



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

30206/84 Ej 2

Biología

ANÁLISIS E INVESTIGACIÓN MICROBIOLÓGICA  
DEL JUGO CONCENTRADO DE "Limón mexicano"  
(Citrus aurantifolia)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

GUADALUPE EUGENIA DALETH

G U E D E A F E R N A N D E Z

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

" GRACIAS A LA VIDA, QUE ME HA DADO TANTO"

Violeta Parra.

A mis Padres Dado y Eugenia, por todo ese cariño y apoyo que me han proporcionado para que salga de esta crisalida sin temores.

A mis Hermanos: Pancho, Chayo y Pepe , por cada una de esas bellas flores que siempre me han dado.

A mis primos:

Laura+, Giset+, Monica+ y Pepe+

A mis tíos y primos.

A mis queridos Abuelos:

Cruz+, Elvira y María Luisita.

Rogelio y Chayito.

A mi Nina ( Q.F.B. Guadalupe Fernández Barrera) por ese apoyo, consejos y cariño que me ha dado, ya que siempre ha estado dispuesta a escucharme y como una segunda - madre darme todo lo que tiene.

A mi tío Julio (Lic. Julio Guedea Valdespino) por toda esa confianza y cariño que me ha proporcionado.



Con cariño a mi escuela :

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

U.N.A.M.

A mis compañeros del FIDEFRUT, por toda la ayuda que me proporcionaron para la realización de este trabajo.

A mis amigos:

Lupita, Diego, Lety, Panchito, Angel, Marilu, Clancy y a todos aquellos cuyos nombres escapan de mi mente; pero que siempre han sido mis amigos.

Agradezco al M.en C. Sergio Vaca Pacheco por todo el -  
apoyo que me proporcionó para la realización de esta tesis  
ya que de no ser por él este trabajo nunca se hubiese he--  
cho.

Agradezco a la Q.B.P. Bertha Arguero Licea, que se a-  
trevió s scompañarme a subir esta pequeña pero difícil ci  
ma para así alcanzar la meta deseada.

Por los consejos y ayuda que me otorgó el Biólogo Je-  
sús Medina S.

Gracias.

Agradezco también a todas las personas que de una manera u otra me dieron información y apoyo para la -- realización de esta Tesis:

Químico Jorge Inclán, Miguel Cortéz, Q.B.P. Bertha Hashimoto, Biol Rebeca Gutierrez, M en C. Josefina Torres

I N D I C E

\* \* \* \* \*

	Págs.
Introducción. . . . .	1
Justificación. . . . .	15
Objetivo. . . . .	15
Materiales y Métodos. . . . .	16
Metodología. . . . .	18
Resultados. . . . .	24
Discusiones. . . . .	35
Conclusiones. . . . .	38
Apéndice 1. . . . .	39
Apéndice 2. . . . .	41
Bibliografía. . . . .	44

\* \* \*

## INTRODUCCION

Los cítricos han jugado un papel importante en la historia del hombre, ya que intervinieron al igual que muchas semillas en la vida sedentaria de éste y además de cultivar las seleccionaron sus frutos; Los cuáles fuéron llevados a diferentes sitios, dándoles usos de los más variados, tales como bebidas refrescantes, aplicaciones en perfumería usos medicinales, ornamentales, etc. (30)

Es probable que las frutas cítricas que primero llamaron la atención a los pueblos primitivos de Asia, presentaban un alto desarrollo a través de los procesos de la evolución natural; éstas fuéron escogidas como frutas que valían la pena cultivar y presumiblemente, la selección cruda de los mejores individuos para su programación se llevó a cabo durante varias décadas antes de que cualquier tipo se cultivara en los países Europeos. (30)

Por lo atractivo de los frutos y los árboles, los viajeros los llevaron de una parte a otra del mundo conocido, gracias a lo cuál los cítricos fuéron dispersados, pero éste proceso fué muy lento; se inició en el sur de China y -- probablemente también en la parte alta de Birmania. Se tienen evidencias de que también se conocían los cítricos en Mesopotamia, Egipto, Grecia, Italia y en otras culturas.

El primer componente de éste género que se conoció en las civilizaciones Europeas fué el "Citrón", en el año 310-A.C.; mientras que la "Naranja", el "Limón" y la "Naranja -

Dulce" fueron conocidos en Europa hasta aproximadamente en 1400 D.C., cerca de 17 siglos después de que el "Citrón" - incursionó en Europa. Aproximadamente en 1150 D.C., fueron introducidos el "Limón" y otros cítricos como la "Naranja-Amarga", el "Citrón" y la "Toronja" en España y en el Norte de Africa por los Arabes.

La introducción de los cítricos en América se debe al segundo viaje de Colón, iniciándose en Haití y Santo Domingo y después le ahí pasó al Continente.

Comparativamente pocos cambios se han requerido para desarrollar las mejoras de las variedades a partir de los frutos de tipos más primitivos. Webber dice que la "Naranja Valencia" y la "Naranja Ombligo de Washington" son de mayor tamaño y calidad superior a la mayoría de los retoños de la "Naranja Dulce", que sin duda representa un tipo más primitivo; de cualquier manera, en ausencia de las variedades mejoradas, los frutos de estos retoños son bastante aceptables. (30)

Los cítricos se han empleado desde la antigüedad casi en su totalidad, utilizándose además del fruto, sus flores, semillas, cáscaras, hojas y madera. Muchos de estos usos se debieron a su aplicación en la medicina y perfumería. (9,21)

En sus principios la industria cítrica, cuya sede original fué Sicilia, se centró principalmente en la extracción del Aceite esencial del "Limón". Actualmente, se trabaja con el jugo de cítricos y sus derivados, ampliamente distribuida a nivel mundial (22). Algunos de los Países --

que poseen esta industria son: (8) Italia, España, Japón, - Estados Unidos, Cuba, Brasil y México. (Fig. # 1)

Figura: 1 Países poseedores de Industrias Cítricas



En nuestro País la producción de cítricos se concentra en los estados que presentan las siguientes característi---cas: Altura sobre el nivel del mar de 0 a 800 metros, con predominio de climas templados húmedos sin presencia de --heladas (22), con suelos de textura ligera (Arcilloso-are--noso de 20 a 35 de arcilla) (1). Siendo los siguientes es--tados los de mayor importancia productiva: Colima, Guerrero Michoacán, Oaxaca, Veracruz y Tamaulipas. (Fig. # 2) (2). - La tabla 1 indica estados productores y producción obtenida en 1979. (2)



TABLA No. 1

ESTADOS PRODUCTORES DE LIMON EN LA REPUBLICA MEXICANA Y  
PRODUCCION OBTENIDA EN 1979.

1 Baja California Norte	696 Toneladas
2 Baja California Sur	244 Toneladas
3 Campeche	1172 Toneladas
4 Colima	213351 Toneladas
5 Chiapas	5825 Toneladas
6 Durango	70 Toneladas
7 Guanajuato	239 Toneladas
8 Guerrero	39839 Toneladas
9 Hidalgo	148 Toneladas
10 Jalisco	11762 Toneladas
11 México	1592 Toneladas
12 Michoacán	30894 Toneladas
13 Morelos	4977 Toneladas
14 Nayarit	2816 Toneladas
15 Oaxaca	31155 Toneladas
16 Puebla	2409 Toneladas
17 Querétaro	461 Toneladas
18 Quintana Roo	280 Toneladas
19 San Luis Potosí	6943 Toneladas
20 Sinaloa	1188 Toneladas
21 Sonora	1543 Toneladas
22 Tabasco	4050 Toneladas
23 Tamaulipas	11708 Toneladas

24 Veracruz	35877 Toneladas
25 Yucatán	8928 Toneladas
26 Zacatecas	2 Toneladas

B.N.M. y Conafrut Producción de Frutos en México  
1979.



