de 2,4 a 2,5 cm, planas, con reverso amarillo-verde a amarillo pálido, olor no pronunciado, aromático. En Czapek (fig. 17b) las colonias son verde-grises o verde-amarillentas, aterciopeladas, con surcos radiales y concéntricos y más elevadas en el centro, a veces hay micelio blanco algodonoso que recubre las colonias, el reverso es crema o amarillo-verdoso, presencia de exudado incoloro o amarillento a amarillo brillante y muy abundante. En CYA (fig. 17c) las colonias presentan un diámetro de 3,5 a 3,7 cm, son verdes o verde-amarillentas, con borde blanco y de textura aterciopelada o algodonosa, presentan surcos radiales y halos concéntricos, exudado amarillento en el centro y no muy abundante, produce un pigmento amarillo-verdoso que difunde al medio, tomando éste un color amarillento-brillante (más marcado en unas cepas que en otras).

Microscópicamente presenta conidióforos bi y terverticilados, los estipes son de superficie lisa o poco rugosa, los conidios en principio son más bien elipsoidales luego se van haciendo más globosos, alcanzando un diámetro de 3 ó 4  $\mu$  como mucho, se organizan en cadenas o bien están de forma desordenada (fig. 18).

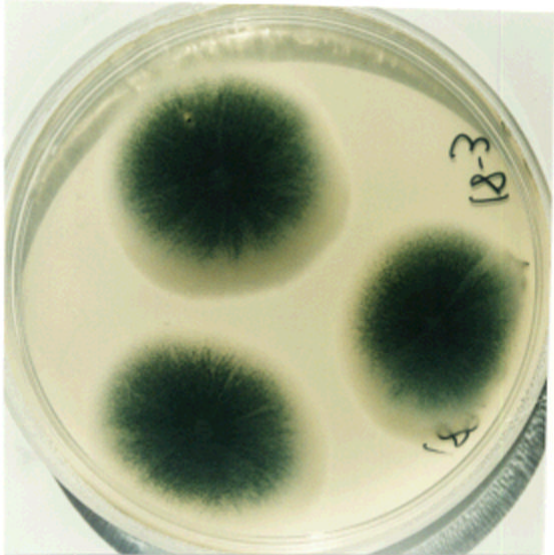


Fig. 17a.- *P. chrysogenum* en MEA



Fig. 17b.- *P. chrysogenum* en Czapek

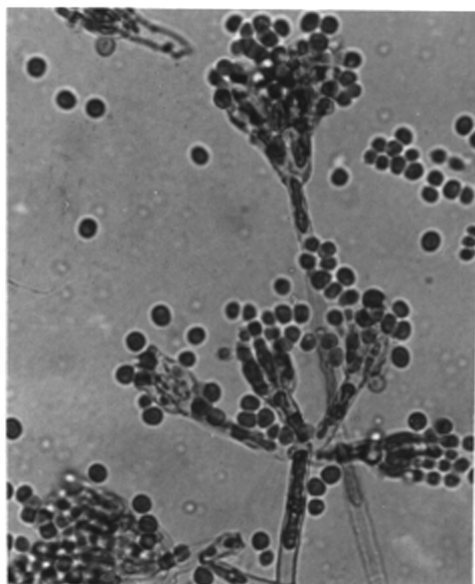


Fig. 18.- Aspecto microscópico de  
*P. chrysogenum*



Entre las características fisiológicas (tabla 3) destacar que no producen podredumbre en manzanas, coagulan la leche, produciendo un líquido amarillo brillante después de 5 días de incubación, actividad caseinolítica muy intensa (halos de aclaramiento alrededor de las colonias en agar-leche muy marcados), en CREA 2 cepas presentaron poco crecimiento y otra crecimiento normal, todas produjeron ácido no seguido de la producción de base, no crecen en agar o solución-NO<sub>2</sub>, crecen en GYBS pero no en GYP y GYA (sólo 2 cepas muestran un crecimiento ligero al cabo de 14 días en GYP), cultivos de las 3 cepas reaccionaron con FeCl<sub>3</sub> produciendo un color naranja fuerte, no inhiben a *Candida* pero sí a *S. aureus* y también a *Bacillus* (aunque a veces es ligera).

Las cepas de esta especie produjeron las micotoxinas (tabla 4): roquefortina C y PR-toxina.

La tabla 5 recoge la distribución de las distintas especies fúngicas en los puntos de muestreo a lo largo de la maduración.

Especie	Leche	Cuajada	Semanas de maduración				
			1	2	4	8	16
<i>Geotrichum candidum</i>	11	7	14	13	12	2	1
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	1	-	-	-
<i>Verticillium lecanii</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium roqueforti</i>	2	-	-	-	-	-	8
<i>P. verrucosum</i> quimiotipo I	-	1	-	-	-	1	-
<i>P. chrysogenum</i>	-	1	-	1	-	1	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-	-	1	5
<i>P. commune</i>	-	-	-	-	1	-	3
<i>P. aurantiogriseum</i>	-	-	-	1	-	-	2

## 4.- DISCUSIÓN.

### 4.1.- METODOLOGÍA DE IDENTIFICACIÓN.

El método seguido para la identificación de los mohos basado tanto en características morfológicas como fisiológicas lo podemos justificar porque si bien la taxonomía de los mohos se ha venido realizando en base casi exclusivamente a criterios morfológicos, tanto macroscópicos como microscópicos, sobre todo dentro del grupo de los *Penicillia* terverticilados existe una gran variabilidad que se aprecia tanto en la macromorfología como

en la micromorfología. Siembras sucesivas de una misma cepa en el mismo medio puede originar colonias de dimensiones y aspecto diferentes.

La textura de las colonias fue uno de los criterios empleados por Raper y Thom (1968) para establecer taxones dentro del género *Penicillium*, este criterio además de ser artificial resulta muy subjetivo como ya establecieron Ciegler y col. (1973) por lo que resulta difícil situar una especie en una u otra sección. Incluso Raper y Thom consideraron que existían intergraduaciones entre secciones, de manera que una misma especie podía presentar variaciones en algunas características, además sucesivas siembras de una cepa podía afectar a las características morfológicas de las colonias.

Otros autores como Ramírez (1982) en su "Manual sobre el género *Penicillium*" y Pitt (1988) en "La guía de laboratorio para las especies más comunes del género *Penicillium*", emplearon criterios similares, si bien Pitt hizo más énfasis a los caracteres micromorfológicos. De todas formas no siempre pueden observarse diferencias micromorfológicas importantes, ya que ciertos *Penicilios* asimétricos pueden tener una o más ramas apesadas que terminan en verticilos de métulas y fiálides, conidióforos más o menos largos que pueden ser lisos, rugosos o finamente rugosos (Ciegler (1973). Por lo tanto se hacen necesarias otras pruebas, al menos confirmatorias de la identificación, sobre todo dentro del grupo que Samson y van Reenen (1988) describen como *P. verrucosum* complex. Muchas especies incluídas en este grupo fueron objeto de frecuentes confusiones taxonómicas (Frisvad y Filtenborg, 1983).

Diversos autores empezaron a establecer criterios fisiológicos que pudieran ser aplicados a la taxonomía de los mohos. Samson y van Reenen (1988) incluyeron brevemente esta posibilidad en su "Introduction to food borne fungi". Sin embargo hay escasa información disponible para establecer relaciones entre caracteres fisiológicos y taxones.

Entre los criterios fisiológicos más utilizados en taxonomía se encuentran:

- Capacidad de ciertas especies de *Penicillium* para crecer en agar-NO<sub>2</sub> (Engel y Teuber, 1978; Frisvad, 1981).

- Crecimiento en agar creatina-sucrosa (CREA), con capacidad para producir ácido y base (Engel y Teuber, 1978; Frisvad, 1985).

- Resistencia a fungicidas como son GYBS, GYP y GYA. Según Frisvad (1981) no resultan de gran importancia taxonómica ya que la resistencia puede ser debida a una reciente adaptación al medio (además de estar muy relacionado con el pH, a veces pequeñas variaciones pueden producir respuestas diferentes), sin embargo en *P. roqueforti* la resistencia a los fungicidas parece ser genotípica.

---

- Capacidad de producir ciertos metabolitos secundarios, como micotoxinas. Frisvad y Filtenborg (1983) establecen que las especies de *Penicillia* terverticilados producen un perfil restringido de micotoxinas, pudiendo establecer relaciones entre los taxones y los perfiles de micotoxinas y otros metabolitos secundarios.

También hay que tener en cuenta que muchos aislamientos tienen tendencia a variar cuando se cultivan en laboratorio y generalmente se refleja en la pérdida de capacidad para producir un determinado metabolito secundario (Ciegler y col., 1973). Muchas especies y subgrupos producen una o dos micotoxinas en común pero la producción de 3 ó más micotoxinas iguales por especies o subgrupos distintos no es frecuente, aún así existen especies para las que en algún momento se han descrito al menos tres micotoxinas en común, por ejemplo *P. viridicatum* y *P. aurantiogriseum* (Frisvad, 1985) o *P. crustosum* y *P. commune*.

Parece por tanto necesario detectar al menos tres metabolitos diferentes para poder identificar un aislamiento del grupo de los *Penicillia* terverticilados de modo no ambiguo (Frisvad y Filtenborg, 1983).

Hasta el momento los patrones de metabolitos secundarios se utilizan como un método confirmatorio de la identificación ya que a veces no siempre son detectados todos los metabolitos que pueden ser producidos por la especie a la que pertenece la cepa en estudio y a veces aparecen metabolitos que son comunes para todos los aislamientos (Frisvad, 1981).

La detección de los metabolitos secundarios se suele hacer por patrones de TLC (Thin Layer Chromatography), empleando medios en los que hay buena producción de micotoxinas como son CYA, YES y OA a la temperatura de 25°C durante 7 a 14 días.

