

ESTUDIO DE LA MICROFLORA DEL GENERO BACILLUS (COHN, 1872) EN SEMICONSERVAS CARNICAS

Por S. Ovejero del Agua
G. Suárez Fernández
A. Santos Gutiérrez
C. Paniagua Andrés

I. INTRODUCCION

En la fabricación del jamón enlatado, cuyo consumo se ha generalizado en extremo, existen unas limitaciones precisas que aconsejan el empleo de temperaturas y tiempos de calentamiento en ningún modo superiores a los de pasterización. Incluso, a fin de velar por la calidad del producto, evitando cambios físicos en la gelatina y en la estructura de la fibra muscular que habrán de afectar a la nitidez en el corte, se llegan a recomendar temperaturas de subpasterización (60° C) por algunos autores.¹⁵ En todo caso el rango de temperaturas comprende de 60° C a 90° C, con tiempos muy variables según la técnica y que van de unos pocos minutos a varias horas. Ello plantea, sin duda, problemas microbiológicos realmente sugestivos.

El jamón enlatado, en estas condiciones, es un alimento perecedero que debe mantenerse a temperaturas de 0 a 2° C a la que conserva su calidad durante una a tres semanas.

Si se vulnera esta regla, si se mantiene el jamón a temperatura ambiente, aunque sea por espacio de unas horas, el producto alimenticio puede convertirse en un peligro para el consumidor, ya que existe siempre presente una microflora abundante y variada y las condiciones de actividad de agua a_w , pH, riqueza nutritiva, etc., son muy adecuadas a la proliferación de microorganismos.

Recientemente hemos realizado una amplia revisión bibliográfica sobre microbiología de las semiconservas y, en general, y por lo que respecta al jamón York, se insiste actualmente sobre tópicos ya conocidos y que afectan a la microbiología de los géneros *Streptococcus* (Grupo D de Lancefield o enterococos), *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Clostridium*^{30 4 10 11 28 31 32 5 28 23 8 14 y 7}. Se observa, en cambio, la carencia de estudios microbiológicos que hagan referencia al género *Bacillus*

como tal, a pesar de que se reconoce ya ampliamente el *B. cereus* como germen significativo en problemas sanitarios, como son las toxi-infecciones de origen alimentario 16 29 24 12 1 21 17.

Pero además, existen dos aspectos importantes que avalan en principio, la utilidad de este estudio.

Uno, el que la relación de calentamiento tiempo/temperatura que se sigue, en la tecnología de la fabricación del jamón enlatado es, frecuentemente, la óptima para estimular la germinación de los microorganismos esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Otra, la naturaleza proteolítica del equipo enzimático de muchas de las especies pertenecientes a este género y, este hecho, unido al anterior, hace pensar en que estamos frente a una causa frecuente de deterioro del producto cuando menos, si no frente al origen de ciertos tipos de trastornos digestivos experimentados en los consumidores habituales de semiconservas.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Recogida de muestras.

La recogida de muestras se ha realizado a lo largo de un año en proporción de 2-3 semanales, ascendiendo a un total de 104 el número de muestras analizadas que corresponden a 35 casas comerciales diferentes. El muestreo no ha tenido en modo alguno, un carácter local, sino nacional, y se ha pretendido una máxima variación en las marcas, a fin de incrementar la representatividad en toda medida posible.

2. Incubación previa.

Para seguir la investigación microbiológica cualitativa de las diferentes especies del género *Bacillus* que pudieran encontrarse en las semiconservas, comenzamos por someter el producto enlatado a una incubación a la temperatura de 37° C por espacio de 24 horas, en cuyas condiciones debería producirse un enriquecimiento, en especial en las primeras horas, en que ha de existir una determinada tensión de O₂.

3. Aislamiento.

Abierta la lata en condiciones de rigurosa asepsia, previo flameado con alcohol, se tomaba un cubo de 2 cm de lado, seccionando en el centro de la muestra con bisturí estéril, se llevaba a un mortero estéril y finamente picado se homogeneizaba con agua destilada estéril (10 c.c.). Del sobrenadante se sembraba 1 c.c. en dos tubos de caldo de corazón y cerebro de ternera (BHI) preparado a partir de una marca comercial de cultivo deshidratado. Al mismo tiempo se sembraba directamente con asa de platino sobre dos placas de agar (caldo BHI mas 2 % de agar).