Fig. 2: Estados de mayor producción de cítricos.

El "Limón" más cultivado en la República Mexicana es el "Criollo de Teconía" o "Mexicano"; otras variedades que se cultivan son: "Bureka" o "Limón sin semilla", "Beare" -- o "Pera", "Citrus Macranthyla" y el "Citronelo 4475" (23).

El "Limón Mexicano" es un cítrico que presenta la siguiente clasificación taxonómica:

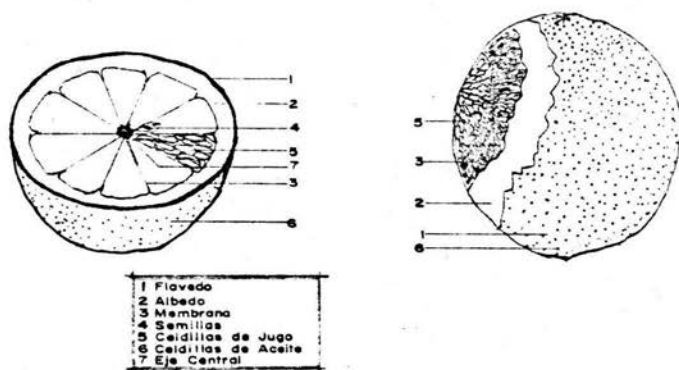
Orden:	Coronales
Familia:	Rutaceas
Género:	Citrus
Especie:	Citrus aurantifolia (Swingle)
Variación:	Mexicana o Criolla

Este es un árbol de hojas punteadas glandulares, sin -  
 espículas, alternas simples, con caliz de 4 a 5 pétalos, --  
 valvadas o imbrincadas, libres con 10 estambres, con gine--  
 cóo súpero, 4 o 5 carpelos (22). Sus frutos son verde ama--  
 rilloso, induricentes y se encuentran compuestos por tres -  
 partes:

- Epicarpio
- Mesocarpio
- Endocarpio

Al epicarpio y mesocarpio se les conoce conjuntamente  
 con el nombre de "Cáscara", el endocarpio es la parte comas-  
 tible y se encuentra formada por segmentos o "gajos".  
 Figura. # 3 (21).

ESTRUCTURA DEL FRUTO CÍTRICO



Algunos insectos de diferentes especies afectan la producción del "Limón Mexicano"; tales son: Pulgón (Toxoptera aurantii); Mosca Blanca (Trialeurodes sp) y escamas (Aonidella citrii); todos estos organismos y otros con los --- vectores más frecuentes de las diversas enfermedades provocadas por bacterias, hongos y virus (23).

La enfermedad más generalizada producida por bacterias es el "Marchitamiento bacteriano", que es provocada por Phytophthora syringae. (23)

Las provocadas por virus son:

- "Lepra o Psoriasis", causada por Citriovirus psoriasis en las variedades: vulgaris tipo A, vulgaris tipo B y Concavum. Donde el ataque es del centro hacia afuera secando la planta. (1)

- "Holosporosis" o "sequencia" provocada por Citriovirus encroscitiae. Donde la planta muere en tres años (1).

- "Tristeza" o "Quick decline" originada por Citriovirus viatoris y otras especies, según Fawcett y Wallace. Es una muerte lenta, la planta puede durar años o sufrir un declinamiento rápido. Es transmisible por diferentes especies de pulgón como son: "Toxoptera citridus, Toxoptera kahaladi, - Aphis spinosicola, Aphis gossypii" (1, 23)

Las principales enfermedades provocadas por hongos son:

- "Gomosis infecciosa" ocasionada por Phytophthora citrophthora y Phytophthora parasitica, se manifiesta como un crecimiento gomoso que escurre por el tronco; cuando se -- presenta rodeando el cuello del tronco y la raíz de la plan

ta, esta muere; pero si no llega al límite el árbol queda debilitado y susceptible a cualquier otra enfermedad.

(1,14,23)

"Negrilla" o "Tizno" causada por Funage vagans y Liman cina citri; aparecen laminas de color negro y gris que cubren las hojas total o parcialmente por la cara superior.

Se reduce la superficie foliar, hay desequilibrio que frena el desarrollo normal. Es transmitido por la cochinilla Saissetia oleae. (1,14,23)

- "Caries" es provocada por diversos hongos de los géneros Hydum, Stem, Polyporus, Polysticus, etc. se trata de una lenta decadencia de la planta con disminución de la parte cosechable, ramas o árboles debilitados con destrucción del tejido leñoso. (1)

- "Aguado" o "Podredumbre" o "Ajuntl", causado por Phytophthora hibernalis y Phytophthora syringae. Sucede una infección de los frutos que se encuentran a una altura de 1 a 1.5 metros, los cuales caen al suelo con manchas de color marrón. (1,14)

- "Antracnosis" es producida por Colletotrichum gloeosporoides. El fruto se seca y hay un marchitamiento general en el árbol, debido a plantaciones descuidadas y suelos impropios. (1)

- "Podredumbre de raíz" es ocasionada por Phonosis citri; es una podredumbre del fruto que empieza alrededor del posón y es debida a una mala irrigación. (1,14)

- "Alternia" es originada por Alternia citri y donde el fruto atacado no se puede conservar, son árboles débiles en los que influye la madurez y la humedad. (1,14)

- "Mal seco de los agrios" la cual es producida por --- Deuterophomas traqueiphila en la cual se pierden hojas y -- puede morir la planta. (1)

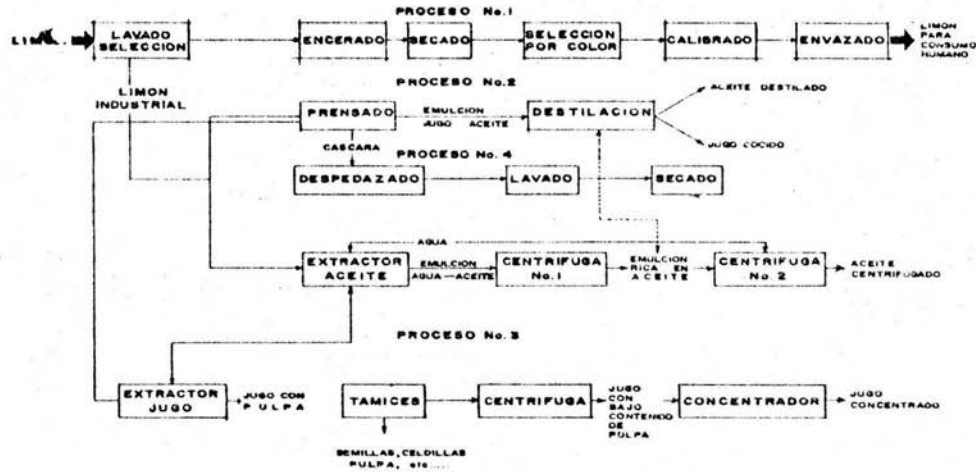
Debido a la causa de estas enfermedades y a lo estricto de las normas de calidad (Características Físicas, Químicas y Biológicas del producto; uniformidad del mismo, pureza, etc.), el Limón Mexicano pasa por varias etapas de selección durante su procesamiento. (9,19)

Los productos industriales primarios susceptibles a obtenerse a partir del limón son; Esquema # 1.