Otro problema adicional es la escasa información existente para poder identificar micotoxinas a través de los valores Rf y Rfg, por lo que hay pocos patrones de micotoxinas.

Esquemáticamente se pueden establecer una serie de afirmaciones como son:

- Aislamientos de *P. crustosum* producirían siempre penitrem A, además de roquefortina C, ácido terréstrico, viridicatina, ácido ciclopiazónico y ciclopáldico.

- *P. verrucosum* (Pitt, 1988) es el único productor de ocratoxina A, pudiendo o no producir citrinina.

- *P. aurantiogriseum* (Pitt, 1988) y *P. viridicarum* (Ciegler y col., 1973), especies anteriormente agrupadas en "*P. cyclopium* p" (Raper y Thom, 1968) producen micotoxinas en común. Principalmente se caracterizan por producir ácido penicílico, además de ácido ciclopáldico, ciclopiazónico, rugulovasinas, viridicatina, ácido terréstrico y penitrem A, si pueden producir brevianamidas se trataría de *P. viridicatum*.

---

- *P. roqueforti* produce ácido micofenólico, PR-toxina, roquefortina C y ácido penicílico.

- *P. chrysogenum* produce roquefortina C, PR-toxina y penicilina.

- *P. commune* produce penitrem A, roquefortina C, ciclopiazónico, ciclopáldico y rugulovasinas.

En la bibliografía disponible parecen no apreciarse a veces claras diferencias entre el perfil de metabolitos secundarios producidos por *P. commune* y los producidos por *P. crustosum* ya que *P. crustosum* puede producir penitrem A, roquefortina C, ácido terrétrico, viridicatina e isofumigaclavinas (Frisvad, 1988), penitrem A, roquefortina C y ciclopiazónico (Filtenborg y col., 1983), penitrem A, roquefortina C y ácido terrétrico según Frisvad y Filtenborg (1983) y *P. commune*, puede producir penitrem A y roquefortina C (Filtenborg y col., 1983) y según Frisvad (1988) además ciclopiazónico, ciclopáldico y rugulovasinas.

En base a lo visto anteriormente parece ser que ambas especies pueden producir tres micotoxinas iguales (penitrem A, roquefortina C y ácido ciclopiazónico).

*P. commune* y *P. crustosum* muestran además gran similitud en las pruebas fisiológicas aunque hay algunos caracteres diferenciales, por ejemplo la capacidad que tiene *P. crustosum* para producir una ligera podredumbre en manzanas. En la mayoría de las pruebas morfológicas cada especie tiene características específicas que permiten también una clara diferenciación.

#### **4.2.- ESPECIES DE MOHOS PRESENTES EN EL QUESO DE ARMADA Y SU PAPEL EN LA MADURACIÓN.**

*Geotrichum candidum* fue la especie mayoritaria en leche, lo que concuerda con observaciones hechas por otros autores en leche de vaca (Vadillo Machota y col., 1987). Esta misma especie fue también la predominante en cuajada y queso durante las 4 primeras semanas de maduración. Gueguen y Jacquet (1982) consideran tres tipos de cepas de *G. candidum*:

- Tipo 1: son cepas similares a levaduras, de color crema, principalmente acidificantes, con baja capacidad proteolítica.

- Tipo 3: cepas que originan colonias blancas, de apariencia aterciopelada, alcalinizantes, con alta actividad proteolítica.

- Tipo 2: cepas intermedias entre las dos anteriores.

---

La mayoría de las cepas de *G. candidum* aisladas del queso de Armada y de la leche utilizada en su elaboración pertenecían morfológicamente al tipo 1. Estas cepas fueron aisladas en las etapas más tempranas de la maduración y posiblemente contribuyan al descenso del pH en estas etapas que es muy marcado en el queso de Armada (Fresno, 1995). El predominio de estas cepas y su escaso carácter proteolítico concuerda también con los bajos niveles de proteólisis observados a lo largo de la maduración del queso de Armada.

Únicamente unas pocas cepas podrían considerarse algo más próximas al tipo 2, ya que presentan un aspecto más blanquecino y pulverulento.

En cualquier caso *G. candidum* es en si mismo un moho débilmente proteolítico (Fox y Law, 1991) y ni que decir tiene que en el queso de Armada las elevadas concentraciones de sal/humedad y los bajos pH observados (Fresno, 1994) contribuirían a reducir todavía más la actividad de las proteasas.

Por lo que respecta al papel de *G. candidum* en la lipólisis, varios autores han estudiado la actividad lipolítica de este moho. Según los trabajos efectuados por Sidebotton y col. (1991), *G. candidum* produce dos lipasas con distintas especificidades, la lipasa A (no específica) y la lipasa B (específica para ésteres de *cis*- $\Delta$ -9 ácidos grasos), que libera preferentemente ácidos grasos de 18 átomos de carbono con un doble enlace en la posición 9 (ácido oleico) (Tahoum y col., 1982), aunque también libera en baja proporción ácidos grasos saturados. En vista del perfil de ácidos grasos libres observado en el queso de Armada, *G. candidum* parece tener un papel importante en la degradación de los lípidos en las primeras etapas de la maduración. En este queso la relación existente entre los ácidos grasos mayoritarios C<sub>16</sub>/C<sub>18:1</sub> es muy baja (0,5) y favorable al C<sub>18:1</sub> lo que concuerda con la actividad de la lipasa B de *G. candidum*. Esta relación se va incrementando hasta 0,85 (Fresno, 1994) a medida que *G. candidum* va disminuyendo a partir del segundo mes de maduración.

*G. candidum* se encuentra presente en la superficie de muchos quesos (Gueguen y Lenoir, 1976), donde los altos niveles de ácidos grasos encontrados se deben fundamentalmente a la acción de sus enzimas. Esta especie ejerce una protección frente al desarrollo de mohos indeseables (Dale, 1972; Delespaul y col., 1973; Gueguen y col., 1974).

En las últimas etapas de la maduración predominan los mohos del género *Penicillium*, sobre todo *P. roqueforti* que fue aislado en queso de 16 semanas en 2 de las 4 partidas estudiadas. Obviamente los niveles de *P. roqueforti* hallados en el queso de Armada están muy por debajo de los observados en quesos de vena azul (González de Llano y col., 1992; El Dairouty y col., 1990). La presencia de esta especie en las últimas etapas de la maduración del queso de Armada puede explicarse por la presencia de grietas en algunos ejemplares que facilitan la implantación en el interior de la masa.

*Penicillium roqueforti* posee una acción proteolítica intensa (Gripon y col., 1977), lo que no concuerda demasiado con los bajos niveles de proteólisis observados en el queso de Armada y los elevados valores de cociente sal/humedad (Fresno, 1995) sean los responsables de la baja actividad de sus enzimas en este queso. Se sabe que la actividad de las proteasa de *P. roqueforti* disminuye al aumentar la concentración de sal por encima del 0,5% (Kinsella y Hwang, 1977). Por otra parte se ha observado una gran variabilidad en la actividad proteolítica de la cepa de *P. roqueforti*, poniéndose de manifiesto que, en general, las que poseen una elevada actividad proteolítica tienen baja capacidad lipolítica y viceversa (Salvadori y col., 1964; Niki y col., 1966). Dada la intensa lipólisis sufrida por el queso de Armada (Fresno, 1994) y la posible participación de *P. roqueforti* en este proceso, que a continuación pasaremos a comentar, cabe la posibilidad de que las cepas de *P. roqueforti* presentes en este queso sean débilmente proteolíticas. La capacidad proteolítica de las especies de *Penicillium* presentes en el queso de Armada, puede verse también inhibida por las elevadas concentraciones de ácidos grasos libres generados durante la maduración (Imamura, 1960). En cuanto a la posible participación de *P. roqueforti* (y de las otras especies de *Penicillium* aisladas) en los procesos lipolíticos que tienen lugar durante la maduración del queso de Armada, su presencia podría estar relacionada con el marcado incremento en el contenido en ácidos grasos libres totales, y de cadena corta en particular, que se observa a partir del segundo mes de maduración (Fresno, 1994). Las lipasas de *P. roqueforti* poseen una actividad muy intensa, caracterizada por una gran producción de cáprico y otros ácidos grasos de cadena corta (Ha y Lindsay, 1993). Además esta actividad no se ve fuertemente inhibida por los bajos pHs ni por las concentraciones de sal/humedad elevadas, siendo capaces de actuar a pHs en torno a 5 (Tomasini y col., 1993) y a concentraciones de sal/humedad de aproximadamente el 8% (King y Clegg, 1979).

## 5. BIBLIOGRAFÍA

**ARAN, N. y EKE, D.** (1987). Mold mycoflora of Kasar cheese at the stage of consumption. *Food Microbiology*, 4:101-104.

**ARNOLD, R.G., SHAHANI, K.M. y DWIIVE, B K.** (1975). Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. *J. Dairy Sci.*, 58:11 27- 11 43.

**BOLCATO, V., SPETTOLI, P. y PERUFFO, A.D.** (1973). Amino acid regulation of proteases of some *Penicillia* for Gorgonzola cheese. *Milchwissenschaft*, 28:225.

**BOLDINGH, J. y TAYLOR, R J.** (1962). *Nature*, 194:909-913. Citado por Law (1984).

**BULLERMAN, L.B.** (1981). Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.*, 64:2439-2452.

---

**CIEGLER, A., FENNELL, D.I., SANSING, G A, DETROY, R.W. y BENNETT, G.A.** (1973). Mycotoxin-producing strains of *P. viridicatum*, classification into subgroups. *Appl. Microbiol.*, 26:271-278.

**DALE, G.** (1972). Moisissures et levures de la flore du fromage de st-Nectaire. *Revue Lait. Frse "Industr. Lait."*. 296:1 99-203.

**DE BOER. E.** (1 988). Food preservatives. En *introduction to food-borne fungi*, 3 ed. Samson, R.A. y Van Reenen-Hoekstra, E.S. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn. Netherlands.