4. Incubación de los medios de cultivo

Las temperaturas de incubación, tanto para cultivos líquidos como sólidos, fueron de 30° C y 37° C. En otras palabras, se incubaron en series paralelas los cultivos de enriquecimiento en caldo, iniciales en agar nutritivo y finales en el mismo medio a partir de caldo BHI.

5. Aislamiento.

Se realizó basándose en la morfología de las colonias y de los propios microorganismos integrantes de éstas, previa coloración por el método de Gram, considerando, en principio, como integrantes del género los bacilos Gram +, de gran tamaño (4-12 micras de longitud y 1-1,5 de grosor) esporulados o no (en fase vegetativa), tanto si se agrupaban en forma de cadena larga, cadena corta o de manera aislada.

6. Identificación

La experiencia previa de uno de nosotros ²⁷ en la identificación de especies del género *Bacillus* nos aconsejó seguir la línea trazada por SMITH y colaboradores,²⁵ universalmente aceptada, con ligeras modificaciones. Consistió, en resumen, en la investigación de las siguientes propiedades: morfología, situación y forma del esporo, movilidad, características de crecimiento en agar-yema de huevo, producción de acetoina, hidrólisis de gelatina y almidón, crecimiento anaeróbico en agar-leche-almidón con 1 % de glucosa, fermentación de glucosa y manitol, reacción de rojo de metilo, crecimiento en caldo BHI con 7 % de cloruro sódico y reducción de nitratos a nitritos.

6.1. Estudio de la morfología y disposición de los esporos

Se llevó a cabo siguiendo la técnica de BARTHOLOMEW y MITTWER.⁹

Después de preparada la extensión de la forma habitual, se fija cuidadosamente pasándola veinte veces por la llama del mechero. La tinción se lleva a cabo con una solución saturada de verde de malaquita en agua, durante un tiempo no inferior a diez minutos. Sigue un lavado prolongado (10 minutos) con agua fría y finalmente se lleva a cabo la coloración de contraste con una solución de safranina al 0,25 % durante quince segundos.

6.2. Estudio de la movilidad

Se realizó mediante dos técnicas diferentes:

a) Examen en gota pendiente, a partir de un cultivo de 24 horas en infusión de BHI.

b) Examen en agar gelatina nitritiva,⁶ de la siguiente composición: Peptona,

10 gr.; Extracto de carne, 3 gr.; Cloruro sódico, 5 gr.; gelatina, 8 gr.; agar, 4 gr.; agua destilada 1.000 ml. La mezcla se calienta en corriente de vapor, hasta que está completamente disuelta; se ajusta el pH a 7,2 utilizando una solución alcalina. La esterilización se lleva a cabo en el autoclave durante quince minutos a 121° C. Después de extraer los medios del autoclave, se agita vigorosamente con el fin de disolver completamente la gelatina. La solidez del medio puede ser modificada cambiando la concentración del agar.

Los tubos se siembran en picadura, a partir de un cultivo joven, de veinticuatro horas, en caldo nutritivo (Difco), incubando el medio así sembrado a 37° C durante 48 horas. Los tubos que den resultado negativo no deben considerarse como tales, sino que deben ser incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 25° C), durante otros tres días.

El resultado es claro. Los gérmenes móviles crecen hacia afuera de la zona de inoculación.

6.3. *Características del crecimiento en agar-yema de huevo.*

Se utilizó el agar rojo fenol-yema de huevo,²⁹ cuya composición es la siguiente: extracto de carne, 1 gr.; peptona 10 gr.; manitol, 10 gr.; cloruro sódico, 10 gr.; rojo fenol, 0,025 gr.; agar 15 gr.; agua destilada 1.000 ml. Los ingredientes se mezclan calentando hasta ebullición para disolver el medio completamente. Se ajusta el pH a 7,2 y se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121° C. Una vez esterilizado y enfriado a 45° C, se le añaden unos 10 ml de una emulsión de yema de huevo preparada de la forma siguiente: Se limpian y esterilizan las cáscaras de algunos huevos frescos sumergiendo éstos en una solución acuosa de cloruro mercúrico al 0,1 %. Asépticamente se separan las yemas y se colocan en un vaso graduado estéril. Se añade un volumen igual de solución salina estéril y se mezcla bien.

La inoculación se hace en estría a través del centro, incubándose las placas a la temperatura óptima de crecimiento durante uno a cuatro días.