- 1).- Aceite esencial destilado que se utiliza para la elaboración de refrescos, saborizantes y esencias, así como aditivos para perfumería.
- 2).- Aceite esencial centrifugado tipo "B"; se emplea como saborizante en la industria alimenticia.
- 3).- Cáscara deshidratada; se utiliza como materia prima para la estación de "Pectinas", que se emplean en la industria farmacéutica y alimenticia.
- 4).- Jugo concentrado; se utiliza como sustituto del limón fresco; como preparado para limonadas (elaborado con jugo concentrado y azúcar); en la elaboración de mermeladas y jaleas, así como para balancear la acidez de los jugos enlatados, etc. y se encuentra en estudio la utilización del jugo concentrado para la elaboración de aderezos para verduras y ensaladas. (9)

ESQUEMA I

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA INDUSTRIALIZACION DEL  
" LIMON MEXICANO "





Los valores Fisicoquímicos que posee el Jugo Concentrado de Limón Mexicano son los siguientes: Posee un pH de --- 2.0 a 2.6; posee además 45.1 a 46.1 % de Sólidos (grados -- Brix corregidos), densidad de 1.91 a 1.200; su índice de -- refracción es de 1.3941 a 1.3971; éstos valores se refie-- ren al producto a una temperatura de 20°C. (11,21).

En algunos de estos productos es importante la conta-- minación debido a que son ingeribles, tal como el Jugo Con-- centrado de Limón. Sin embargo los estudios realizados so-- bre estas contaminaciones se basan en Jugos de otros cítri-- cos tales como la "Naranja" y la "Toronja"; Murdock (1979 - U.S.A.) en los estudios que ha realizado ha encontrado mi-- croorganismos tales como:

- Bacterias pertenecientes específicamente a los géne-- ros Lactobacillos y Leuconostoc; mohos y levaduras (16).

En otras investigaciones realizadas en diferentes fe-- chas (15), se indica que las levaduras que se pueden desa-- rrollar son las siguientes: Zigosaccharomyces vini y Zigo-- saccharomices rouxii así como Hanseniaspora melligai.

Davenport (Comunicación personal, 1982) (6), especifi-- ca que los tipos de Microorganismos que pueden desarrollar se son:

- Acetobacter milinum y las bacterias pertenecientes-- al género Leuconostoc. Siendo rara la presencia de mohos - filamentosos y los que se pueden presentar son los perte-- necientes a los géneros: -Penicillium, Aureobasidium y --- Geotrichum; siendo más comunes las levaduras que provocan-- fermentación como son las pertenecientes a los géneros ---

Saccharomices y Zigosaccharomices; así como las que forman una película en medio líquido como son las pertenecientes a los géneros: Candida, Pichia y Hansenula.

Todos éstos microorganismos pueden desarrollarse en grado de constituir contaminantes graves que pueden repercutir en la economía de la industria cítrica.

De hecho el grado de contaminación de dichos productos vienen siendo, según Vandercock y Smolensky, (1979---1976) en dos diferentes trabajos, consecuencia de las adulteraciones que se realizan en los productos. La adulteración en los cítricos se han hechos de diversas maneras; -- agregando, como antiguamente se hacía, agua, azúcar y ácido; o de la manera sofisticada que es agregando nutrientes para que el jugo parezca normal. (18). La detección de tales adulteraciones se puede realizar por medios bromatológicos, como los realiza Ramajaro en España (21) o también por el desarrollo de microorganismos introducidos en el -- producto como lo hacen Vandercock y Smolensky así como -- otros investigadores. (16, 27, 28)

Se piensa que a causa de las condiciones tan ácidas -- como son un pH de 2. a 2.6, que presenta el Jugo Concentrado de "Limón Mexicano" para el desarrollo de microorganismos, el grado de contaminación debería de ser mínimo. Sin embargo y gracias a observaciones directas que se realizaron en el Jugo Concentrado, se puede afirmar que hay microorganismos que lo contaminan (Comunicación personal FIDE--FRUT); por lo anterior se puede pensar que presenta cierta tendencia a ser contaminada por los mismos microorganismos

que afectan a los productos obtenidos de los cítricos tales como la "Naranja", por pertenecer a la misma familia taxonómica y el procesamiento industrial del producto es similar.

## JUSTIFICACION

Las investigaciones a nivel de contaminación microbiológica en la industria mexicana de los cítricos empieza apenas a surgir. Los estudios sobre la detección de microorganismos contaminantes en los productos ya industrializados - que presentan un pH de 3 o superior, se basan principalmente en los jugos de "Naranja" y "Toronja" y se han realizado en otros países tales como; Estados Unidos e Italia y otros ya mencionados con anterioridad. La existencia de microorganismos contaminantes en el "Jugo Concentrado de Limón Mexicano" no se ha demostrado, aunque se sospecha la presencia de tales a pesar del pH tan bajo como lo es 2.0 a 2.6.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es:

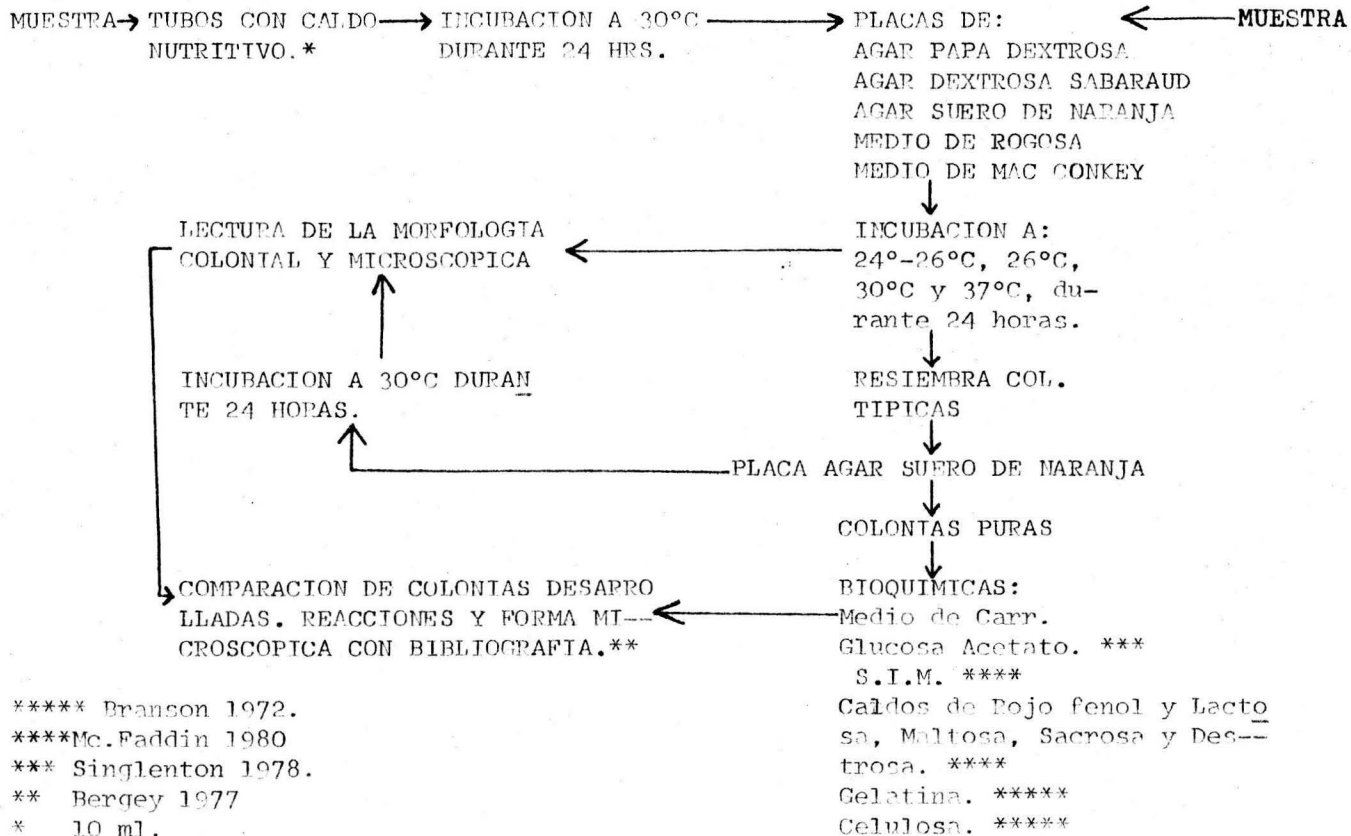
Aislar e Identificar los contaminantes Bacterianos y - Micóticos que se pueden desarrollar en el Jugo Concentrado de Limón Mexicano (Citrus aurantifolia).