**DELESPAUL, G., GUEGUEN, M. y LENOIR, J.** (1 973). La flore fongique superficielle des fromages de st-Nectaire et de Tome de Savoie. Son évolution au cours de l'affinage. *Revue Lait. Frse. "Industr. Lait."*, 313:715-729.

**DESMAZEAUD, M.J., GRIPON, J.C., LE BARS, D. y BERGERE, J.L.** (1976). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des micro-organismes (*Streptococcus lactis*, *Penicillium caselcolum* et *P. roqueforti*. *Lait*, 56:379-396.

**DZIEZAK, J.D.** (1 986). Preservative systems in foods, Antimicrobial agents. *Food Technology*, 40:104-110.

**EITENMILLER, R.R., VAKIL, J.R. Y SHAHANI, K.M.** (1970). Production and proprieties of a *P. roqueforti* liase. *J. Food Sci*, 35:1 30-1 33.

**EL DAIROUTY, R.K., EL SAYED, A.M.A., EL-SENAITY, M M., TAWFEK, N.F. Y SHARAF, O.M.** (1990). Chemical and microbiological changes in Roquefort style cheese during ripening. *Ecology of Food Nutrition*, 24:89-95.

**ENGEL, G. Y TEUBER. M.** (1978). Simple aid for the identification of *P. roqueforti* Thom. Growth in acetic acid. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6:107-111

**ESCOULA, L. Y LE BARS, J.** (1973). Etudes sur la mycoflore des ensilages. II. Croissance d'espèces fongiques en anaèrobose. *Ann. Rech. Vètèir.*, 2:253-264.

**FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C. Y SVENDSEN J.A.** (1983). Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:581-585.

**FILTENBORG, O. y FRISVAD, J.C.** (1980). A simple screening-method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 13:128-130.

**FOX, P. F. y LAW, J.** (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnol.*,

---

**FRESNO, J.M.** (1994). Tipificación y estudio bioquímico del proceso madurativo del queso de Armada. Tesis Doctoral. Universidad de León.

**FRESNO, J.M., TORNADIJO, M.E., CARBALLO, J., GONZÁLEZ PRIETO, J. Y BERNARDO, A.** (1995). Characterization and biochemical changes during the ripening process of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*. En prensa.

**FRISVAD, J.C.** (1981). Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicilila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1: 568-579.

**FRISVAD, J.C.** (1985). Creatine sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 1:109-113.

**FRISVAD, J.C.** (1988). Fungal species and their specific production of mycotoxins. En *Introduction to food-borne fungi*, 3 cd. Samson, R.A. y van Reenen-Hoekstra, E.S.. Centrealbureau voor Schimmelcultures. Baarn. Netherlands.

**FRISVAD, J.C. y FILTENBORG, O.** (1983). Classification of terverticillate *Penicilila* based on profiles of micotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4B:1301-1310.

**GEHRING, R.F. y KNIGHT, S.G.** (1963). Fatty acid oxidation by spores of *P. roqueforti*. *J. Appl Microbiol.*, 11:1 66-170.

**GODINHO, M. y FOX, P F.** (1981). Ripening of blue cheese. Influence of salting rate on lipolysis and carbonyl formation. *Milchwissenschaft*, 36:476-478.

**GONZALEZ DE LLANO, D., RAMOS, M., RODRÍGUEZ, A., MONTILLA, A. Y JUAREZ, M.** (1992). Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. *int. Dairy Journal*, 2:121-135.

**GRIPON, J.C. y HERMIER, J.** (1974). Le système protéolytique de *P. roqueforti*. *Biochimie*, 56: 1323-1332.

**GRIPON, J C., DESMAZEAUD, M.J., LE BARS, D. y BERGERE, J.L.** (1977). Rôle of proteolytic enzymes of *Streptococcus lactis*, *Penicilium roqueforti* and *P. caseicolum* during cheese ripening. *J. Dairy Sci*, 60:1532.

**GUEGUEN, M., DELESPAUL, G. y LENOIR, J** (1974). La flore fongique superficielle des fromages de st-Nectaire et de Tome de Savote. II. Ses conditions de développement. *Revue Lait. Frse. "industr. Lait."*, 325:1-11.

**GUEGUEN, M. y LENOIR, J.** (1976). Characteristics of the proteolytic system of *G. candidum*. *Lait*, 56:439-448.



**GUEGUEN, M. y JACQUET, J.** (1982). Etudes sur les caracteres culturaux et la morphologie de *Geotrichum candidum* link. *Lait*, 62:625-644.

**HA, J.K. y LINDSAY, R.C.** (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *J. Dairy Sci.*, 76:677.

**HARRIGAN, W.F. y Mc CANCE. M.E.** (1979). *Métodos de laboratorio en Microbiología de alimentos y productos lácteos*. Academia. León.

**HAWKE, J.C.** (1966). The formation and metabolism of methyl ketones and related compounds, review. *J. Dairy Res.*, 33:225.

**HEMME, D., BOVILLANNE, C., MÉTRO, F. y DESMAZEAUD, M.J.** (1982). *Sci. Aliments*, 2: 113-123. (Citada por Law, B.A. (1984)).

**HIROMI, M. y VAN DEUDER, A.G.F.** (1992). Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. *J. Food Prot.*, 55:187-191.

**IMAMURA, T.** (1960). Studies on the changes of milk proteins by *Penicillium roqueforti*. *J. Agric. Chem. Soc.*, 34:892.

**JACQUET, J., VILLETE, O., DELACROIX, J., GONDOUIN. H. y DESFLEURS, M** (1957). Considerations sur l'action du pH dans la croissance des moisissures utilisées pour la fabrication du Camembert. Rôle du sel. *Bull. Soc. Linn. Norm.*, 8:115-132.

**KING, R.D. y CLEGG, G.H.** (1979). The metabolism of fatty acids, methyl ketones and secondary alcohols by *P. roqueforti* in blue cheese slurries. *J. Sci. Food Agric.*, 30:197-202.

**KINSELLA, J.E. y HWANG, D.H.** (1976). Enzymes of *P. roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8:191-228.

**KUROGOCHI, S., TAHARA, S. y MIZUTANI, J.** (1974). Fungal metabolites of sorbic acid. *Agr. Biol. Chem.*, 38:839-895.

**LARROCHE, C., TALLU, B. y GROS. J.B.** (1988). Aroma production by spores of *P. roqueforti* on a synthetic medium. *J. Indust. Microbiol.*, 3:1-8.

**LATRASSE, A., DAMERON, P., HASSANI, M. y STARON, T.** (1987). Production of a fruity aroma by *G. candidum* (Staron). *Sciences des Aliments*, 7:637-645.

---

**LAW, B.A.** (1984). Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses. *Progress in industrial Microbiology*, 19:245-283.

**LAWRENCE, R C. y HAWKE, J.C.** (1 968). The oxidation of fatty acids by micelium of *P. roqueforti*. *J. Gen. Microbiol.*, 46:393-405.

**LEISTNER, L.** (1986). Mould-ripened foods. *Fleischwirtsch*, 66:1385-1388.

**LEVINE, A.S. y FELLERS, C.R.** (1939). Action of acetic acid on food spoilage microorganisms. *J. Bacteriol.*, 39:499-515.

**LIEU, F.Y. y BULLERMAN, L.B.** (1977). Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several sustrates. *J. Food Sci.* 42:1222-1 224, 1228.

**LIEWEN, M.B. y MARTH, E.H.** (1985). Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid, a review. *J. Food Prot.*, 48 364-375.

**LIEWEN, M.B. y MARTH, E.H.** (1984). Inhibition of *Penicilila* and *Aspergilli* by potasium sorbate. *J. Food Protect.*, 47:554-556.

**MARTH, E.H., CAPP, C.M., HAENZAHL, L., JACKSON, H.W. y HUSSONG, R.V.** (1966). Degradation of potasium sorbate by *Penicilium species*. *J. Dairy Sci.*, 49: 1197-1205.

**MELNICK, D., LUCKMANN, F.H. y GOODING, C.H.** (1954). Sorbic acid as a fungistatic agent for foods VI. Metabolic degradation of sorbic acid in cheese by molds and the mechanism of mold inhibition. *Food Res.* . 1 9:44 5R

**MENASSA. A. y LAMBERT. G.** (1982). Lait, 62:32-43. Citado por Choisy, C., Desmazeaud, M J., Gripon, J C, Lamberet, G., Lenoir, J. y Tourneur, C., en el capitulo 4 (Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado). El queso. (André Eck, ed (1990). Omega. Barcelona.

**MODLER, H., BRUNNER, J.R. y STINE, C.M.** (1974). Extracellular protease of *P. roqueforti*. II. Characterization of a purified enzyme preparation. *J. Dairy Sci.*, 57:528-534

**MOREAU, C.** (1980). Le *P. roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Lait*, 60:254-271.

**MORRIS, JEZESKI, J.J., COMBS. W.B. y KURAMOTO. S.** (1 963). Free fatty acid. tyrosine and pH changes during ripening of blue cheese made from variously treated milks. *J. DairY Sci.*. 46:1.

---

**MORRIS, H.A. y JEZESKI, J.J.** (1973). The action of microorganisms on fats. II. Some characteristics of the lipase system of *P. roqueforti*. *J. Dairy Sci.* 36:1 285.

**NAKAMOURA, Y., OHTA, M. y LLENO, Y.** (1977). Reactivity of 12, 13-epoxytrichothecenes with epoxide hydrolase, glutathione-S-transferase and glutathione. *Chem. Pharm. Bull.*, 25:3410-3414.

**NIKI, T., YOSHIOKA, Y. y AHIKO, K.** (1966). Proteolytic and lipolytic activities of *Penicillium roqueforti* isolated from blue cheese. *Proc. 17 Th Int. Dairy Congr. Vol. D International Milchwirtschaftskongress Munchen* D: 531.

**NORTHOLT, M.D., VAN EGMOND, H.P. y PAULSCH, W.E.** (1979). Penicillic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.*, 42:476-484.