La actividad lecitinasa; es decir, la hidrólisis de la lecitina del medio con yema de huevo, da como resultado la formación de zonas opacas en torno a la zona de crecimiento bacteriano.

6.4. *Reacción de Voges-Proskauer y del Rojo de Metilo.*

Se ha utilizado el medio MR.VP de Difco, cuya composición está perfectamente establecida. Las instrucciones de preparación del mismo, se han seguido estrictamente, por las recomendadas por dicha casa comercial.

Los tubos se inoculaban con inóculo procedente de un cultivo de veinticuatro horas en agar inclinado, manteniéndolo en incubación a 37° C durante un mínimo de tres días (hasta que se apreciaba un crecimiento completo en dicho medio).

Los reactivos utilizados para la investigación de la acidez en la prueba del Rojo

de Metilo, y de la producción de acetil-metil-carbinol en la prueba del Voges-Proskauer, han sido los siguientes:

1. Rojo de Metilo: solución de Rojo de Metilo (0,1 gr. en 300 ml. de etanol del 95 %, completando hasta 500 ml. con agua destilada).

2. Voges-Proskauer. Modificación de Barrit:

a) Solución de alfa-naftol al 6 %

b) Solución de hidróxido potásico al 16 %.

Práctica de las reacciones.

1. Rojo de Metilo: Se añaden unas 5 gotas del indicador a 5 ml. de cultivo. Un color rojo, indicando un pH de 4,5 o inferior, se considera como resultado positivo. Si el color es amarillo, el resultado se anota como negativo.

2. Voges-Proskauer: A 1 ml. del cultivo se le añaden 0,5 ml. de la solución a), e igual cantidad de la solución b). Se agita el tubo. El desarrollo de coloración roja, generalmente a los cinco minutos, constituye una reacción positiva.

6.5. *Hidrólisis de la Gelatina.*

Hemos utilizado la gelatina nutritiva de Difco, siguiendo en su preparación las instrucciones de dicha casa.

Una vez preparados los tubos con el medio, se inocula por picadura incubándose a 20-25° C durante un tiempo de hasta 30 días, anotando la forma y extensión de la porción de gelatina fluidificada.

6.6. *Hidrólisis del almidón.*

Hemos utilizado un agar almidón constituido por la adición de 0,2 % de almidón soluble en agua, sobre la superficie plana de una placa de agar nutritivo.² Una vez llenas y frías las placas de Petri con el agar nutritivo se hace una estría de unos 5 cm de longitud a lo largo de la superficie de la placa, con un asa de platino cargada con el crecimiento del organismo que se va a probar a partir de un cultivo de veinticuatro horas en agar inclinado. Después de una incubación a 37° C durante 48 horas y de cinco días a 20° C se inunda la superficie de la placa con una solución saturada de yodo en alcohol de 50 %. Si el almidón es hidrolizable aparece una zona translúcida alrededor del crecimiento, pero si permanece sin cambio el medio se vuelve blanco y opaco.

6.7. *Crecimiento anaeróbico en agar-leche-almidón con 1 % de glucosa.*

Hemos utilizado un medio de cultivo integrado por: agar nutritivo (Difco), 100 ml.; leche descremada reconstituida, 1 ml.; Almidón soluble en solución al 10 %, 1 ml. Se añade leche descremada reconstituida la solución de almidón al agar nutritivo fundido. Se mezcla y se reparte en tubos. Se esteriliza en autoclave durante veinte

minutos a 121° C. Una vez estéril se mantiene el medio a 45° C y se le añade la solución de glucosa esterilizada a su vez por filtración, de tal forma que quede en una proporción del 1 %.

6.8. Reducción de nitratos a nitritos.

Hemos utilizado un caldo nutritivo conteniendo 0,1 % de KNO₃. La incubación se llevó a cabo a la temperatura óptima, y la lectura se realizó después de 1, 3, 6 ó más días, añadiendo varias gotas de cada una de las siguientes soluciones a una pequeña porción de cultivo:

1.—Acido sulfanílico, 8 gr.; acido acético 5 N (una parte de ácido acético glaci- ar en 2,5 partes de agua) 1.000 ml.

2.—Dimetil-alfa-naftilamina, 6 ml; ácido acético 5N 1 ml.

