

EVOLUCION DEL CRECIMIENTO DE BROCHOTHRIX THER-  
MOSPACTA EN SALCHICAS ENVASADAS AL VACIO.

(GROWTH EVOLUTION OF BROCHOTHRIX THERMOSPACTA ON VACUUM PACKAGED  
SAUSAGES).

por

Gonzalo Zurera Cosano

Sección de bromatología del Instituto de zootecnia del C.S.I.C.

Departamento de higiene, inspección y microbiología de los alimentos.  
Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Palabras clave: Bromatología. Microbiología. Bacterias. Industrias de  
la carne.

Keywords: Food. Microbiology. Bacteria. Meat industries.

Summary

Growth of B. thermosphacta was investigated on four types of vacuum packed sausages in gas-proof film over a storage period of six weeks. Survival of B. thermosphacta is a direct function of the temperature used in the cooking stage of these meat products. Its growth during the storage period is partly related to the number of lactic acid bacteria, which exerts an inhibitory effect on the growth of this microorganism, and on the other hand, to the storage temperature and pH, though indirectly.

Resumen

Se ha investigado el crecimiento de B. thermosphacta en cuatro tipos de salchichas envasadas al vacío, en película impermeable a los gases, durante un período de almacenamiento de seis semanas. La supervivencia del B. thermosphacta está en función directa de la temperatura de cocción a que son sometidos estos productos cárnicos. Su crecimiento

Recibido para publicación el 19-5-1983.

durante el período de almacenamiento está asociado, en parte, al número de bacterias ácido-lácticas, que ejercen efectos de inhibición del crecimiento sobre este microorganismo, y por otra parte, aunque indirectamente, a la temperatura de almacenamiento y al nivel de pH.

### Introducción

Desde su aislamiento por Sulzbacher y McLean (19) se ha asociado el Brochothrix thermosphacta\* (reclasificado por Sneat y Jones (18)) con la alteración del olor de la carne y de los productos cárnicos. Este microorganismo, según Egan y col. (4) ejerce un papel importante en la alteración rápida de productos cárnicos envasados al vacío. El crecimiento de B. thermosphacta se ve dificultado en aquellos productos cárnicos envasados al vacío en película plástica impermeable a los gases (Pierson y col. (14) y Roth y Clark (15)). La razón de este débil crecimiento no es debida sólo al envase impermeable, ya que para Sandine y col. (17) los lactobacilos que predominan en la microflora de productos cárnicos envasados al vacío ejercen efectos de inhibición sobre otros microorganismos. Este hecho ha sido posteriormente comprobado por Roth y Clark (16). Para Campbell y col. (1) el control del crecimiento del B. thermosphacta es debido a la combinación de dos factores: el pH de las muestras y las características de permeabilidad de la película plástica utilizada en el envasado. Lógicamente, al comprobarse el efecto del pH sobre los recuentos de bacterias ácido-lácticas en estos productos (15) (13) el efecto de inhibición lo ejercerían directamente las bacterias ácido-lácticas y, más concretamente, según Newton y Rigg (12), dicho fenómeno obedece a la intervención de un mecanismo de competición por el metabolismo de la glucosa entre los lactobacilos y el B. thermosphacta. Dentro de este grupo Collins-Thompson y Rodríguez López (2) destacan al Lactobacillus brevis y al Lactobacillus plantarum como los microorganismos que ejercen el mayor antagonismo frente al crecimiento del B. thermosphacta en condiciones de anaerobiosis. En todo caso el mecanismo de inhibición se ejerce, según Lauret (9), por la competición en el curso del metabolismo oxidativo del peróxido de hidrógeno; sustancia inhibidora producida por los lactobacilos.

---

\* Microbacterium thermosphacta (McLean y Sulzbacher, 10).

### Material y métodos

Se han analizado 264 muestras de salchichas envasadas al vacío, en película plástica impermeable a los gases, pertenecientes a seis marcas comerciales de los tipos "Frankfurt", "Bockwurst", "Bratwurst" y "Munich", conseguidas el mismo día de su fabricación. A cada marca comercial se le asignó una letra para mantener el anonimato. En términos generales, estos productos cárnicos son sometidos a una temperatura de cocción de 80° C, durante 30 minutos, y opcionalmente se mantienen, una vez envasados, a una temperatura de 85° C durante 10 minutos. Sólo las marcas C y D habían sido sometidas a este tratamiento térmico, posterior al envasado.