**PAQUET, J. y GRIPON, J.C.** (1980). Intracellular peptide hydrolases of *P. roqueforti*. *Milchwissenschaft*, 35:72-74.

**PARKS, O.W., KEENEY, M., KATZ, I. y SCHWARTZ, D.P.** (1964). Isolation and characteristics of the methyl ketone precursor in butter fat. *J. Lipid Res.*, 5:232.

**PITT, J.I.** (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia*, 65:1135-1157.

**PITT, J.I.** (1987). *P. viridicatum*, *P. verrucosum* and production of ocratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:266-269.

**PITT, J.I.** (1988). *A laboratory guide to common Penicillium species*. 2nd edn. CSIRO Division of Food Research. North Ryde, N.S.W. Australia.

**RAMÍREZ, C.** (1982). *Manual and atlas of the Penicilia*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.

**RAPER, K.B. y THOM, C.** (1968). *A Manual of the Penicillia*. Hafner Publ. Co., New York.

**SALVADORI, P., BIANCHI, B. y CAVALLI, V.** (1964). Study on the action of aminoacids on penicillia used in making blue-veined cheese. *Lait*, 44:129.

**SAMSON, R.A. y VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S.** (1988). *Introduction to food-borne fungi*. 3rd. ed. Centrealbureau voor schimmelcultures. Baarn. The Netherlands.

**SCOTT, P.M.** (1981). Toxins of *Penicillium* species used in cheese manufacture. *J. Food Prot.*, 44:702-710.

**SCOTT, P.M. y KANHERE, S.R.** (1979). Instability of PR-toxin in blue cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62:141-147.

**SHIPE, W.F.** (1951). A study of relative specificity of lipases produced by *P. Roqueforti* and *A. niger*. *Arch. Biochem.*, 30:165.

**SIDEBOTTOM, C.M., CHARTON, E., DUNN, P.P.J., MYCOCK, G., DAVIES, C., SUTTON, J L, MACRAE, A. R. y SLABAS, A.R.** (1991). *G. candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *European Journal of Biochemistry*, 202: 485-491

**SMITH, G.** (1983a). Some new species of *Penicillium* and some observations on the taxonomy of the genus. *Trans. Br. mycol Soc.*, 46:331-337.

**SMITH, G.** (1963b). *Introducción a la Micología industrial*. Acribia. Zaragoza.

**TAHOUN, M.K., MOSTAFA, R. Y ABOU-DONIA, S.** (1982). Lipase induction in *G. candidum*. *Milchwissenschaft*, 37:86-88.

**TANIWAKI, M.H. y VAN DENDER, A.G.F.** (1992). Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. *J. Food Prot*, 55:187-191.

**VADILLO, S., PAYA, M.J., CUTULI DE SIMON, M.T. y SUAREZ, G.** (1987). Raw milk mycoflora. *Milchwissenschaft*, 42:20-22.

**VEAU, P., SAMSON, R.A. y BRETON, A.** (1981). Etude comparée de *P. roqueforti* et *P. verrucosum* var. *cyclopium*. *Lait*, 61:370-380.

**WONG, N P., ELLIS; R., LACROIX, D.E. y ALFORD, J.A.** (1973). *J. Dairy Sci.*,56:636. Citado por Law (1984)

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.-** La leche utilizada en la elaboración del queso de Armada, variedad Sobado, presentó recuentos elevados de todos los grupos microbianos investigados. Los máximos recuentos de todos estos grupos se alcanzaron, generalmente, en queso de una semana. A partir de ese momento los niveles fueron descendiendo lenta e irregularmente, alcanzándose, después de 16 semanas de maduración, en los lotes madurados en otoño, recuentos aproximadamente una unidad logarítmica más bajos que los obtenidos en queso de una semana. En los lotes madurados en verano, el descenso de los recuentos a lo largo de la maduración fue más pronunciado; los recuentos al cabo de 16 semanas fueron en los diferentes grupos microbianos, por término medio, del orden de 4,5 unidades logarítmicas más bajos que los observados en queso de una semana.

**SEGUNDA.-** De acuerdo con los coeficientes de correlación establecidos entre los logaritmos de los recuentos de los distintos grupos microbianos y los valores de los diferentes parámetros físico-químicos a lo largo del proceso madurativo, la caída de los recuentos a lo largo de la maduración parece deberse fundamentalmente al descenso de la actividad del agua. No obstante, los bajos valores de pH observados durante la mayor parte del proceso, en el rango entre 4,3 y 4,8, podrían tener un papel destacado en el descenso de los niveles de algunos grupos de microorganismos.

**TERCERA.-** La flora acidoláctica fue el grupo microbiano mayoritario durante la elaboración y maduración. El agar M17 mostró una selectividad moderada para el aislamiento de lactococos. El agar MSE fue escasamente selectivo para el aislamiento de leuconostoc, si bien es verdad que casi todas las cepas pertenecientes a este género fueron aisladas en este medio de cultivo. El agar ROGOSA, finalmente, mostró una selectividad bastante elevada para el aislamiento de lactobacilos.

**CUARTA.-** Considerando globalmente los recuentos obtenidos en los tres medios de cultivo (agar M17, MSE y ROGOSA) y la identidad de los aislamientos efectuados,

---

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* fue la especie mayoritaria en leche, cuajada y queso de una y dos semanas de maduración. La presencia de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fue muy minoritaria. A partir de la segunda semana de maduración predominan los lactobacilos, fundamentalmente *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus plantarum*. La especie de *Leuconostoc* mayoritariamente aislada durante la elaboración y maduración fue *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

**QUINTA.-** A juzgar por los estudios efectuados en otras variedades de queso, y por el nivel de presencia de esta especie en el queso de Armada, variedad Sobado, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* podría jugar un papel relevante en el desarrollo de las características organolépticas de esta variedad. Los lactobacilos heterofermentadores se aislaron en una proporción vestigial.

**SEXTA.-** El medio KAA mostró una selectividad muy elevada para el aislamiento de enterococos a lo largo de la elaboración y maduración. La especie mayoritaria, entre los aislamientos efectuados en este medio de cultivo, fue *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecalis* fue también la especie de *Enterococcus* mayoritariamente aislada en agar M17. En agar MSE, sin embargo, la especie de *Enterococcus* predominante fue *Enterococcus malodoratus*.

**SÉPTIMA.-** Las enterobacteriáceas desaparecieron por completo a las dos semanas de maduración en dos lotes y a las 4 semanas en los otros dos lotes estudiados. Considerando globalmente todos los puntos de muestreo *Hafnia alvei* fue la especie de enterobacteria mayoritariamente aislada, lo que concuerda con observaciones previamente efectuadas por otros autores. *Escherichia coli* predominó en queso de 2 semanas de maduración, suceso relacionado con la mayor resistencia que presenta este microorganismo a la acidez elevada y a la actividad del agua baja.

**OCTAVA.-** Por su significación sanitaria es relevante el aislamiento de dos cepas de *Yersinia enterocolitica* en leche. Según los criterios de Stern y Pierson, estas cepas fueron catalogadas como "atípicas ambientales".

**NOVENA.-** El medio MSA mostró escasa selectividad para el aislamiento de Micrococáceas. A lo largo de la elaboración y maduración del queso de Armada se han aislado estafilococos en mayor proporción que micrococos. *Staphylococcus sciuri* fue la especie mayoritariamente aislada en leche y cuajada. En queso predominaron *S. xylosus* y *S. epidermidis*. *Staphylococcus aureus* se aisló únicamente en cuajada de uno de los 4 lotes estudiados. Las cepas de micrococos se adscribieron mayoritariamente a las especies *Micrococcus varians* y *M. roseus*.

**DÉCIMA.-** De las 41 cepas de estafilococos coagulasa-negativos aisladas, sólo 2 cepas de *Staphylococcus sciuri* aisladas de leche produjeron enterotoxina C. Las tres cepas de

---

*S. aureus* produjeron enterotoxinas A y C. El perfil toxigénico de las cepas aisladas parece sugerir que son de origen caprino.

**UNDÉCIMA.-** A lo largo de la maduración predominaron las levaduras anascosporógenas del género *Candida*. *Candida lambica* estuvo mayoritariamente presente durante todo el proceso madurativo; sólo fue cuantitativamente superada por *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis* en queso de 1 semana y por *Candida krusei* en queso de 16 semanas.

**DUODÉCIMA.-** Sólo las cepas de *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* fueron capaces de asimilar y fermentar la lactosa lo que nos lleva a concluir que la mayoría de las especies de levaduras aisladas del queso de Armada, variedad Sobado, son contaminantes casuales y no flora propia de la leche y el queso. Las cepas de *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* posiblemente contribuyan, junto con las bacterias acidolácticas y las cepas de *Geotrichum candidum* a la degradación de la lactosa durante las primeras etapas de la maduración.

**DECIMOTERCERA.-** Las levaduras aisladas del queso de Armada no parecen tener gran participación en los procesos lipolíticos. De las 128 cepas aisladas, sólo 9 (2 cepas de *Candida ingens*, 4 de *Candida lipolytica* y 3 de *Trichosporon beigelii*) hidrolizaron la tributirina.

**DECIMOCUARTA.-** *Geotrichum candidum* fue la especie fúngica mayoritariamente aislada en leche, cuajada y queso de 1, 2 y 4 semanas de maduración. En queso de 16 semanas predominan los mohos del género *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. crustosum* y *P. commune*). Las cepas de *Geotrichum candidum* aisladas pertenecen morfológicamente al tipo 1 de Gueguen y Jacquet (cepas similares a levaduras, de color crema, principalmente acidificantes y con baja capacidad proteolítica). Estas cepas posiblemente contribuyan al descenso del pH en las etapas tempranas de la maduración, fenómeno que es muy marcado en el queso de Armada. El predominio de estas cepas y su escaso carácter proteolítico concuerda también con la escasa proteolisis que presenta este queso. *Penicillium roqueforti* y las otras especies de *Penicillium* aisladas podrían estar relacionadas con el marcado incremento en el contenido en ácidos grasos libres totales, y de cadena corta en particular, que se observa en el queso de Armada a partir del segundo mes de maduración.