La aparición de un color rojo fuerte, o de un precipitado amarillento pesado nos indicaba la presencia de nitritos.²⁶

6.9. Fermentación de glucosa y manitol.

Hemos utilizado un medio base preparado con triptona 2 gr.; cloruro sódico 0,5 gr. y agua destilada, 100 ml. al que se le ha añadido un 1 % de glucosa o de manitol, según el caso. Además se le añadió un indicador de pH, que fue precisamente el Rojo de Fenol, en una proporción de 0,01 %. La esterilización se llevó a cabo por corriente de vapor en el autoclave durante tres días consecutivos, en sesiones de treinta minutos. Se inoculó a partir de cultivos en caldo nutritivo (Difco) de veinticuatro horas. La incubación se llevó a cabo a la temperatura óptima durante dos y siete días.

El tipo I de espora corresponde al de pared fina, no más ancho que la forma vegetativa.

En el tipo II el espora es más ancho que la forma vegetativa y de pared gruesa.

7. Inoculaciones en animales de experimentación.

Con este fin, de cada estirpe aislada se realizó un cultivo en caldo BHI, incubando a la temperatura de 30° C por espacio de 48 horas. A partir de cada tubo de ensayo se inocularon cobayos y ratones previa homogeneización de los cultivos por agitación excéntrica, a fin de suspender uniformemente el velo o sedimento, en su caso.

A partir de cada cepa, en estas condiciones, se inocularon dos ratones por vía intraperitoneal (0,1 c.c. de la suspensión resultante de homogeneizar el cultivo de veinticuatro horas), y un cobayo (0,5 c.c. por vía intraperitoneal y 0,5 c.c. por vía subcutánea).

En concreto se utilizó el siguiente esquema para la identificación de las formas bacilares, esporuladas, mesófilas, aisladas de semicon- servas cárnicas:

	Lipólisis en yema de huevo	Acetoina	Hidrólisis almidón	Hidrólisis gelatina	Crecimiento en anaerobiosis	Tipo de espora	Ferm. de glucosa	Ferm. de manitol	Caldo con 7 % CINA	Red. de nitrato
B. brevis	++	+	+	+	+	II	+	+	+	+
B. cereus	+	+	+	+	+	I	+	+	+	+
B. cereus var. mycoides	+	+	+	+	+	I	+	+	+	+
B. coagulans	+	+	+	+	+	I-II	+	+	+	+
B. laterosporus	+	+	+	+	+	II	+	+	+	+
B. licheniformis	+	+	+	+	+	I	+	+	+	+
B. megaterium.	+	+	+	+	+	I	+	+	+	+
B. polymyxa.	+	+	+	+	+	II	+	+	+	+
B. pumilus.	+	+	+	+	+	I	+	+	+	+
B. sphaericus	+	+	+	+	+	II	+	+	+	+
B. subtilis.	+	+	+	+	+	I	+	+	+	+

La diferenciación de la variedad mycoide del *Bacillus cereus* se hizo en atención a la forma rizoide de las colonias de la citada variedad.

III. RESULTADOS

1. Número de muestras positivas

De 104 muestras solamente 22 resultaron positivas, lo que significa que únicamente el 21 % de las muestras contenían una microflora esporógena de tipo aerobio, investigada cualitativamente después de un doble enriquecimiento.

2. Frecuencia de las distintas especies aisladas.

El número de especies aisladas fue de 22. De ninguna muestra de semiconservas se aisló más de una especie.

El número de estirpes diferentes dentro de cada especie y la propia relación de especies halladas es la siguiente:

ESPECIE	FRECUENCIA
<i>B. brevis</i>	2
<i>B. cereus</i>	1
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	2
<i>B. coagulans</i>	1
<i>B. laterosporus</i>	1
<i>B. licheniformis</i>	4
<i>B. magaterium</i>	1
<i>B. polymyxa</i>	1
<i>B. pumilus</i>	1
<i>B. sphaericus</i>	1
<i>B. subtilis</i>	5
Sin identificar	2
Total	22

3. Resultado de las inoculaciones

Los animales inoculados se observaron por espacio de quince días y únicamente una estirpe de *B. cereus* var. *mycoides* originó una peritonitis mortal a las 72 horas para el ratón y a los seis días para el cobayo. En el ratón, verificada la necropsia pudo apreciarse una congestión general de mucosas y serosas, en especial el peritoneo, llegando a producirse miositis y necrosis en la musculatura de la prensa abdominal.

En el cobayo las lesiones resultaron bien manifiestas: focos de necrosis hemorrágica en hígado, pulmón, bazo, y riñón, congestión de peritoneo con abundante exudado. Marcada necrosis del tramo grueso intestinal.