Las muestras, una vez en el laboratorio, se han mantenido almacenadas a las temperaturas de 2° C y 7° C durante un período de seis semanas. Se han realizado seis controles semanales a las dos temperaturas experimentadas. En cada control semanal se analizaron de 2 a 4 muestras y se procedió a realizar los recuentos de bacterias ácido-lácticas, B. thermosphacta y los niveles de pH.

Para el recuento de bacterias ácido-lácticas se ha empleado el agar nitrito-actidiona-polimixina B (NAP), a pH de 5.5 (Davidson (3)), incubando las placas a 30° C durante 72 horas y con atmósfera con un 10 p.100 de CO<sub>2</sub> (Gardner y Carson (7)).

Para el recuento de B. thermosphacta se ha empleado el medio de cultivo agar-sulfato de estreptomocina, acetato de talio y actidiona (STAA), a pH 7 (Gardner (6)), incubando las placas a 21° C durante 72 horas. Las colonias oxidasa-positivas son excluidas del recuento.

Para la determinación del pH se ha utilizado un pH-metro provisto de electrodo combinado, obteniendo las lecturas por punción directa sobre las muestras (15).

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se expresan en las tablas I, II, IV y V. De las 264 muestras analizadas sólo se detectó crecimiento de B. thermosphacta en 156, lo que representa el 59 p.100. Este porcentaje es muy similar al aportado por otros autores (13). Las muestras que presentaron los recuentos más elevados corresponden a las marcas A,

tipo "Bratwurst", y B, tipo "Munich". En las muestras de las marcas C, D y F, tipo "Frankfurt", no se detectaron recuentos (tabla I). Estos resultados pueden ser debidos, según Fruin y col. (5), al efecto de las diferentes técnicas de fabricación y, más concretamente, a las temperaturas y tiempo de cocción, ya que el B. thermosphacta es un microorganismo no resistente a un calentamiento de 63° C durante 5 minutos (10).

Tabla I. Recuentos medios de B. thermosphacta y de bacterias ácido-lácticas, para cada marca y tipo comercial.

Temperatura		2° C	7° C	2° C	7° C
Marca	Tipo	<u>B. thermosphacta</u>		ácido-lácticas	
A	Bratwurst	2'9 X 10 <sup>6</sup>	6'6 x 10 <sup>6</sup>	21'5 X 10 <sup>6</sup>	152 x 10 <sup>6</sup>
A	Frankfurt	123 x 10 <sup>3</sup>	133 x 10 <sup>3</sup>	19'4 x 10 <sup>6</sup>	80'1 x 10 <sup>6</sup>
B	Munich	1'9 x 10 <sup>6</sup>	3'5 x 10 <sup>6</sup>	3 x 10 <sup>6</sup>	17'9 x 10 <sup>6</sup>
C	Frankfurt	ND	ND	622	877
D	Frankfurt	ND	ND	8 x 10 <sup>3</sup>	12 x 10 <sup>3</sup>
E	Frankfurt	1 x 10 <sup>3</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	62'5 x 10 <sup>6</sup>	139'5x 10 <sup>6</sup>
F	Frankfurt	ND	ND	5'8 x 10 <sup>6</sup>	22 x 10 <sup>6</sup>
F	Bockwurst	4 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	19 x 10 <sup>6</sup>	106'4x 10 <sup>6</sup>
F	Bratwurst	18 x 10 <sup>3</sup>	15 x 10 <sup>3</sup>	24'7 x 10 <sup>6</sup>	187'1x 10 <sup>6</sup>
$\bar{X}$	TOTAL	45 x 10 <sup>4</sup>	92'9x 10 <sup>4</sup>	17'3 x 10 <sup>6</sup>	78'3 x 10 <sup>6</sup>

ND = No se detectó crecimiento.

De la marca F, que se presentó en tres tipos diferentes, no se detectó crecimiento en el tipo "Frankfurt" y sí, en cambio, en las muestras de los tipos "Bockwurst" y "Bratwurst" de la misma marca. La diferencia entre los tres tipos estriba fundamentalmente en el grosor de las salchichas. Las de menor diámetro son las de tipo "Frankfurt". De

estas observaciones deducimos que aún procediendo los tres tipos de la misma fabricación, sometidos al mismo tratamiento (temperatura y tiempo de cocción), el recuento de B. thermosphacta está influenciado por el binomio temperatura/tiempo empleado en la fabricación, en relación con el diámetro de la salchicha.