## APÉNDICE

### 1.- MEDIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

**MSE AGAR** (Mayeux, Sandine y Elliker, 1962) (Biokar):

Se disuelven 138,5 g del medio en 1 litro de agua destilada y se esteriliza en autoclave a 110°C/20'.

Composición (g/l):

Triptona	10,0
Gelatina	2,5
Extracto de levadura	5,0
Sacarosa	100,0
Glucosa	5,0
Citrato sódico	1,0
Azida sódica	0,075
Agar bacteriológico	15,0
pH 6,9±0,2	

---

**M17 AGAR** (Biokar) (Terzaghi y Sandine, 1975)

Se disuelven 57,2 g del medio en 1 litro de agua destilada y se esteriliza en autoclave a 115°C/20'.

Composición (g/l):

Triptona	2,5
Peptona de carne	2,5
Peptona de harina de soja	5,0
Extracto de levadura	2,5
Extracto de carne	5,0
Lactosa	5,0
Glicerofosfato sódico	19,0
Sulfato magnésico	0,25
Ácido ascórbico	0,50
Agar bacteriológico	15,0

pH 7,1±0,1

**ROGOSA AGAR** (Rogosa, Mitchell y Wiseman, 1951) (Oxoid):

Se disuelven 82 g del medio en 1 l de agua destilada, se añaden 1,32 ml de ácido acético glacial y se mezcla, se hierve durante 2-3 minutos, no se autoclava.

Composición (g/l):

Triptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Tween	801,0
Dihidrógenofosfato potásico	6,0
Citrato amónico	2,0
Acetato sódico (anhidro)	17,0
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,575
Sulfato de manganeso (II) 4 hidrato	0,12
Sulfato ferroso 7 hidrato	0,034
Agar	20,0

pH 5,4±0,2

**MRS AGAR** (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) (Oxoid):

Se disuelven 62 g en 1 l de agua destilada y se lleva a ebullición, se esteriliza en autoclave a 121°C/15'.

## Composición (g/l):

Peptona	10,0
Polvo "Lab-Lemco"	8,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Tween	801,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato sódico 3 hidrato	5,0
Citrato triamónico	2,0
Sulfato de magnesio 7 hidrato	0,2
Sulfato de manganeso (II) 4 hidrato	0,05
Agar	10,0

pH 6,2±0,2

**MEDIO SEMISÓLIDO DE GIBSON** (Gibson y Abd-El-Malek, 1945) (Adsa-Micro):

Se disuelven 58 g del medio base en 500 ml de agua destilada y se lleva a ebullición, se distribuye en un frasco de 1 litro de capacidad y se esteriliza a 121°C/15'. Se mantiene en baño maría a 60°C aproximadamente.

Se diluyen 100 g de leche descremada en 500 ml de agua destilada templada y se esteriliza en autoclave a 121°C/10'.

La leche descremada caliente se vierte sobre el medio base, se homogeneiza y se distribuye en tubos estériles.

## Composición del medio base (g/l):

Extracto de carne	0,20
Extracto de levadura	3,0
Peptona	1,0
Cloruro sódico	1,0
Dextrosa	50,0
Sulfato de manganeso (II) 4 hidrato	0,04
Agar	3,0

En un frasco aparte se presenta la leche descremada en polvo (100 g/l).

**AGAR SACAROSA** (Garvie, 1960):

Composición (g/l):

Triptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Fosfato dipotásico	5,0
Citrato triamónico	5,0
Sacarosa	50,0
Agar	15,0

Se disuelven los ingredientes en el agua y se esteriliza a 121°C/15'.

**CALDO GLUCOSA-FOSFATO** (Harrigan y Mc Cance, 1979):

Composición (g/l):

Peptona	5,0
D-Glucosa	5,0
Fosfato dipotásico	5,0

Se esteriliza a 115°C/20'. El pH es de aproximadamente 7,5.

**Reactivos** (Método de Barrit, 1936):

Solución etanólica de  $\alpha$ -naftol al 6%

Solución de KOH al 16%.

**AGAR CITRATO DE SIMMONS** (Simmons, 1926) (A report, 1958) (Adsa-Micro):

Se disuelven 24 g del medio en 1 l de agua destilada y se esteriliza a 121°C/15'.

Composición (g/l):

Sulfato magnésico	0,2
Fosfato monoamónico	1,0
Fosfato dipotásico	1,0
Citrato sódico	2,0
Cloruro sódico	5,0
Azul de bromotimo	10,08
Agar	15,0
pH aproximado	6,8.

**AGAR SEMISÓLIDO CITRATO LECHE** (Crawford, 1962) (para lactobacilos):

1.- Se preparan 500 ml de leche descremada reconstituida y se reparte en tubos de ensayo, a razón de 10,5 ml por tubo. Se esteriliza en autoclave calentando a 100°C durante 30' y luego a 115°C durante 10'.

2.- Se preparan 100 ml de una solución de citrato sódico 2 hidrato al 10% en agua destilada, se reparte en cantidades de 10 ml y se esteriliza a 121°C durante 20'.

3.- Se disuelven 2 g de agar en 100 ml de agua destilada y se reparte en tubos de ensayo a razón de 4 ml. Se tapa con tapones de goma Astell y se esteriliza a 121°C durante 20'.

Para la preparación y utilización del medio completo se añaden 0,5 ml de la solución estéril de citrato sódico al 10% a cada tubo de leche desnatada, se invierten los tubos para mezclar bien el contenido y se dejan en reposo durante 30'. Cuando se vayan a utilizar se inocula un 1% de cultivo (0,1 ml) en la leche citratada y se mezcla bien por rotación del tubo entre las manos y a continuación se vierte sobre los 4 ml de agar fundido al 2% y enfriado a 45-50°C, se tapa, se invierte el tubo para mezclarlo bien y se incuba a la temperatura óptima.

### **MEDIO DE FERMENTACIÓN MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960):**

Composición (g/l):

Peptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Tween	801 ml
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato sódico	5,0
Citrato triamónico	2,0
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,2
Sulfato de manganeso (II) 4 hidrato	0,05

Los ingredientes se disuelven en el agua y se ajusta el pH. Se esteriliza a 121°C/15'. Para lactococos y leuconostoc el pH se ajustó aproximadamente a 7,0; para los lactobacilos se prefirió un pH ligeramente más ácido (6,0-6,5).

## **2.- MEDIOS EMPLEADOS EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCOS**

**KAA (Kanamycin-Aesculin-Azide-Agar-Base) (Oxoid):**

(Kanamicina-Esculina-Azida-Agar)

Se disuelven 21,3 g en 500 ml de agua destilada y se añade un vial del suplemento Kanamicina, reconstituído. Se esteriliza a 121°C/15'.

Composición (g/l) del KAA (Oxoid):

Triptona	20,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro sódico	5,0
Citrato sódico	1,0
Esculina	1,0
Citrato férrico amónico	0,5
Azida sódica	0,15
Agar	10,0
pH 7,0±0,2	

**TSB (Tryptone-Soya-Broth) (Oxoid):**

(Caldo peptona de caseína-peptona de harina de soja)

Se disuelven 30 g en 1 litro de agua destilada y se esteriliza a 121°C/15'.

## Composición (g/l):

Peptona de caseína	17,0
Peptona de harina de soja	3,0
Cloruro sódico	5,0
Hidrógeno fosfato dipotásico	2,5
Glucosa	2,5
pH 7,3±0,2	

**MEDIO SEMISÓLIDO DE GIBSON (Adsa-Micro):**

(Ver página 283).

**BHI (Brain-Heart-Infusion) (Oxoid):**

(Caldo de cerebro-corazón)

37 g del medio se diluyen en 1 litro de agua destilada y se esteriliza a 121°C/15'.

## Composición (g/l)

Infusión de cerebro de ternero	12,5
Infusión de corazón de buey	5,0
Proteosa-peptona	10,0
Cloruro sódico	5,0
Dextrosa	2,0
Fosfato disódico anhidro	2,5
pH aproximadamente 7,4	

**KF (KF Streptococcus Agar) (Difco):**

(Agar KF para estreptococos)

Disolver 76,4 g del medio en 1 l de agua destilada, calentar durante 5' aproximadamente. No esterilizar.

Una vez enfriado a 50°C añadir 1 ml de solución TTC (2, 3, 5 cloruro de trifenil-tetrazolio) al 1% por cada 100 ml de medio y mezclar.

## Composición (g/l):

Proteosa-peptona	10,0
Extracto de levadura	10,0
Cloruro sódico	5,0
Glicerofosfato sódico	10,0
Maltosa	20,0
Lactosa	1,0
Azida sódica	0,4
Púrpura de bromocreso	10,015
Agar	20,0
pH 7,2±0,2	

**BILE ESCULIN AGAR (Difco):**

(Agar bilis esculina)

Se disuelven 64 g del medio en 1 l de agua destilada y se esteriliza a 121°C/15'.

## Composición (g/l):

Extracto de carne de buey	3,0
Peptona	5,0
Esculina	1,0
Bilis de buey	40,0
Citrato férrico	0,5
Agar	15,0
pH 6,6±0,2	

**3.- MEDIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIÁCEAS****VRBGA** (Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Glucosa-Agar) (Oxoid):

Se disuelven 38,5 g en 1 litro de agua destilada, se lleva a ebullición. No se esteriliza.