## MATERIALES Y METODOS.

El trabajo consistió en un análisis bacteriológico del Jugo Concentrado de Limón Mexicano, para lo cual las muestras proporcionada fueron transportada en estado de congelación al laboratorio; descongeladas a temperatura ambiente, se les efectuó la siguiente metodología: (Branson 1972, --- Bickon 1975, Mac Faddin 1980, Murdorck 1973, Sigleton 1978, S.S.A. 1980.) Ver Cuadro # 1.

Los materiales y preparaciones que se utilizaron para esto se encuentran descritos en los apéndices 1 y 2 de --- este trabajo.

CUADRO # 1



\*\*\*\*\* Branson 1972.

\*\*\*\*\*Mc.Faddin 1980

\*\*\* Singleton 1978.

\*\* Bergey 1977

\* 10 ml.

Caldos de Rojo fenol y Lactosa, Maltosa, Sacrosa y Dextrosa. \*\*\*\*  
Gelatina. \*\*\*\*\*  
Celulosa. \*\*\*\*\*

## M E T O D O L O G I A

Se tomó una muestra de Jugo concentrado de Limón Mexicano, previamente descongelado a temperatura ambiente, al cual se le trató de la siguiente manera:

Se hicieron siembras con 1,0.5 y 0.1 ml. de Jugo concentrado de Limón Mexicano por la técnica de vaciado en placa en Agar Suero de Naranja, el cual es un medio que se usa para la propagación de bacterias que se desarrollan en jugos cítricos. Por otro lado se sembró 1 ml. por la técnica de vaciado en placa en Agar Suero de Naranja, el cual es un medio que se usa para la propagación de bacterias que se desarrollan en jugos de cítricos. Por otro lado se sembró 1 ml. por la técnica de vaciado en placa en Agar Papa Dextrosa y Agar Dextrosa Sebouraud, los cuáles son medios que se emplean para el desarrollo de mohos y levaduras. También se sembró 1 ml. con la misma técnica en los medios de Rogosa el cual es un medio que se utiliza para el desarrollo de lactobacilos y No. CONKEY para el desarrollo de coliformes.

Además se hicieron siembras de la muestra en diluciones de 1:10 y 5:100, en caldo nutritivo, el cual fué utilizado como diluyente y medio de propagación; las diluciones así como los controles (uno por dilución, en caldo nutritivo) fueron incubados a 30°C. durante 24 hrs. después de agitarlos suavemente, se tomó 1 ml. de cada uno de los caldos con desarrollo (indicado por turbidez) y se sembró por la misma técnica en los medios mencionados.

Todas las siembras (directas y en diluciones) fueron incubadas a diferentes temperaturas: 26°, 30°, 37° y a temperatura ambiente que oscilaba entre los 24° y 25°C., esto fué con el propósito de adecuar la temperatura óptima de desarrollo de los microorganismos en estudio en el término de 24 hrs.

Las colonias desarrolladas fueron contadas tomando en cuenta su similitud macroscópica en el contador "Quebec" -- y a las diluciones se les hizo la siguiente conversión:

Número de colonias por la inversa de la dilución:

EJEMPLO:

60 colonias desarrolladas X 100 (1:10 ó 10<sup>-1</sup>)=600 colonias (24,25).

Se realizó la lectura de la morfología colonial tomando en cuenta los siguientes parámetros: Color, tamaño, forma, transparencia, borde, consistencia, elevación y tiempo de desarrollo. Se tomaron en cuenta algunas características -- microscópicas de las colonias mediante diversas tinciones -- como fueron: Tinción de azul de Metileno, Tinción de rojo Congo (para microorganismos que poseen cápsula) y Tinción de Gram; se observó: Tamaño, presencia de cápsula y reacción con tinción de Gram de los microorganismos.

Las colonias se purificaron en Agar Suero de Naranja -- por la técnica de Estria cruzada; se incubaron a 30°C. durante 24 horas.

Se realizaron nuevamente análisis microscópicos de -- las colonias purificadas utilizando las tinciones de azul de Metileno, de rojo congo y de Gram.



Una vez purificadas las colonias en Agar Suero de Naranja se procedió a las pruebas "Bioquímicas" con el objeto de identificar a los microorganismos.

Las pruebas que se realizaron fueron las siguientes:

Siembras en medio de Carr, de Glucosa-Acetato, en --- S.I.M. en caldos de rojo fenol y Lactosa, Sacarosa, Maltosa y Dextrosa; así como pruebas de gelatina, catalasa y -- una implementación basada en la prueba de gelatina, se le llamó "Prueba de Celulosa" (4).

El medio de Carr se utilizó para la identificación de microorganismos que tienen la capacidad de utilizar el --- etanol como fuente de energía; tales como los pertenecientes a los géneros Gluconobacter y Leuconostoc, indicado -- por un cambio de coloración en el medio de verde a azul -- (3,18,24), el medio se sembró:

- Por la técnica de estria cruzada, incubándose a --- 30°C durante 24 horas.

- El medio de Glucosa-Acetato se usó para la identi-- ficación de microorganismos que poseen la habilidad de uti-- lizar el acetato como fuente de energía, como lo es el --- perteneciente al género Leuconostoc, indicado por un cam-- bio de coloración en el medio de verde claro a azul; tam-- bién se utilizó este medio para la identificación de micro-- organismos que poseen la capacidad de utilizar la glucosa-- como fuente de energía, como son los pertenecientes a los géneros Gluconobacter y Leuconostoc, esta propiedad se in-- dica por un cambio de coloración en el medio de verde a -- azul. Para la identificación de los microorganismos fué --

necesario modificar ligeramente el medio agregándosele .2 g de azul de Bromotimol como indicador de pH. (3,5,12,18) se siguió la misma técnica de sembrado que se utilizó para el medio de Carr.