Las lesiones de necrosis, bastante típicas, podrían resultar producidas por la acción de la lecitinasa que al liberar colina de las lecitinas y esfingiomielinas y, pro-

bablemente, colamina de plasmalógenos y cefalinas (colaminofosfátidos), lograría una acción necrotizante primaria.

IV. DISCUSION

En un estudio microbiológico de carácter cualitativo, utilizando al máximo las posibilidades de enriquecimiento de las muestras de semiconservas cárnicas, y actuando sobre un número bien significativo de éstas, hemos encontrado que un 21 % de los envases conteniendo jamón pasterizado eran portadores de gérmenes aerobios, esporulados, mesófilos del género *Bacillus*. Tales microorganismos se hallaban en el espesor de las piezas musculares enlatadas.

Se identificaron once especies distintas correspondiendo las mayores frecuencias a *B. subtilis* (cinco), *B. licheniformis* (cuatro) y *B. cereus* (tres).

Se demuestra una elevada patogenicidad en animales de experimentación de una de las estirpes de *B. cereus* aisladas.

Estos resultados suponen una aportación nueva a la microbiología de las semiconservas cárnicas, al hacer énfasis en un grupo de microorganismos relegados a segundo plano en este tipo de estudios.

Existen aspectos como la estimulación de la germinación de los esporos a las temperaturas de pasterización y subpasterización unida a la capacidad proteolítica potencial de la mayoría de las especies aisladas, aerobias, y anaerobias facultativas, que se bastarían para explicar numerosos trastornos digestivos incriminados a semiconservas y que podríamos agrupar siguiendo a PIETTRE²² en los fenómenos de simple intolerancia, debidos a modificaciones físico-químicas, no perceptibles por vía sensorial, de los alimentos, pero capaces de originar trastornos de orden psíquico con manifestaciones de vómito, diarrea, dolores intestinales, etc., sin que pueda hablarse de infección o intoxicación propiamente dichas.

Por otra parte queda ya fuera de toda duda la importancia del *B. cereus* como causa de intoxicaciones alimentarias y algunos autores subrayan la importancia de los preparados cárnicos a este respecto^{19 20}

El papel del *B. licheniformis* en las toxiinfecciones de origen alimentario parece cobrar también interés modernamente al haberse diagnosticado brotes tóxicos de este origen en Alemania y Francia.¹³

No parece arriesgado pensar que determinadas estirpes de las especies del género *Bacillus*, de equipo enzimático complejo, puedan hallarse implicadas en casos de intoxicación alimentaria, aunque sus posibilidades de causar infecciones específicas, en atención a una posible virulencia, quedan relegadas a ciertas cepas del *B. cereus*, próximo pariente del *B. anthracis*, especie patógena por excelencia dentro del género que nos ocupa.

V. RESUMEN

Se ha realizado un estudio microbiológico de 104 muestras de jamón enlatado pasterizado en orden a precisar la frecuencia de especies del género *Bacillus* en este tipo de semiconserva. Únicamente el 21 % de las muestras analizadas contenían esta clase de microorganismos, siendo las especies más frecuentes *B. subtilis*, (5 %), *B. licheniformis* (4 %), *B. cereus* (3 %), y *B. brevis* (2 %).

Los posibles efectos de toxigenicidad, virulencia e infectividad de las 22 especies aisladas se investigaron por inoculación intraperitoneal de cultivos líquidos en cobayo, y ratón. Únicamente una estirpe de *B. cereus* originó una peritonitis mortal e inflamación necrótica de los órganos del S.R.E.

RESUME

On a effectué une étude microbiologique sur 104 échantillons de jambon en conserve pasteurisé, à fin de déterminer la fréquence des espèces du genre *Bacillus* dans ce type de semi-conserva. Un 21 % seulement des échantillons analysés contenaient cette classe d'organismes, les plus fréquentes étant *B. subtilis* (5 %), *B. licheniformis* (4 %), *B. cereus* (3 %) et *B. brevis* (2 %).

Les possibles effets de toxicité, virulence et infection des 22 espèces isolées furent investigués au moyen d'inoculation de cultures liquides dans le péritoine de cobaye et de rat. Seulement une souche de *B. cereus* causa une péritonite mortelle et une inflammation nécrotique dans les organes du S. R. E.