Los recuentos obtenidos de B. thermosphacta para las muestras mantenidas a 2º C durante el período de almacenamiento experimentado oscilaron entre 0 y 11'6 x 10<sup>6</sup>. La media obtenida fue de 45 x 10<sup>4</sup> colonias por gramo. Para las muestras mantenidas a 7º C los recuentos oscilaron entre 0 y 28'1 x 10<sup>6</sup>, y la media es de 92'9 x 10<sup>4</sup> colonias por gramo (tabla II).

Tabla II. Recuentos de Brochothrix thermosphacta durante el período de almacenamiento.

Temperatura	2º C		7º C	
	Rango	Media	Rango	Media
1	0-22 x 10 <sup>3</sup>	19 x 10 <sup>3</sup>	0-860 x 10 <sup>3</sup>	66 x 10 <sup>3</sup>
2	0-6 x 10 <sup>5</sup>	48 x 10 <sup>3</sup>	0-6 x 10 <sup>6</sup>	494 x 10 <sup>3</sup>
3	0-3'8 x 10 <sup>6</sup>	597 x 10 <sup>3</sup>	0-16 x 10 <sup>6</sup>	2'3 x 10 <sup>6</sup>
4	0-6'1 x 10 <sup>6</sup>	901 x 10 <sup>3</sup>	0-28'1 x 10 <sup>6</sup>	2,5 x 10 <sup>6</sup>
5	0-11'6 x 10 <sup>6</sup>	1'1 x 10 <sup>6</sup>	0-1'8 x 10 <sup>6</sup>	15 x 10 <sup>4</sup>
6	0-3 x 10 <sup>5</sup>	43 x 10 <sup>3</sup>	0-33 x 10 <sup>4</sup>	32 x 10 <sup>3</sup>
$\bar{X}$	0-11'6 x 10 <sup>6</sup>	45 x 10 <sup>4</sup>	0-28'1 x 10 <sup>6</sup>	929 x 10 <sup>3</sup>

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de B. thermosphacta a 2º C y a 7º C (t = 1.398) (tabla III).

Tabla III. Valores de la prueba t para los resultados obtenidos a 2°C y 7°C.

	Bacterias ácido-lácticas	<u>Brochothrix thermosphacta</u>	pH
t	3.883***	1.398 NS	3.006**

NS no significativo ( $p > 0.05$ )  
 \*\* significativo 99 p.100 ( $p < 0.01$ )  
 \*\*\* significativo 99.9 p.100 ( $p < 0.001$ )

La temperatura de almacenamiento tiene gran influencia en el recuento de bacterias ácido-lácticas, ya que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos a 2°C y a 7°C, con  $t = 3.883***$  (tabla III). Las muestras mantenidas a 2°C (tabla IV) alcanzaron recuentos comprendidos entre 0 y  $1.9 \times 10^8$ , con una media de  $17.3 \times 10^6$  colonias por gramo, mientras que las muestras mantenidas a 7°C alcanzaron entre 0 y  $8.1 \times 10^8$ , con una media de  $78.3 \times 10^6$  colonias por gramo.

Tabla IV. Recuentos de bacterias ácido-lácticas durante el período de almacenamiento.

Temperatura	2°C		7°C	
	Rango	Media	Rango	Media
1	$0-25 \times 10^3$	4300	$0-18 \times 10^3$	4300
2	$0-11 \times 10^4$	$23 \times 10^3$	$0-2.3 \times 10^6$	$258 \times 10^3$
3	$0-3 \times 10^6$	$603 \times 10^3$	$0-115 \times 10^6$	$10.7 \times 10^6$
4	$300-26.8 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$200-310 \times 10^6$	$43.6 \times 10^6$
5	$1200-115 \times 10^6$	$22.5 \times 10^6$	$1500-320 \times 10^6$	$127.8 \times 10^6$
6	$1900-190 \times 10^6$	$74.5 \times 10^6$	$2000-810 \times 10^6$	$240 \times 10^6$
$\bar{X}$	$0-1.9 \times 10^8$	$17.3 \times 10^6$	$0-8.1 \times 10^8$	$78.3 \times 10^6$

ZURERA: CRECIMIENTO DE BROCHOTHRIX THERMOSPACTA EN SALCHICHAS.