El medio de S.I.M. fué utilizado para la identificación de microorganismos que liberan ácido Sulfhídrico ---- ( $H_2S$ ) por acción enzimática de los microorganismos que con tienen azufre (indicado por un ennegrecimiento en el medio). Por otro lado se detectó la presencia de Indol con el reactivo de Kovac (Ac. Paradimetilaminobenzaldehido), el cuál es un indicador que señala la capacidad de los microorga--nismos de desdoblar el indól de la molécula de triptófano--(indicado por la coloración rojo violácea en la superficie del medio) este reactivo posee aldehidos que al combinarse con el indól liberado se obtiene un compuesto rojo violá--ceo. Además por ser un medio semisólido se utilizó también para percibir la movilidad que tengan los microorganismos, que es indicado por la turbidez en el medio (12). El medio se sembró a partir de la colonia purificada por la técnica de Picadura, se incubó a 37° durante 24 horas.

Los caldos de rojo fenól y Lactosa, Sacarosa, Maltosa y Dextrosa, se utilizaron para la identificación de los --microorganismos que tengan la capacidad de fermentar un --carbohidrato específico produciendo ácido y/o gas. Los di-sacaridos como la Lactosa, Sacarosa y Maltosa son procesa--dos por enzimas exocelulares que poseen los microorganís--mos, como la permeaza, que los transforma en monosacaridos como la Dextrosa que son utilizados más facilmente por --- estos microorganismos, su utilización es indicada con la -

acidez por un cambio de decoloración en el caldo, de rojo - a amarillo y también es visible la producción de gas debido a la campana "Durham" o tubo invertido. (4,12); para las -- siembras en este medio se realizó una suspensión de una colonia purificada en 5 ml. de solución amortiguadora de citrato de sodio al 1 m., (homogeneizándose con ayuda del --- Bortex), se tomó muestras de 1 ml. y se sembraron en los -- tubos que contenían los caldos con carbohidratos, incubaron a 37°C para leerse en 24 horas.

La prueba de Gelatina se utilizó para la identifica-- ción y diferenciación de microorganismos, en este caso --- pertenecientes a los géneros Acetobacter y Gluconobacter, - fué empleado el método de la película de rayos "K", llevando el mismo principio que el de la prueba de gelatina, el - cual es determinar la capacidad de un microorganismo de --- producir enzimas de tipo proteolítico (Gelatinasas), siendo el resultado final una mezcla de aminoácidos individuales; el método de rayos "K" lleva como mecanismo de reac-- ción una visible movilidad de la capa de gelatina que posee la película en un tiempo determinado, 12, 24 y 48 ho-- ras (tomándose como respuesta positiva la movilidad de la capa de gelatina a las 12 horas de incubación). (3,5,13)

La prueba de la Celulosa como se indicó anteriormente es una implementación basada en la prueba de la gelatina; - y se utilizó en este caso para identificar a los microor-- ganismos pertenecientes al género Leuconostoc, y que ten-- gan la habilidad de remover la celulosa que posee la pelí-- cula fotográfica liberando bióxido de carbono también, ---

en un tiempo determinado, 12, 24, 48 horas; tomándose como reacción positiva a las 12 horas (5,7). Para las siembras de esta prueba y de la anterior (de gelatina) fueron tomados 0.5 ml. de la suspensión anterior que se inocularon en tubos utilizados para tales pruebas, se incubaron a 37°C., durante 12, 24 y 48 horas para observar los resultados. (5)

La prueba de Catalasa se empleó para la identificación de microorganismos que reaccionen con el peróxido de Hidrógeno liberando oxígeno gaseoso debido a la presencia de una enzima llamada catalasa, la cuál es una oxidorreductasa del peróxido de hidrógeno; la reacción positiva se indica por un burbujeo abundante, para esta prueba se tomó una asada de las colonias purificadas y se colocaron sobre portaobjetos limpios, adicionándose después una gota de -- peróxido de hidrógeno. (5,13)

## R E S U L T A D O S

Los microorganismos que se desarrollaron en el Jugo concentrado de Limón Mexicano fueron dos tipos de bacterias que crecieron en Agar Suero de Naranja, con las características morfológicas coloniales y microscópicas -- que se muestran en la tabla No. 1, así como sus reacciones a las pruebas Bioquímicas efectuadas que se presentan en las tablas No. 2 y 3, en la tabla No. 4 se muestran los resultados promedio obtenidos del conteo colonial que se realizó, tomándose en cuenta que en 10 ocasiones diferentes y repetidas se obtuvieron los mismos resultados en diluciones de 1:10.

En las tablas de referencia, basadas en el manual -- de Bergey, con números 5, 6, 7, 8, 9 y 10, se indican las -- características morfológicas, así como las reacciones -- bioquímicas de los organismos que poseen los géneros y -- sus especies, que se fijaron como guía de la identificación de los microorganismos aislados.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y MICROSCOPICAS DE LAS COLONIAS AISLADAS EN ACAR SUERO DE NARANJA

COLONIA No.	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS
1	<p>Colonia grande, convexa, cremosa, mucosa con borde entero, redonda, blanca, brillante, no translúcida, se desarrolló a 30°C. Colonias que al crecer se extendieron de forma irregular. *</p>	<p>Bacterias Gram Positivas, coccobacilos, en cadenas cortas o libres con cápsula.</p>
2	<p>Colonia pequeña, convexa, lisa, cremosa, entera, redonda, amarillosa, ligeramente transparente. Formó precipitados cristalinos en el medio. Se desarrolló a 30°C. *</p>	<p>Bacterias bacilares, Gram negativas, libres o en cadenas cortas.</p>

\* Fueron cotejados con la bibliografía correspondiente.

Tabla 2:

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LAS COLONIAS MARCADAS  
COMO No. 1 AISLADAS EN AGAR SUERO DE NARANJA

MEDIO	RESULTADO
CARR	+ (Positivo)
GLUCOSA-ACETATO	+ (Positivo)
S.I.M.	PRODUCCION DE AC.SULFURICO (H <sub>2</sub> S)-(Negativo)
S.I.M.	INDOL - (Negativo)
S.I.M.	MOVILIDAD - (NEGATIVO)
GELATINA	+ (Positivo)
CELULOSA	+ (Positivo)
PRODUCCION DE CATALASA	+ (Positivo)
CALDO DE ROJO FE- NOL Y DEXTROSA	+ (Positivo)
CALDO DE ROJO FE- NOL Y LACTOSA	+ (Positivo)
CALDO DE ROJO FE- NOL Y SACAROSA	+ (Positivo)
CALDO DE ROJO FE- NOL Y MALTOZA	+ (Positivo)

Tabla 3:

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LAS COLONIAS MARCADAS  
COMO No. 2, AISLADAS EN AGAR SUERO DE NARANJA

MEDIO	RESULTADO
CARR	+ (POSITIVO)
GLUCOSA-ACETATO	+ (POSITIVO)
S.I.M.	PRODUCCION DE AC. SULFURICO (H <sub>2</sub> S)-NEGATIVO
S.I.M.	MOVILIDAD - (NEGATIVO)
S.I.M.	PRODUCCION DE INDOL - (NEGATIVO)
GELATINA	+ (POSITIVO)
CELULOSA	- (NEGATIVO)
PRODUCCION DE CATALASA	+ (POSITIVO)
CALDO DE ROJO FENOL Y DEXTROSA	+ (POSITIVO)
CALDO DE ROJO FENOL Y LACTOSA	- (NEGATIVO)
CALDO DE ROJO FENOL Y SACAROSA	- (NEGATIVO)
CALDO DE ROJO FENOL Y MALTOSA	- (NEGATIVO)



Tabla 4:

RESULTADOS OBTENIDOS DEL CONTEO DE COLONIAS DE LOS MICROORGA--  
NISMOS QUE SE DESARROLLARON EN AGAR SUERO DE NARANJA.