## Composición (g/l):

Extracto de levadura	3,0
Peptona	7,0
Cloruro sódico	5,0
Sales biliares No.3	1,5
Glucosa	10,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002
Agar	12,0
pH 7,4±0,2	

---

**CALDO GLUCOSA-FOSFATO** (Harrigan y Mc Cance, 1979):

(Se emplea para la prueba del Rojo de Metilo)

Composición (g/l):

Peptona	5,0
D-glucosa	5,0
Fosfato dipotásico	°5,0

Los componentes se disuelven en agua y se ajusta el pH aproximadamente a 7,5. En cada tubo se dispensan 5 ml y se esteriliza en autoclave a 115,5°C/20'.

**Reactivo:**

Rojo de metilo	0,1g
Etanol (al 95%)	300 ml

Después se añade agua destilada hasta 500 ml.

**MEDIO O/F** (Medio de Oxidación-Fermentación):

(Para detectar la formación de gas a partir de la glucosa o lactosa):

Composición del medio base (g/l):

Triptona	2,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico	0,3
Azul de bromotimo	10,08
Agar	2,0

El pH final es aproximadamente 6,8.

El medio se reparte en volúmenes de 4,5 ml y se esteriliza a 121°C/15'. A cada tubo se añaden 0,5 ml de glucosa o lactosa al 10% (filtrada) para obtener una concentración final del 1% de azúcar en cada tubo.

**CALDO GLUCONATO** (Shaw y Clarke, 1955):

Composición (g/l):

Peptona	1,5
Extracto de levadura	1,0
Fosfato dipotásico	1,0
Gluconato potásico	40,0

Se ajusta el pH aproximadamente a 7,0 y se esteriliza a 115°C/10'.

Se disuelven los componentes y se distribuyen 5 ml en tubos de ensayo,



**Reactivo de Benedict:****Composición (g/l):**

Sulfato de cobre (II) 5 hidrato	17,3
Carbonato sódico (anhidro)	100,0
Citrato sódico	173,0

Para preparar el reactivo se disuelven el carbonato y el citrato en 600 ml de agua destilada y se lleva hasta 850 ml, a continuación se disuelve el sulfato en 100 ml de agua destilada y se lleva hasta 150 ml, esta última disolución se añade a la primera lentamente y con agitación constante.

**CALDO MALONATO (Report, 1958):****Composición (g/l).**

Extracto de levadura	1,0
Sulfato amónico	2,0
Fosfato dipotásico	0,6
Fosfato monopotásico	0,4
Cloruro sódico	2,0
Malonato sódico	3,0
Azul de bromotimol	0,025

Se disuelven los componentes en el agua, se reparte el medio en volúmenes de 5 ml y se esteriliza a 121°C/15'.

**MEDIO M (Api 20E # 5012):**

(Para comprobar la movilidad)

**Composición (g/l):**

Caldo de corazón	25,0
Gelatina	53,0
Agar	3,0
pH 7,0±0,2	

Antes de inocular el medio se debe licuar en baño maría y luego dejar solidificar en posición vertical.

#### **4.- MEDIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS PARA EL AISLAMIENTO Y RECUENTO DE MICROCOCCÁCEAS**

**MSA(Mannitol Salt Agar) (Oxoid) (Chapman, 1945):**

Disolver 111 g del medio en 1 litro de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121°C/15'.

## Composición (g/l):

"Lab-Lemco" en polvo	1,0
Peptona	10,0
Manitol	10,0
Cloruro sódico	75,0
Rojo fenol	0,025
Agar	15,0
pH 7,5±0,2	

**BHI** (Brain Heart Infusion) (Oxoid):

(Ver página 287)

**ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS** (Hugh y Leifson, 1953):

## Composición del medio base (g/l):

Fosfato monoamónico	1,0
Cloruro potásico	0,2
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,2
Extracto de levadura	1,0
Púrpura de bromocreso	10,04
Agar	2,0
pH aproximadamente 7,0	

El medio se esteriliza en cantidades de 3,8 ml, a 121°C/15', una vez enfriado a 45°C se le añaden 0,2 ml de una solución filtrada de glucosa al 10%, consiguiendo así una concentración final de azúcar del 0,5%. Para estudiar la asimilación en anaerobiosis se echaron, en cada tubo sembrado, aproximadamente 2 ml de agar bacteriológico para crear condiciones de anaerobiosis.

Con el resto de los carbohidratos (excepto el manitol) se ensayó sólo la asimilación en aerobiosis para lo que se emplearon placas de agar. En este caso se añadió agar al 1,5%. Los azúcares se adicionaron al medio de modo que la concentración final fuera del 0,25-0,50%

**MEDIO DE HUGH Y LEIFSON MODIFICADO:**

Para determinar el metabolismo oxidativo y fermentativo de la glucosa y el manitol por *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Harrigan y Mc Cance, 1979).

## Composición (g/l):

Triptona	10,0
Extracto de levadura	1,0
D-Glucosa o Manitol	10,0
Púrpura de bromocresol al 1%	4,0 ml
Agar	2,0
pH aproximadamente 7,0	

Se disuelven los ingredientes en el agua en baño de agua hirviendo, se ajusta el pH aproximadamente a 7,0 y se reparte el medio en tubos de ensayo, llenando dos tercios de su volumen. Se esteriliza en autoclave a 115°C/20'. Inmediatamente antes de utilizar el medio se pone en baño de vapor durante 10 a 15 minutos para expulsar el oxígeno y se le deja solidificar colocando los tubos en agua fría o con hielo.

#### **BAIRD-PARKER (Oxoid) (Baird-Parker, 1962)**

Se disuelven 63 g en 1 litro de agua destilada y se esteriliza en autoclave a 121°C/15'. Se deja enfriar hasta 50°C aproximadamente y se añaden 50 ml del suplemento (SR54) emulsión yema de huevo-telurito, mezclando bien antes de distribuir en placas.

#### Composición (g/l):

Tripton	10,0
Polvo "Lab-Lemco"	5,0
Extracto de levadura	1,0
Piruvato de sodio	10,0
Glicina	12,0
Cloruro de litio	5,0
Agar	20,0
pH	6,8±0,2

#### **Reactivo de Nessler (Harrigan y Mc Cance, 1979).**

Para demostrar la producción de amoníaco.

Yoduro potásico	7,0g
Yoduro mercúrico	10,0 g
Hidróxido potásico	10,0 g
Agua destilada	100 ml

Ambos yoduros se disuelven en 40 ml de agua destilada, se disuelve la potasa en 50 ml de agua destilada y se enfría. Se mezclan ambas soluciones y se añade agua hasta 100 ml, se deja que sedimente el precipitado, se decanta el sobrenadante claro en un frasco de reactivos y el precipitado se desecha.

#### **MEDIO PARA DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE COAGULASA**

Se distribuye Caldo BHI en volúmenes de 5 ml por tubo, a continuación se reparte plasma de conejo conteniendo heparina o EDTA en tubos de tapón de rosca de 10×75 mm a razón de 0,3 ml por tubo. Se siembran los tubos de BHI con las cepas a ensayar y se incuban a 37°C durante 24 horas. Se pasan 0,1 ml del cultivo a los tubos con el plasma y se incuban a 37°C.

Los tubos se examinan a las 4 horas con el fin de detectar la presencia de coágulos, si no se observan se mantienen los tubos a temperatura ambiente y se vuelven a leer a las 24

horas. La aparición de un coágulo bien definido es indicativo de la actividad coagulasa. Hay que tener cuidado a la hora de diferenciar entre un seudocoágulo y un coágulo verdadero, los seudocoágulos se deshacen al agitar el tubo suavemente. El resultado positivo se cataloga desde 1+ (coágulos pequeños desorganizados) hasta 4+ (todo el contenido del tubo aparece coagulado y el coágulo se mantiene aún cuando se invierte el tubo) (ICMSF, 1982).

### **ESCULINA AZIDA AGAR BASE**

Se empleó el medio KAA (Kanamycin Aesculin Azide Agar Base) (Oxoid) prescindiendo de la adición del suplemento de kanamicina.

Se disolvieron 21,3 g en 500 ml de agua destilada y se esterilizó a 121°C/15'.

Composición (g/l):

Triptona	20,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro sódico	5,0
Citrato sódico	1,0
Esculina	1,0
Citrato férrico amónico	0,5
Azida sódica	0,15
Agar	10,0
pH 7,0±0,2	

**PRUEBA DE LA OXIDASA (Kovacs, 1956):**

En la superficie de un cultivo en agar BHI se vierten unas gotas del reactivo (solución acuosa de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%). Las colonias que dan reacción positiva a la oxidasa adquieren un tono rosado que en 10 a 30' pasa a ser rojo oscuro, púrpura y negro.

También se puede hacer una extensión de células en un trozo de papel de filtro y añadir luego unas gotas del reactivo.

**AGAR-ALMIDÓN (Harrigan y Mc Cance, 1979):**

Se vierten 10 ml de agar nutritivo en placas y se deja solidificar, a continuación se echan 5 ml de agar-almidón en la capa superficial.

La composición del agar-almidón es agar nutritivo y almidón soluble al 0,2-1,0%.

Se disuelve el almidón en el medio basal fundido y se esteriliza a 121°C/15'.

Para comprobar si hay hidrólisis del almidón se echan 5 a 10 ml de lugol en la superficie del cultivo.

**HIDRÓLISIS DEL TWEEN 80** (Sierra, 1957)

Se empleó el Medio de Sierra.

Composición (g/l):

Peptona	10,0
Cloruro cálcico hidratado	0,1
Cloruro sódico	5,0
Tween 80	10,0 ml
Agar	15,0
pH antes de esterilizar	7,0-7,4

El medio debe incluir una sal soluble de calcio para poder detectar el ácido graso que se libera en forma de sal de calcio precipitada.

Para disminuir la viscosidad del tween 80 se recomienda calentar a 45-50°C.

El medio se esteriliza a 115°C/20'.

Se hace una sola estría en el medio o bien se siembra en botón. La actividad lipolítica se verifica por la formación de un halo opaco alrededor de la colonia que se compone de sales de calcio de los ácidos grasos libres.

**PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER** (Harrigan y Mc Cance, 1979):

Para detectar la producción de acetoína.