Los valores de pH de las muestras analizadas estuvieron entre 4'58 y 6'59 (media= 6'01) (tabla V). Este amplio margen es similar al obtenido por otros autores (8) (13). Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pH obtenidos para las muestras mantenidas a 2º C y 7º C, con un valor de  $t= 3.006^{**}$  (tabla III).

Tabla V. Valores de pH durante el período de almacenamiento.

Temperatura	2º C		7º C	
Semanas	Rango	Media	Rango	Media
1	6'27-6'59	6'35	6'29-6'59	6'35
2	6'14-6'52	6'26	6'13-6'35	6'22
3	5'90-6'40	6'16	5'80-6'27	6'05
4	5'72-6'28	6'06	5'44-6'22	5'88
5	5'52-6'23	5'92	5'13-6'21	5'68
6	4'90-6'17	5'71	4'58-6'18	5'48
$\bar{X}$	4'90-6'59	6'06	4'58-6'59	5'91

El crecimiento de B. thermosphacta, de las bacterias ácido-lácticas, y la evolución del pH lo hemos representado gráficamente en la figura 1, tanto a 2º C como a 7º C. Para las muestras mantenidas a 2º C los recuentos iniciales experimentan un aumento gradual en su número hasta un tiempo de almacenamiento de cinco semanas, en que alcanzan los niveles más elevados: del orden de  $1.1 \times 10^6$  colonias por gramo. Estos recuentos declinan hasta 43.000 colonias por gramo a las seis semanas de almacenamiento (tabla II). Los recuentos iniciales de bacterias ácido-lácticas experimentan un aumento progresivo durante el período de almacenamiento y alcanzan a las seis semanas los recuentos más elevados, del orden de  $74.5 \times 10^5$  colonias por gramo (tabla IV).

Para las muestras mantenidas a 7º C los recuentos iniciales de B. thermosphacta experimentan este aumento gradual hasta las cuatro

ZURERA: CRECIMIENTO DE BROCHOTHRIX THERMOSPACTA EN SALCHICHAS.

semanas de almacenamiento, en que alcanzan los recuentos más elevados, del orden de  $2'5 \times 10^6$  colonias por gramo. Estos recuentos declinan hasta 32.000 colonias por gramo a las seis semanas de almacenamiento (tabla II). Para estas muestras los recuentos iniciales de bacterias ácido-lácticas experimentan un aumento progresivo, más acusado durante el período de almacenamiento y alcanzan, a las seis semanas, recuentos medios de  $240 \times 10^6$  colonias por gramo (tabla IV).

La evolución de los niveles iniciales de pH es de tipo descendente y alcanzan, a las seis semanas, los niveles más bajos. En la primera semana de almacenamiento se obtuvo un nivel medio de pH de 6'35, y a las seis semanas descendió a 5'71 en las muestras mantenidas a 2º C; y a 5'48, en las muestras a 7º C (tabla V). De acuerdo con Roth y Clark (15) el descenso de los valores iniciales de pH es consecuencia de la proliferación de bacterias ácido-lácticas, ya que hemos encontrado correlaciones altamente significativas ( $r=-0.767^{***}$ ) (tabla VI). Correlaciones negativas similares a éstas son las obtenidas por otros autores (13).

Tabla VI. Coeficientes de correlación.

	bacterias ácido-lácticas	<u>Brochothrix</u> <u>thermosphacta</u>
pH	-0.767***	0.012 NS
b. ácido-lácticas		0.097 NS
b. ácido-lácticas/pH		0.166*

NS no significativo (p > 0'05)

\* significativo 95 p.100 (p < 0'05)

\*\*\* significativo 99'9 p.100 (p < 0'001)

Para Campbell y col. (1) la inhibición del crecimiento de B. thermosphacta es debida a la combinación de dos factores: el pH y las características de permeabilidad de la película plástica utilizada en el envasado. En nuestra investigación esta inhibición del crecimiento,

en las muestras mantenidas a 29° C, se observó a las seis semanas de almacenamiento y el valor medio de pH se cifró en 5'71. En las muestras mantenidas a 79° C se observó este descenso de los recuentos a las cinco semanas, con valores medios de pH de 5,68. Aunque coincidimos con las aportaciones de Campbell y col. (1) en cuanto a la posible incidencia de ciertos valores de pH sobre el crecimiento de B. thermosphacta, no hemos encontrado correlaciones estadísticamente significativas entre ellos. Correlaciones similares son las obtenidas por Paradis y Stiles (13).