MICROORGANISMO	CANTIDAD DE COLONIAS PROMEDIO 1 ml.
<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	30
<u>Glucobacter oxidans oxidans</u>	70

Tabla 5:

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL GENERO

LEUCOMSTOC

<p>MORFOLOGIA MICROSCOPICA</p>	<p>Células Gram positivo, en forma de coccobacilos en pares o en cadenas cortas y pequeñas, forman cápsulas y no forman esporas. Miden de 0.5 - 7 x 0.7 - 1.2 um.</p>
<p>MORFOLOGIA COLONIAL</p>	<p>Colonias grandes, (Usualmente menores de 1 mm. de diámetro), viscosas (Mucosas), blanco grisáceas, enteras, redondas, brillantes. En medio líquido forman una película de Sacarosa.</p>

Tabla 6:

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL GENERO

GLUCONOBACTER

<p>MORFOLOGIA MICROSCOPICA</p>	<p>Células Gram negativo, elipsoidales o en forma de bacilos, miden de 0.5 - 0.8 x 1.5 - 2.0 um; se les puede encontrar simples, en pares o en cadenas, pueden o no poseer flagelos.</p>
<p>MORFOLOGIA COLONIAL</p>	<p>Colonias de tamaño pequeño, cremosas, blanco lechosas a amarillosas; algunas veces es café en el centro y amarillo en la periferia; enteras, redondas, brillantes; puede haber formación de cristales de calcio en medios que contengan estas sales.</p>

Tabla 7:

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL GENERO Leucochoetoc

OXIDACION DEL ETANOL A Ac. Acético	+ (Positivo)
OXIDACION DE ACETATO A BIXIDO DE CARBONO Y AGUA	+ (Positivo)
OXIDACION DE GLUCOSA A GLUCOCONATO	+ (Positivo)
PRODUCCION DE CATALASA	-/+ (Negativo a Positivo)
PRODUCCION DE INDOL	- (Negativo)
FERMENTACION	
SACAROSA	+/- (Positivo o Negativo)
MALTOSA	- (Negativo)
LACTOSA	<b>+ (Positivo)</b>
DEXTROSA	+ (Positivo) FORMA SEDIMENTOS
TEMPERATURA DE DESARROLLO	20° - 30° C.

Tabla 3:

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL GENERO GLUCONODACTER

<p>HEIDROLISIS DE GELATINA</p>	<p>+/- (Positivo o negativo)</p>
<p>OXIDACION DE ETANOL A ACIDO ACETICO</p>	<p>+ (Positivo)</p>
<p>OXIDACION DE GLUCOSA A GLUCONATO</p>	<p>+(Positivo)</p>
<p>PRODUCCION DE CATALASA</p>	<p>+ (Positivo)</p>
<p>FERMENTACION DE:</p>	
<p>GLUCOSA</p>	<p>+(Positivo) SIN PRODUCCION DE GAS</p>
<p>MALTOZA</p>	<p>-/+ (Neg. o Positivo) SIN PRODUCCION DE GAS.</p>
<p>SACAROSA</p>	<p>-/+ (Neg. o Positivo) SIN PRODUCCION DE GAS</p>
<p>LACTOSA</p>	<p>- (Negativo)</p>
<p>TEMPERATURA DE DESCARROLLO</p>	<p>25° - 30° C.</p>

Tabla 9:

IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Leuconostoc*

CARACTERISTICAS	E S P E C I E S					
	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. dextranicus</i>	<i>L. paramesenteroides</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>L. oenos</i>
pH de Desarrollo	5.5 - 6.5	5.5 - 6.5	5.5 - 6.5	5.5-6.5	5.5 - 6.5	2.8-4.2
Cápsula	+ (Positivo)	- (Neg.)	- (Negativo)	- (Neg.)	- (Neg.)	-(Neg.)
Fermentación de Glucosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	d	+	d	+	+	-
Maltosa	+	+	+	+	d	-
Sacarosa	+	+	+	-	-	d

d= 10 - 90 % son positivos.

Tabla 10:

IDENTIFICACION DE LAS SUBESPECIES DE Gluconobacter oxidans

FERMENTACION	<u>G. oxidans</u> <u>oxidans</u>	<u>G. oxidans</u> <u>industrius</u>	<u>G.oxidans sub-</u> <u>oxidans</u>	<u>G. oxidans</u> <u>melanogenes</u>
FERMENTACION POSITIVA EN	L. ARABINOSA D. GLUCOSA D. GALACTOSA D. MANITOL D. XILOSA	SACAROSA	SACAROSA	GLUCOSA
FRACCION DE CRISTALES DE CALCIO	Sobre Agar que contenga carbo- nato de calcio extracto de - levadura y -- glucosa.	Sobre Agar que contenga carbo- nato de calcio y Glucosa.	No hay	No hay
VISCOSIDAD	SI	SI	NO	NO
DEXTRINA	No produce	En Dextrina	En Sacarosa	No produce
CARACTERIS- TICAS COLO- NIALES.	Colonia circun- lar, amarilla lechosa a blan- ca lechosa.	Colonia peque- ña no pigmenta- da; algunas -- pigmentadas de color café ro- jizo.	Colonia similar a <u>G.O. indus-</u> <u>trius</u> , no hay viscosidad, -- pigmento oscu- ro difuso.	Colonias de color café- oscuro

Por los resultados obtenidos y con ayuda de las tablas de referencia para la identificación de los géneros y de sus especies los microorganismos que se desarrollaron en este trabajo fueron:

Leuconostoc mesenteroides y Glucanobacter oxidans - oxidans (3), los que fueron aislados en Agar Suero de Naranja.

Por otra parte no hubo desarrollo de colonias de microorganismos en los medios de Agar Papa Dextrosa, Agar Dextrosa Sabaraud, Medio de Rogosa y Agar de Kc. Conkey.

## D I S C U S I O N E S

Los resultados encontrados en este trabajo muestran la presencia de Leuconostoc mesenteroides identificado básicamente por las pruebas bioquímicas ya antes mencionadas, su desarrollo en el jugo concentrado de Limón mexicano, -- con un pH de 2.0 - 2.5, tal vez sea debido a la cápsula de dextrano que posee incrementando la posibilidad de esta -- bacteria para colonizar medios de acidez elevada, además -- esta bacteria es capaz de utilizar la celulosa.