El medio que se empleó fue el Caldo Glucosa.

Composición (g/l):

Triptona	10,0
Lab-Lemco	3,0
Extracto de levadura	1,0
Glucosa	20,0

Los reactivos empleados para visualizar la reacción fueron:

Modificación de Barrit (Barrit, 1936): consiste en una solución etanólica de  $\alpha$ -naftol al 6% y de hidróxido potásico al 16%.

A 1 ml del cultivo se le añade 0,5 ml de cada uno de los reactivos anteriores, se agita y si se forma un precipitado rojo a los 5' la reacción es positiva. Este método detecta hasta 1 ppm de acetilmetilcarbinol o acetoína.

**FOSFATASA** (Harrigan y Mc Cance, 1979).

Se empleó el medio siguiente:

Agar extracto de levadura o agar nutritivo	100 ml
Solución de fosfato de fenolftaleína al 1%	1 ml

La liberación de fenolftaleína se verifica haciendo llegar vapores de hidróxido amónico al 22% a la superficie del cultivo. Las colonias que producen fosfatasa dan color rosa.

**REDUCCIÓN DE LOS NITRATOS**

Esta prueba se realizó con dos medios:

a) Composición (Harrigan y Mc Cance, 1979):

Agua de peptona	1 litro
Nitrato potásico	0,02-0,2 g

b) Composición (g/l) (Baird-Parker, 1963):

Triptona	1,0
Polvo "Lab-Lemco"	0,3
Extracto de levadura	0,1
Glucosa	0,1
Fosfato disódico	0,5
Nitrato sódico	0,02

Se esterilizan a 121°C/15'.

El medio se siembra y se incuba a 37°C durante 2 a 7 días. Para visualizar la reacción se emplean los reactivos de Griess-Ilosvay (modificado), que consisten en:

**Reactivo 1:**

Acido sulfanílico	1 g
Ácido acético 5N	100 ml

**Reactivo 2:**

$\alpha$ -naftol	1 g
Etanol al 95%	100 ml

Se echa 1 ml de cada uno de los reactivos anteriores. Una reacción positiva se caracteriza por la aparición de un color rojo que indica la presencia de nitritos. Si la reacción es negativa se añade al tubo una pizca de zinc en polvo. El zinc reduce a nitrito cualquier residuo de nitrato, dando color rojo. Si no se produce cambio de color la reacción es positiva, es decir los nitratos se habían transformado en nitritos y éstos en nitrógeno gaseoso.

**POLVO "LAB-LEMCO" (Oxoid).**

Composición (%):

Nitrógeno total 12,4

Nitrógeno amínico 2,5

Cloruro sódico 5,7

pH aproximadamente 7,2

**MEDIO CON NITRÓGENO INORGÁNICO (Holding, 1960):**

Composición (g/l):

D-Glucosa	5,0
Citrato sódico hidratado	1,0
Acetato sódico hidratado	1,0
Succinato sódico hidratado	1,0
Gluconato cálcico hidratado	1,0
Fosfato monoamónico	1,0
Fosfato dipotásico	0,08
Fosfato monopotásico	0,02
Nitrato potásico	1,0

Se disuelven los ingredientes hasta que hierva, se distribuye a razón de unos 5 ml por tubo y se esteriliza a 115°C/20'.

**5.- MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LEVADURAS****2% GLUCOSA EXTRACTO DE LEVADURA PEPTONA AGUA:**

Composición (g/l)

Glucosa	20,0
Bacto peptona	10,0
Bacto extracto de levadura	5,0

Se puede preparar el medio sólido añadiendo agar al 2% (p/v).

Se esteriliza a 121°C/15'.

**MEDIO BASAL DE FERMENTACIÓN DE WICKERHAM:**

Composición (g/l):

Extracto de levadura	4,5
Peptona	7,5
Azul de bromotimol	0,08
Aga	2,0

Se reparte en alícuotas de 2 ml y se esteriliza a 121°C/15'.

A cada tubo se añade 1 ml de la solución filtrada de azúcar al 6% (excepto para la rafinosa que se prepara al 12%).

### **MEDIO BASAL II:**

(para asimilación de azúcares)

Composición (g/l):

Bacto-yeast-nitrogen base (Difco)	6,7
Agar bacteriológico	20,0

Se reparte en tubos volúmenes de 18 a 20 ml y se esteriliza a 115,5°C/15'.

El cultivo de levadura se centrifuga y resuspende en 2 ml de solución salina fisiológica, repitiendo esta operación. Se vierten los 2 ml del inóculo en placas y a continuación el medio fundido, se mezcla y se deja solidificar. Una vez sólido se coloca en la superficie del medio una pizca del azúcar a ensayar, si el azúcar es asimilado se observa crecimiento en la zona de difusión del azúcar.

### **ASIMILACIÓN DE NITRATOS EN MEDIO LÍQUIDO (Wickerham, 1946):**

Composición (%):

Bacto-yeast-carbon base (Difco)	11,7
Nitrato potásico	0,78

Se esteriliza por filtración y se mezclan 0,5 ml de la solución anterior con 4,5 ml de agua destilada estéril.

### **CRECIMIENTO EN UN MEDIO SIN VITAMINAS:**

Composición (%):

Bacto-vitamin-free-yeast base (Difco)	16,7
---------------------------------------	------

Se esteriliza por filtración y luego se mezclan 0,5 ml de esta solución con 4,5 ml de agua destilada estéril.

### **AGAR UREA DE CHRISTENSEN (Christensen, 1946):**

Composición (%):

Bacto-urea-agar base (Difco)	29
------------------------------	----

Se esteriliza por filtración.

Por otro lado se disuelven 15 g de agar bacteriológico en 900 ml de agua destilada y se esteriliza a 121°C/15'. Se deja enfriar y luego se le añade la solución anterior, se mezcla y se



distribuye en tubos estériles, dejándolos solidificar inclinados (también se puede verter en placas).

**Composición del medio Bacto-urea-agar base (Difco) (g/l)**

Peptona	1,0
Glucosa	1,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato monopotásico	2,0
Urea	20,0
Rojo fenol	0,012

El pH final de este medio es aproximadamente 6,9.

**RESISTENCIA A LA CICLOHEXIMIDA (ACTIDIONA):**

(100 ppm de cicloheximida)

10 mg de actidiona se disuelven en 90 ml de agua destilada y se esteriliza por filtración. De esta solución 4,5 ml se distribuyen en tubos estériles, se añaden 0,5 ml de un concentrado (10 veces) de bacto-yeast-nitrogen base (BYN) y se agita para que se mezcle.

**Composición del concentrado de BYN (%):**

Bacto-yeast-nitrogen base	6,7
Glucosa	5,0

**AGAR GORODKOWA (Lodder, 1970):**

**Composición (g/l):**

Peptona	10,0
D-Glucosa	1,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	20,0

Se esteriliza a 121°C/15'.

**AGAR MAÍZ (Bernhardt, 1946):**

Harina de maíz	12,5 g
Agua destilada	300 ml

Se calienta durante 1 hora a 60°C en el baño maría y a continuación se filtra. Se añaden 3,8 g de agar y se esteriliza a 121°C/15', se re filtra en algodón y se esteriliza de nuevo a 121°C/15'.

**YEAST MORPHOLOGY AGAR (Difco):**

La composición se describe en "The Yeasts", pág. 82 (Lodder, 1970).

**AGAR MALTA:**

Composición (g/l):

Agar malta (Difco)	45
--------------------	----

Se esteriliza a 121°C/15'.

Composición del Agar Malta (Difco):

Extracto de malta	30 g
Agar bacteriológico	15 g

**AGAR ACETATO DE KLEYN (Kleyn, 1954):**

Composición (%):

Bacto triptosa	0,25
Glucosa	0,062
Cloruro sódico	0,062
Acetato sódico	0,5
Agar	2,0

Se esteriliza a 121°C/15'. El pH después de esterilizar es de 6,9-7,1.

**AGAR ACETATO DE Mc CLARY (Mc Clary y col., 1959):**

Composición (%):

Glucosa	0,1
Cloruro potásico	0,18
Extracto de levadura	0,25
Acetato sódico 3 hidrato	0,82
Agar bacteriológico	1,5

Se esteriliza a 121°C/15'.

**PATATA-DEXTROSA-AGAR (PDA):**

100 g de patatas peladas, lavadas y troceadas se mantienen en 300 ml de agua destilada durante varias horas en el refrigerador. Se filtra y autoclava 1 hora a 121°C.

230 ml de este extracto se mezclan con 770 ml de agua destilada, 20 g de agar y 20 g de glucosa y se esteriliza a 121°C/15'.

**MEDIO V8:**

Iguals cantidades de zanahorias, pepino, remolacha y patatas picadas o ralladas se mezclan con cantidades iguales de agua.

Se filtra después de esterilizar a 115,5°C durante 10'. El pH final aproximadamente es 5,7.

Se mezcla con extracto de levadura y con agar bacteriológico (los dos al 2%), se esteriliza a 121°C/15'.

#### **MEDIO ETANOL DE STARKEY:**

Composición (%):

Etano	10,5
Fosfato dipotásico	0,1
Fosfato monopotásico	0,025
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,025
Cloruro cálcico	0,005
Agar	2,0

Se esteriliza a 115,5°C/15'. El etanol se añade después de esterilizar.

#### **OXITETRACICLINA-GLUCOSA-EXTRACTO DE LEVADURA AGAR (OGYEA) (Oxoid):**

(Para el aislamiento selectivo de mohos y levaduras)

Se disuelven 37,0 g en 1 l de agua destilada y se esteriliza a 115,5°C/10'. A 500 ml de medio estéril se le adiciona asépticamente un vial de oxitetraciclina (Oxoid) rehidratado con 10 ml de agua destilada estéril, se mezcla y se vierte en placas de Petri. El pH después de la adición del suplemento es aproximadamente 7,0.