Newton y Rigg (12) señalan que este fenómeno de inhibición del crecimiento del B. thermosphacta podría ser debido a la competición por metabolizar la glucosa entre este microorganismo y los lactobacilos. Semejantes observaciones son las aportadas por otros autores (16, 11, 2). En la presente investigación no hemos observado correlaciones estadísticamente significativas entre los recuentos de B. thermosphacta y los de bacterias ácido-lácticas (tabla VI). Esta falta de correlación fue también observada por Paradis y Stiles (13). Sin embargo, hemos encontrado una correlación múltiple entre los recuentos de B. thermosphacta y la combinación de recuentos de bacterias ácido-lácticas y valores de pH, con un valor de  $r = 0.166^*$  (tabla VI).

De nuestros resultados y observaciones concluimos que la supervivencia del B. thermosphacta está en función de la temperatura de cocción a que son sometidos estos productos cárnicos. El crecimiento en anaerobiosis durante el período de almacenamiento está asociado a un recuento de bacterias ácido-lácticas superior a  $2 \cdot 2 \times 10^7$  colonias por gramo, que ejercen efectos de inhibición del crecimiento del B. thermosphacta, conjuntamente con un valor de pH 5'90.

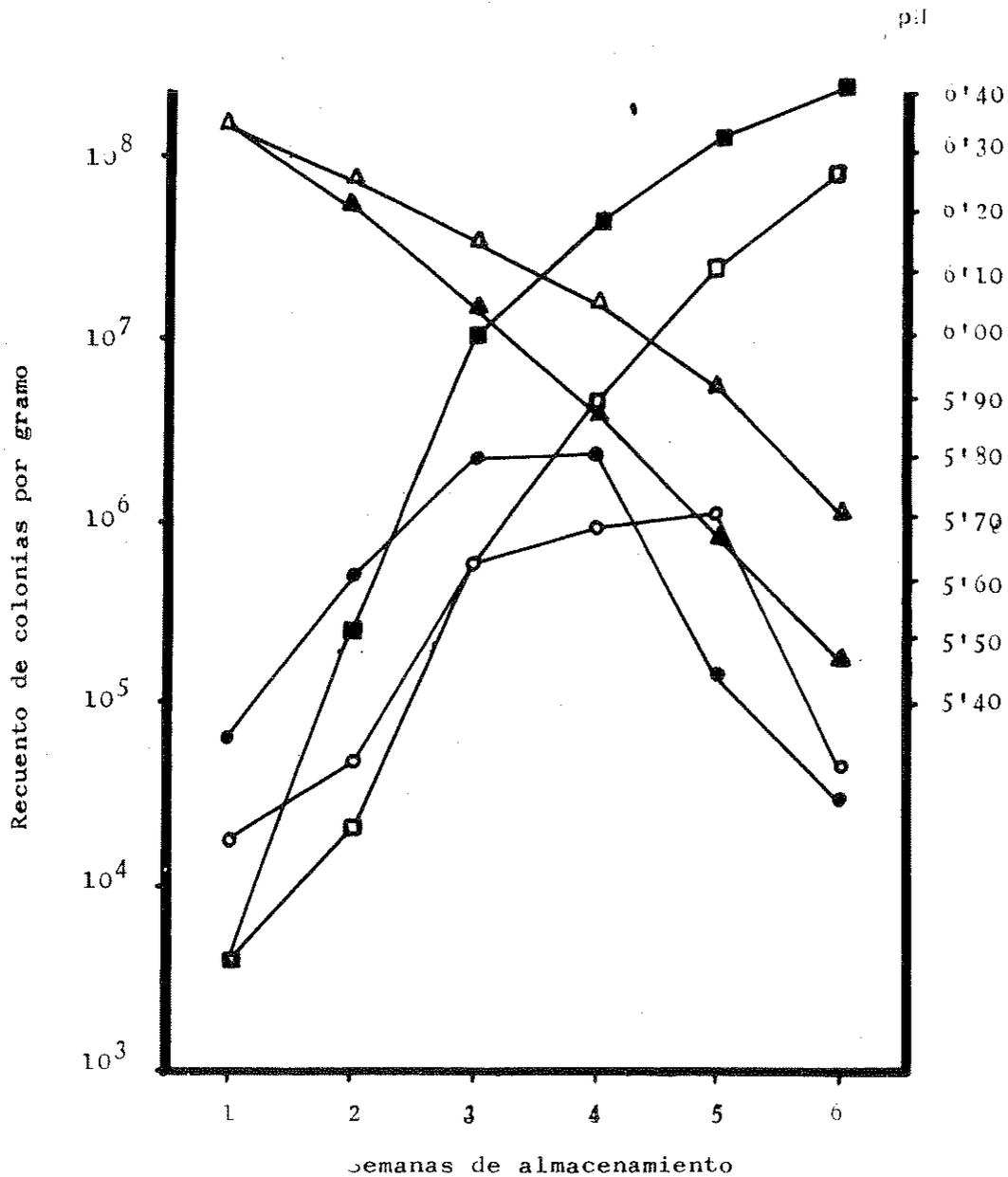


Figura 1. Evolución del pH y de los recuentos de B. thermosphacta y bacterias ácido-lácticas durante el almacenamiento a 2°C y 7°C. B. thermosphacta a 2°C; ácido-lácticas a 2°C; pH a 2°C; B. thermosphacta a 7°C; ácido-lácticas a 7°C; pH a 7°C.

Bibliografía

1. Campbell, R.J. y col. The growth of Microbacterium thermosphactum on beef. J. Appl. Bacteriol. 47, 505-509 (1979).
2. Collins-Thompson y G. Rodríguez López. Influence of sodium nitrite, temperature, and lactic acid bacteria on the growth of Brochothrix thermosphacta under anaerobic conditions. Can. J. Microbiol. 26, 1416-1421 (1980).
3. Davidson, C.M. y F. Cronin. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. Appl. Microbiol. 26, 439-440 (1973).
4. Egan, A.F. y col. A comparison of Microbacterium thermosphactum and lactobacilli as spoilage organism of vacuum packaged sliced luncheon meats. J. Food Sci. 45, 1745-1748 (1980).
5. Fruin, J.T. y col. Survey of the bacterial populations of Bologna products. J. Food Prot. 41, 692-695 (1978).