Es importante hacer notar que el concentrado de Jugo de Limón mexicano presenta algunas impurezas dentro de las cuales hay residuos de cáscara, la cual contiene una buena porción de celulosa utilizada por el Leuconostoc mesenteroides por una vía metabólica alterna. A su vez este microorganismo como sucede en el medio de Carr, utiliza el -- Etanol como fuente de energía debido probablemente a que -- posee una enzima que interviene en la oxidación del Etanol transformándolo en el ácido Acético como sucede con otros microorganismos. En el medio de Glucosa-Acetato esta bacteria utiliza el acetato como fuente de energía tal vez provocada por la oxidación de una enzima que puede causar una reacción alcalina por la oxidación del acetato a Bióxido -- de Carbono y agua como en otros microorganismos o también utiliza la glucosa del mismo medio, como fuente de energía debido probablemente a la intervención de una enzima que -- puede provocar una reacción alcalina a causa de la oxidación de la glucosa a gluconato; esto último puede apoyar --



que la actividad metabólica del L. mesenteroides ocasione -  
la acción del ácido ascórbico transformándolo en ácido ----  
hidroascórbico. (3,5,7,10,12,18,24)

Por lo anterior se reafirma la sospecha de que el L. -  
mesenteroides propicia en el concentrado de Jugo de Limón -  
mexicano el fenómeno de Sinergismo, debido a que este micro  
organismo alcaliniza ligeramente el producto haciéndolo es-  
peso y viscoso, lo que permite el desarrollo del Glucono--  
bacter oxidans oxidans, que a su vez también alcaliniza el  
producto un poco más, quedando el medio con un pH adecuado  
para mohos y levaduras. (5,12,16,29)

También se encontró en este trabajo la presencia de -  
la especie Gluconobacter oxidans oxidans, el cual no se en-  
cuentra reportado en la bibliografía como contaminante de -  
productos cítricos, esta bacteria utiliza en el medio de -  
Carr el etanol como fuente de energía, probablemente debido  
a una oxidación del etanol a ácido acético y tal vez sea -  
por la intervención de una enzima. Por otro lado, en el me-  
dio de Glucosa-Acetato utiliza la Glucosa como fuente de -  
energía, quizá a causa de la oxidación de la glucosa a ---  
gluconato por la intervención de una enzima. (3,7,13)

De acuerdo al pH del Jugo concentrado de Limón mexicana  
no se esperaba encontrar la especie Leuconostoc conos a --  
causa del pH óptimo de desarrollo de esta bacteria el cuál  
oscila entre los 2.0 y 4.0; pero tal vez por este rango --  
tan amplio que posee y que no tiene cápsula, no se desarro-  
lló en el Jugo concentrado de Limón mexicano. (3)

El índice de microorganismos como Leuconostoc sp que

se desarrollaron en el jugo concentrado de Limón mexicano - es bajo, a comparación de otros productos cítricos reportados en la bibliografía (29)

Por otro lado en este trabajo no se desarrollaron microorganismos tales como los pertenecientes al género Lactobacillus y coliformes que en otros trabajos se han reportado en cantidades mayores a 1000 bacterias/ml. (3,13,19,27)

## C O N C L U S I O N E S

1.- Los microorganismos que se desarrollaron en el Jugo concentrado de Limón mexicano (Citrus aurantifolia) son:

Leuconostoc mesenteroides

Gluconobacter oxidans oxidans

2.- El desarrollo de estos microorganismos no es favorable para la industria cítrica mexicana debido a que poseen la habilidad de modificar el producto de una manera negativa a causa de los cambios que provocan y hacen que este --- producto no pueda ser introducido en el mercado Nacional e Internacional de los alimentos industrializados.

3.- El Gluconobacter oxidans oxidans no ha sido reportado como contaminante de productos cítricos, por lo tanto es la primera vez que se le reporta como tal, en el Jugo -- concentrado de Limón mexicano.

4.- No hay desarrollo de otros microorganismos tales - como mohos y levaduras así como otros tipos de bacterias, - debido a las características fisicoquímicas del producto.

APENDICE 1.

M A T E R I A L E S

Físico.- Matróns Erlenmeyer de 500, 250 y 125 ml.  
Pipetas Bacteriológicas graduadas en 1, 5 y 10 ml.  
Pipetas automáticas "Gilson" con graduación de 0 a 200 microlitros, con sus puntas correspondientes.  
Tubos graduados de 100 y 50 ml.  
Tubos de ensayo de 16/150 mm. de 15/150mm. y de 12/20 mm.  
Tubos de tapan de rosca de 12/100 mm.  
Tubos de 3/20 mm. utilizados como "Campanas Durham".  
Cajas Petri "Pyrex"  
Asa de siembra de Microbal.  
Microscopio óptico "Zeiss", con aumentos de 10, 60 y 100 X.  
Módulo incubadora "Eicon", calibrado a 30° y a 37°C.  
Autoclave.  
Refrigerador.  
Bortón.  
Fanta y Cobre objetos.  
Lápiz cera y Marcador indelible.  
Placa radiográfica "Kodak" de 4 X 3 cm. para uso odontológico.  
Películas fotográficas "Kodak" Eastman Kodacolor II 35mm.  
1 rollo velado.

<u>Químico.</u> -Citrato de Sodio "J.T. Baker".	14.005 g por L.
Acetato de Sodio "J.T. Baker".	8.2 g por L.
Etanol "Merk"	30 ml. por L.
Glucosa "J.T. Baker".	1 g por L.
Peróxido de Hidrógeno.	10 ml.

<u>Colorantes.</u> - Azúl de metileno.	1 g.
Rojo Congo.	1 g.
Verde de Bromocresol.	.02 g por L.
Azúl de Bromotimol.	.02 g por L.
Reactivo de Indol (Ac. Paradimetilamino- benzaldehido).	50 ml.
Colorantes para Tinción de Gram.	Cantidad neces ria para 50 ml.

Medios de Cultivo.- Agar Dextrosa Sabouraud "Bioxon".

Agar-Agar Bacteriológico "Dibico"

Agar Papa Dextrosa "Bioxon".

Agar Suero de Naranja "Difco".

Caldo Nutritivo "Dibico".

Caldo de Rojo fenol y Dextrosa "biokon".

Caldo de Rojo fenol y Lactosa "Bioxon".

Caldo de Rojo fenol y Maltosa "Bioxon".

Caldo de Rojo fenol y Sacarosa "Bioxon".

Extracto de Levadura "Merk".

Medio de S.I.M. "Bioxon".

Medio de Rogosa "Difco".

Medio de Mc. CONKEY "Bioxon".

## APENDICE 2.

### PREPARACION DE MATERIAL

La preparación de la cristalería se realizó de la siguiente manera:

El material de vidrio fué lavado con jabón desengrasante y después de enjuagar con agua corriente, se enjuagó nuevamente con agua destilada y esterilizados a calor seco, con 160°C. durante 1 hora.

Las puntas de las pipetas "Gilson", fueron esterilizadas en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 20 minutos.

La preparación de los medios fué de la siguiente manera:

Agar Dextrosa Sabouraud.- 65 g. de medio se colocaron en 1 litro de agua destilada, se dejó durante 10 minutos, se hirvió por 1 minuto y se esterilizó a 121° C. durante 15 minutos a 15 libras de presión se vació en cajas de Petri estériles.