SUMMARY

A microbiological study has been made using 104 samples of canned pasteurized ham in order to establish the real incidence of the different specific members of *Bacillus* genus, in this type of semi-processed canned foods. Only 21 per cent of the analyzed samples were harboring this kind of microorganisms, the most frequent species being *B. subtilis* (5 per cent), *B. licheniformis* (4 per cent), *B. cereus* (3 per cent) y *B. brevis* (2 per cent).

The possible toxigenic affects, virulence e infectivity in the 22 isolated species were investigated by means of intraperitoneal injection of bacterial suspensions in guinea pig and mice Only one strain of *B. cereus* caused a mortal infection and necrotic inflammation in the S.R.E. organs.

VI. BIBLIOGRAFIA

- AKIMOV, A. M. *Gigiena i Sanitariya*, **34**: 109, 1969.
- ALLEN, P. W. *J. Bact.* **3**: 15-17, 1918.
- BAKER, F. J. *Manual de técnica bacteriológica*. Acribia, 1970.
- BENI, Z. STOLIC, D. y TOMCOU, D. *Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers*. **15**: 166 (Sum III), 1969.
- DUNCAN, G. L. *J. of Appl. Microbiol.* **33**: 66, 1970.
- EDWARDS, P. R. & EDWING, W. H. *Identification of Enterobacteriaceae*, 3.º edic. Burgess Publishing Company, Minesota 1972.
- GENIGEORGIS, G. y PRUCHA, J. *Bact. Proceed. A* **102**: 18, 1971.
- HALLIDAY, D. A. *Proc. Biochem.* **6**: 15, 1971.
- HARRIGAN, W. F. y MC CANCE, M. E. *Métodos de Laboratorio en Microbiología*. Academia, 1968.
- HERSON, A. C. y HULLAND, E. D. *Canned foods*, Churchill Ltd. London, 1969.
- INSLATA, N. F. y WITZEMAN, V. S. *Food Technol.* **23**: 1316, 1969.
- JAY, J. *Modern food microbiology*, Reinhold, New-York, 1970.
- KAMPELMACHER, E. H. INGRAM, M. y MOSSEL, D. A. D. (editores). *The microbiology of dried foods*. IAMS. Bilthoven. Netherlands. 1968.
- KENDERESK, S. *Schlacht und Viehhof-Zeitung*, **71**: 133, 1971.
- LONGREE, K. y BLAKER, G. G. *Sanitary techniques in food service*. Wiley & Sons, New-York, 1971.
- LONGREE, K. *Quantity food sanitation Interse*. Publish New-York, 1967.
- LUDWIG, K. *Arch. Lebensmitt. Hyg.* **22**: 104, 1971.
- MOL, J. H. H., TIMMERS, C. A. *J. of Appl. Microbiol.* **33**: 233, 1970.
- NICODEMUSZ, I. y BOUQYET, D. Z. *Hyg.* **147**: 327, 1961.
- NICODEMUSZ, I. y GONDA, G. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **190**, 237, 1963.
- ORMAY, L. NOVOTNY, T. *Proceedings of the 6.º th International Symposium on Food Microbiology*, IAMS, Bilthoven, Netherlands 1968.
- PIETTRE, M. *Inspection des viandes et des aliments d'origine carnee*. Tome II. Bailliere et Fils, Paris, 1953.
- REUTER, G. *Arch. Lebessmitt. Hyg.* **21**: 257, 1970.
- RIEMANN, H. *Food-borne infections and intoxications*. Academic Press, New-York, 1969.
- SMITH, N. R., GORDON, R. E. y CLARK, F. E. *Aerobic Spore-Forming Bacteria*. U.S. Dep. Agric. Monograph. n.º 16. 1952.
- SMITH, N. R., CLARK, R. E., U.S.D.A. *Agr. Monograph* n.º 16. 1952.
- SUÁREZ, G. *Anales Bromatol.* **21**: 85, 1969.
- TABACKS, J. *Gordian*, **69**: 440, 1969.
- THATCHER, F. S. y CLARK, D. S. *Microorganisms in foods*. University of Toronto Press, 1968.
- VASELINOV, U. y BAIL'OUZOU, D. *Vetermed, Nanki.* **5**: 75, 1968.
- WESELIHOFF, W. y BKLJOSOFF, D. *Proceedings of the symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists*. Opatijer, Yugoslavia, 1969.
- ZLAMALOVA, J. *Proceedings of the European Meeting of meat Research Workers*. **15**: 208 (Sum III) 1969.