6. Gardner, G.A. A selective medium for the enumeration of Microbacterium thermosphactum in meats and meats products. J. Appl. Bacteriol., 29, 455-460 (1966).
7. Gardner, G.A. y A.W. Carson. Relationship between carbon dioxide production and growth of pure strains of bacteria on porcine muscle. J. Appl. Bacteriol. 30, 500-510 (1967).
8. Kempton, A.G. y S.R. Bobier. Bacterial growth in refrigerated vacuum packed luncheon meats. Can. J. Microbiol. 16, 287-297 (1970).
9. Lauret, R.M. Mecanisme de l'interaction Lactobacillus sp-Microbacterium thermosphactum. Thèse. Université de Bordeaux. (1981).
10. McLean, R.A. y W.L. Sulzbacher. Microbacterium thermosphactum spec. nov. a non heat resistant bacterium from fresh pork sausage. J. Bacteriol. 65, 428-433 (1953).
11. Newton, K.G. y C.O. Gill. The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. 44, 91-95 (1978).

12. Newton, K.G. y W.J. Rigg. The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum packaged meat. J. Appl. Bacteriol. 47, 433-441 (1979).
13. Paradis, D.C. y M.E. Stiles. A study of microbial quality of vacuum packaged sliced Bologna. J. Food Prot. 41, 811-815 (1978).
14. Pierson, M.D. y col. Microbiological sensory and pigment changes aerobically packaged beef. Fd. Technol. Champaign. 24, 1171-1175 (1970).
15. Roth, L.A. y D.S. Clark. Studies on the bacterial flora of vacuum packaged beef. Can. J. Microbiol. 18, 1761-1766 (1972).
16. Roth, L.A. y D.S. Clark. Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of Microbacterium thermosphactum on fresh beef. Can. J. Microbiol., 21, 629-632 (1975).
17. Sandine, W.E. y col. Lactic acid bacteria in food and health: A review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotic and lactobacilli. J. Food Technol. 35, 691-702 (1972).
18. Sneath, P.H.A. y D. Jones. Brochothrix thermosphacta a new genus tentatively placed in the family lactobacillaceae. Int. J. Sys. Bacteriol. 26, 102-104 (1976).
19. Sulzbacher, W.L. y R.A. McLean. The bacterial flora of fresh sausage. Food Technol. 5, 7-11 (1951).
20. Zurera Cosano, G. Calidad microbiológica de salchichas envasadas al vacío durante su conservación. Tesis doctoral. Facultad de veterinaria. Córdoba (España).