Composición del medio sin el antibiótico (g/l):

Extracto de levadura	5,0
Dextrosa	20,0
Biotina	0,0001
Agar bacteriológico	12,0

#### **6.- MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MOHOS:**

##### **AGAR CZAPEK (CZ):**

Composición (g/l):

Sacarosa	30,0
Nitrato sódico	3,0
Fosfato dipotásico	1,0
Cloruro potásico	0,5
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,5
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,01
Agar	15,0

Se esteriliza a 121°C/15' . El pH final es de 6,0-6,5.

Para evitar el crecimiento de colonias atípicas se añade 1 ml de una solución de elementos traza por litro de medio.

Composición (%) de la solución de elementos traza:

Sulfato de zinc 7 hidrato	1,0
Sulfato de cobre (II) 5 hidrato	0,5

**EXTRACTO DE LEVADURA CZAPEK AGAR (CYA) (Pitt, 1973):**

Composición (g/l):

Nitrato sódico	3,0
Fosfato dipotásico	1,0
Cloruro potásico	0,5
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,5
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,01
Extracto de levadura	5,0
Sucrosa	30,0
Agar	15,0

Se añade 1 ml de la solución de elementos traza por litro de medio y se esteriliza a 121°C/15'.

**AGAR EXTRACTO DE MALTA (MEA):**

Composición (g/l):

Extracto de malta	30,0
Bacto agar	15,0

Se esteriliza a 121°C/15'. El pH final se ajusta a 5,5 utilizando 0,17 ml de una dilución 1/10 de ácido láctico al 85% estéril, por cada 100 ml de medio.

**AGAR CREATINA SUCROSA (CREA):**

Composición (g/l):

Creatina	3,0
Sucrosa	30,0
Cloruro potásico	0,5
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,5
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,01
Fosfato dipotásico	1,3
Púrpura de bromocresol	0,05
Agar bacteriológico	15,0

Después de esterilizar a 121°C/15' se ajusta el pH aproximadamente a 8,0.

**AGAR NITRITOS:**

## Composición (g/l):

Sacarosa	30,0
Nitrito sódico	3,0
Fosfato dipotásico 3 hidrato	1,3
Solución mineral	10 ml
Agar	20,0

## Composición de la solución mineral (%):

Cloruro potásico	5,0
Sulfato magnésico 7 hidrato	5,0
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,1

**SOLUCIÓN CZAPEK-DOX:**

(Para comprobar la asimilación de nitritos en medio líquido)

## Composición (g/l):

Sacarosa	30,0
Nitrito sódico	3,0
Fosfato dipotásico	1,0
Cloruro potásico	0,5
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,5
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,01

**AGAR LECHE (30% leche) (Smith y col., 1952):**

(Para detectar la actividad proteolítica)

Se mezclan asepticamente 10 ml de una solución al 2,5% de agar, estéril y en caliente con 5 ml de leche desnatada reconstituída, también estéril y en caliente y se vierte en una placa. También puede emplearse para formar una capa fina sobre una base de 10 ml de agar previamente vertido y solidificado.

**AGAR 25% GLICEROL-NITRATO (G25N) (Pitt, 1973):**

## Composición:

Fosfato dipotásico	0,75
Concentrado Czapek	7,5 ml
Extracto de levadura	3,7
Glicerol (para análisis)	250 ml
Agar bacteriológico	12,0
Agua destilada	750 ml

## Composición del concentrado Czapek (%) (Pitt, 1973):

Nitrato sódico	30,0
Cloruro potásico	5,0

Sulfato magnésico 7 hidrato	5,0
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,1
Sulfato de zinc 7 hidrato	0,1
Sulfato de cobre (II) 5 hidrato	0,05

**AGAR EXTRACTO DE LEVADURA SUCROSA (YES):**

Composición (g/l):

Extracto de levadura	2,0
Sucrosa	15,0
Agar bacteriológico	2,0

**AGAR AVENA (OAT) (Difco):**

Se disuelven 72,5 gramos de agar avena en 1l de agua destilada. Se esteriliza a 121°C/15'.

Composición del agar avena (g/l) (Difco):

Harina de avena	60,0
Agar bacteriológico	12,5

**AGAR TRICAPROÍNA/AGAR TRIBUTIRINA:**

(Para estudiar la actividad lipolítica)

Composición (g/l):

Medio basal Czapek (sin sacarosa)	35,0
Cloruro cálcico 2 hidrato	0,4
Agar bacteriológico	20,0

Se esteriliza y una vez enfriado a 50°C se le añade 1g de tricaproína (glicerina tricaproato) (Agar tricaproína) o de tributirina (Agar tributirina) una vez esterilizada por litro de medio estéril.

**AGAR GLUCOSA EXTRACTO DE LEVADURA (GY):**

Composición (g/l):

Glucosa	20,0
Extracto de levadura	5,0
Agar bacteriológico	20,0

**GYBS** (GY agar con 50 ppm de ácido sórbico y 50 ppm de ácido benzoico):

Composición:

Benzoato sódico	0,09
Sorbato potásico	0,067
GY agar	1000 ml

Se esteriliza y se lleva el pH a 3,8 con ácido clorhídrico 1 N (estéril).

**GYP (GY agar con 1000 ppm de ácido propiónico):**

Composición:

Propionato sódico	1,375
GY agar	1000 ml

Se esteriliza y posteriormente se ajusta el pH a 3,8 utilizando ácido clorhídrico 1 N (estéril).

**GYA (GY agar con 5000 ppm de ácido acético):**

El ácido acético glacial se esteriliza a 115,5°C/20' y luego se añade a una concentración final del 0,05% (v/v) al medio GY agar. El pH se ajusta a 3,8.

**AGAR AGUA:**

Composición (g/l):

Agar	20,0
------	------

**MEDIO DE RAPER Y THOM (citado en "Introducción a la Micología Industrial", Smith, 1963):**

(Para el test de especificidad bacteriano)

Composición (g/l):

Extracto de levadura	2,0
Peptona	3,0
Dextrosa	2,0
Sacarosa	30,0
Granos de maíz sólido	5,0
Nitrato sódico	2,0
Fosfato dipotásico 3 hidrato	1,0
Sulfato magnésico 7 hidrato	0,5
Cloruro potásico	2,0
Sulfato de hierro (II) 7 hidrato	0,01
Agar bacteriológico	20,0

El medio se ajusta aproximadamente a pH 7 antes de esterilizar.

Una vez estéril se vierte en placas de Petri (15 a 20 ml) y se deja secar la superficie del agar durante 1 ó 2 días.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

**BAIRD-PARKER, A.C.** (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.*, 25:12-19.

**BARRIT, M.M.** (1936). The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naftol. *J. Path. Bacteriol.*, 42:441.

**BERNHARDT, E.** (1946). *Mycologia*, 38:228. Citado por Lodder (1970) en "The yeasts", p. 45.

**CHAPMAN, G.H.** (1945). The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.*, 50:201-203.

**CHRISTENSEN, W.B.** (1946). *J. Bact.*, 52:461. Citado por Lodder (1970) en "The yeasts", p. 97.

**CRAWFORD, R.J.,M.** (1962). Citrate utilizing activity of certain starter bacteria. *16 th Int. Dairy Congr.*, B, 322.

**GARVIE, E.I.** (1960). The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27:283-292.

**GIBSON, T. y ABD-EL-MALEK, Y.** (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.*, 14:35-44.

**HARRIGAN, W.F. y Mc CANCE, M.E.** (1979). *Métodos de laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos lácteos*. Academia. León.

**HOLDING, A.J.** (1960). The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. *J. Appl. Bacteriol.*, 23:515.

**HUGH, R. y LEIFSON, E.** (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66:24.

**ICMSF** (1982). *Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Elliott, R. P., Clark, D.S., Lewis, K.H., Lundbeck, H., Olson Jr., J.C. y Simonsen, B. (ed.). Acribia. Zaragoza, p. 229-230.



**KLEYN, J.G.** (1954). *Wallerstein Lab. Commun.*, 17:91, citado por Lodder (1971) en "The yeasts", p. 57.

**KOVACS** (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* bu the oxidase reaction. *Nature*, 178:703.

**LODDER, J.** (1970). *The yeasts: a taxonomic study*, 2 nd. ed. North-Holland Publishing Company. Amsterdam-London.

**MAN, J.D. DE, ROGOSA, M. y SHARPE, M.E.** (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23:130-135.

**Mc CLARY, D.O., NULTY, W.L. y MILLER, G.R.** (1959). *J. Bact.*, 78:362. Citado por Lodder (1970) en "The yeasts".

**MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E. y ELLIKER, P.R.** (1962). A selective medium for detecting Leuconostoc organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45:655-656.

**PITT, J.I.** (1973). An appraisal of identification methods for Penicillium species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia*, 65:1135-1157.

**REPORT** (1958). Report of the *Enterobacteriaceae* Subcommitee of the Nomenclature Commitee of the International Association of Microbiological Societies. *Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.*, 8:25.

**ROGOSA, M., MITCHELL, J.A. y WISEMAN, R.F.** (1951). A selective medium for the isolation of oral and fecal Lactobacilli. *J. Bacteriol.*, 62:132-133.

**SHAW, C. y CLARKE, P.H.** (1955). Biochemical classification of *Proteus* and *Providencia* cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 13:155.

**SIERRA, G.C.** (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.

**SIMMONS, J.S.** (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. *J. Infect. Dis.*, 39:209-241.

**SMITH, N.R., GORDON, R.E. y CLARK, F.E.** (1952). Aerobic spore-forming bacteria. V. S. Dept. Agric. Monograph No 16. Washington: V.S. Dept. of Agric.

---

**SMITH, G.** (1963). *Introducción a la Micología Industrial*. Acribia. Zaragoza.

**TERZAGHI, B.E. y SANDINE, W.E.** (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29:807-813.

**WICKERHAM, L.J.** (1946). *J. Bacteriol.*, 52:293. Citado por Lodder (1970).