Agar Papa Dextrosa.- 39 g. medio fueron colocados en 1 litro de agua destilada, se dejó durante 10 minutos, se hirvió por 1 minuto y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos (15 libras de presión) se vació en cajas de Petri estériles.

Agar Suero de Naranja.- 45.5 g. de medio a los que se le agregaron 13 g. de Agar-Agar Bacteriológico, se colocaron en 1 litro de agua destilada, se dejó durante 10 minu-

tos, se hirvió por 1 minuto y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C con 15 libras de presión, se vació en cajas --- Petri estériles.

Caldo Nutritivo. - 8 g. de caldo fueron colocados en 1 litro de agua destilada, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión, después se vació en tubos de ensaye con tapon de rosca (10 ml. por tubo).

Los caldos de rojo fenol y Lactosa, Dextrosa, Maltosa y Sacarosa fueron preparados como a continuación se indica:

20 g. de caldo se le adicionaron a 1 litro de agua -- destilada, se vertieron a tubos de ensaye con tubos "Durham" (15 ml. por tubo), se esterilizó a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio de S.I.H. - 30 g. de medio fueron agregados a 1 litro de agua destilada, se calentó durante 1 minuto, --virtiéndose después en pequeños tubos de ensaye y se esterilizó a 121°C. a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Medio de Carr. - Fueron agregados a 1 litro de agua destilada: 20 g. de Agar Agar, 30 g. de Extracto de Levadura -- y 20 ml. de Etanol; se dejó durante 10 minutos y se le agregó a esta mezcla 0.02 g. de Verde de Bromocresol; se dejó hervir durante 1 minuto y se esterilizó a 15 libras de presión, se vació en cajas Petri estériles. (23)

Medio de Glucosa Acetato. - Se preparó de forma similar al medio anterior: A 1 litro de agua destilada se le -- agregaron 15 g. de Agar Agar, 2.5 g. de Extracto de Levadura, 1 g. de Glucosa, 8.2 g. de Acetato de Sodio y 0.02 g. de Azul de Bromotimol; se dejó durante 10 minutos y se hir-

vió por 1 minuto; se esterilizó a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. (23,4)

Agar de Mc.Conkey .- 50 g. del medio se agregaron a 1 litro de agua destilada, se dejó durante 10 minutos, se --- hirvió por 1 minuto y se esterilizó durante 15 minutos a -- 121°C con 15 libras de presión, se vació en cajas de Petri estériles.

Medio de Rogosa.- 84 g. del medio, se le gregaron 200 ml. de Jugo de Tomate (filtrado una y otra vez hasta obtener un suero amarilloso en muselina y gasa doble) y 800 ml. de agua destilada, se dejó hidratar durante 10 minutos; se le agregaron 1.32 ml. de Acido Acético; se dejó hervir por 1 minuto (no se esterilizó en autoclave) se vació en tubos de tapón de rosca (10 ml. por tubo)

Prueba de Gelatina.- Se cortaron tiras de 5mm. de película para rayos "K" sin revelar, que se introdujeron en tubos de ensaye de tapón de rosca estériles con 5 a 10 ml. de agua destilada estéril.

Prueba de Celulosa.- Se cortaron tiras de 5 x 1 mm. de película fotográfica velada, que se introdujeron a tubos de ensaye con tapón de rosca estériles con 5 a 10 ml. de agua destilada (que cubran la película) estéril.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amoros M. "Aguios" 1970, Guía práctica del tratamiento del aguio, Ediciones España, España, pp. 193.
- 2.- Banco Nacional de México-Conafrut. "Monografía de producción de frutos en México" 1979.
- 3.- "Bergey's manual of determinative Bacteriology", 1977 The William Wilkins and Co. U.S.A.
- 4.- Bionon, "Medios de Cultivo" manual 1, Bionon, medios de cultivo y reactivos de diagnóstico, Bionon de México, S.A.
- 5.- Branson D. "Methods in clinical bacteriology an manual of test and procedures" 1972, Charles C. Thomas Publish. U.S.A.
- 6.- Davenport Robert R. 1982, Facultad de Química. C.U. - Inf. Personal.
- 7.- Davis B.D., Dulveco R. et al. "Microbiology" 1980 --- Harper international Edic. U.S.A. 92-124 pp.
- 8.- Fajac F. "Les fruits Tropicaux et les legumes au Mexique" Fruits 39 (10): 33-40, 1980.
- 9.- Fidelin "Monografía" 1978 pp. 14, México.
- 10.- González Sergio 1984 U.M.F. E.N.D.P.I. Inf. Personal.
- 11.- Haro L. 1981 Fidefrut Tecomán Col. Inf. Personal.
- 12.- Lehninger "Bioquímica" 1978, Edit. Omega, 2a. Edic. - España, pp. 1117.
- 13.- Mac. Faddin "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica" 1980, Edit. Panamericana, pp. 301 Argentina.

- 14.- Mendes J. 1981 SARH Estación Tecomán, Inf. Personal.
- 15.- Murdock D.I. Hatcher. "Effect of temperature on ---- survival of yeast in 45° and 65° Brix orange concentrate" Jour of Food protection, 41(9): 689-691 Sep.- 1978.
- 16.- Murdock D.I. "Microbiology of citrus products" Cap.- 2, 1973, Citrus Science an Technology, Edit. AVI, U.S. A.
- 17.- Murdock D.I. "Significance of microorganism in frozen citrus products" Jour of food tech. 2: 187-189 - 1955.
- 18.- Phaff H.J. "Microorganismos Industriales" Scientific American, Microbiología Industrial 62: 1-176 Nov. -- 1981.
- 19.- Traloran J. 1980, "Les agrumes, collection de techniques agricoles et productins tropicales" Cap. 13, G.P. Maisonneuve et Loresse edit. 1980, Francia.
- 20.- Romanjaro y otros, "Detección de adulteraciones en el zumo de limón" Anales de la Bromatología 32 (1):33-40
- 21.- Safina 1978, "Los derivados de los cítricos" Tr. Fidelim, 118 pp. México.
- 22.- Sánchez S.O. 1979, "La flora del valle de México" --- Edit. Herrera, 232 pp. México.
- 23.- SARH 1972, "Guía para la asistencia técnica agrícola, area de influencia del campo agrícola experimental -- Tecomán" Centro de investigación agrícola del Bajío.- 61 p. México.

- 24.- Singleton P. 1978, Sainbury D. "Dictionary of micro--  
biology" A. Weley Intercience Publication, John Weley  
and Sons editors, U.S.A., 481 pp.
- 25.- C.S.A. 1980, "Técnicas para el muestreo y análisis --  
microbiológico de los alimentos" México.
- 26.- Vaca Sergio, 1983. UNF, E.N.E.P.I. Inf. Personal.
- 27.- Vandercock et al. "A rapid automated microbiological  
determination of orange juice authenticity", Jour of ---  
Food Science. 45: 1416-1418. 1980.
- 28.- Vandercock C.E., Smolensky D.C., "Microbiological ---  
assay with Lactobacillus plantarum for detection of-  
adulteration in orange juice" Jour of Assoc. of. Offi-  
cial analytical chem. 50(6): 1075-1079. 1976.
- 29.- Vandercock C.E., Smolensky D.C. "Easy method detects-  
juice dilution" Food products development Jour. 11 -  
(1): 60-61. Enero 1979.