

112
lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS
LACTEAS A PARTIR DE PRODUCTOS
ELABORADOS CON LECHE**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ROSALIA ELIZABETH MACHAIN CASTILLO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODOS	20
III. RESULTADOS	27
IV. DISCUSION	40
V. CONCLUSIONES	48
VI. RESUMEN	49
VII. APENDICE	50
VIII. BIBLIOGRAFIA.	58

I. INTRODUCCION

ANTECEDENTES

En la dieta alimenticia de la especie humana, la leche es considerada como uno de los alimentos básicos más completos, debido a su alto valor nutritivo y también a sus propiedades organolépticas. Estas características, que la han convertido en un alimento primordial para los seres humanos, se deben a su composición química; proteínas de alta calidad, carbohidratos, lípidos, sales minerales y vitaminas, los cuales se encuentran en una proporción bien balanceada.

Es por ello que desde la época antigua, el hombre se ha preocupado por conservar este alimento durante tiempos prolongados, lo cual motivó que se desarrollaran procesos de manufactura para lograr este objetivo.

Desde hace siglos se han utilizado cultivos para la obtención de diversos productos derivados de la leche (crema, mantequilla, gran variedad de quesos, yoghurt, leche ácida, etc.), pero sin saber exactamente quienes eran los agentes causantes de las distintas transformaciones de la leche.

Fue hasta 1857 cuando Pasteur descubrió las lactobacterias y las asoció a estos procesos fermentativos, lo cual marcó el antecedente para la aplicación de las bacterias lácticas en los procesos de elaboración de los productos derivados de la leche (10).

En 1890, Starch y Conn aislaron microorganismos a partir de productos naturales (crema) que producían ácido láctico y desarrollaban sabores característicos, dando lugar a lo que puede llamarse un cultivo natural (3,20).

Weigmann en 1899, estableció lo que fue el primer cultivo iniciador reconocido, y definió a las bacterias lácticas como aquellas bacterias que forman la leche ácida a partir del azúcar de la leche (11,20).

Es de 1910 a 1920 cuando Orla-Jensen, Von Freudenreich, Sherman, Hammer y otros microbiólogos aislaron bacterias de la leche y prepararon cultivos puros para la producción de leches fermentadas y quesos (16).

En 1919, Orla-Jensen elaboró una monografía en la cual apuntó que: las verdaderas bacterias del ácido láctico constituyen un gran grupo natural de bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, no esporulados, que al fermentar azúcares forman principalmente ácido láctico (11).

En los subsecuentes años se han realizado gran cantidad de estudios que nos han permitido conocer en forma más amplia las características y propiedades de las bacterias lácticas, así como los beneficios que reporta su utilización en la "Industria láctea y sus derivados".

CLASIFICACION

Las bacterias lácticas no constituyen un grupo rigidamente definido ya que al involucrar microorganismos con muchas especies, se da el caso de cepas que tienden a marginarse del grupo, o bien, dentro de especies formalmente excluidas del grupo se aíslan cepas con características que las hacen pertenecer al grupo. Es por ello que la conformación del grupo se ha ido delimitando a través de los años conforme se ha desarrollado el conocimiento de las características de este grupo de bacterias.

Así tenemos que Weigmann (1899) formó 5 grupos incluyendo entre ellos al grupo coliaerógenos y a micrococcos proteolíticos -- aerobios. Orla-Jensen (1919) se basó en la propiedad de producir ácido láctico para clasificar a estos microorganismos en dos grupos: Homofermentativos y Heterofermentativos (cuadro 1). Además al grupo coliaerógenos lo calificó de pseudoláctico (11).

En la actualidad las características del grupo se han ido delineando mejor al tomarse en cuenta nuevos atributos, como la

Cuadro 1. Clasificación de las bacterias
lácticas según Orla-Jensen (4).

A) Grupo Homofermentativo: Bacterias que solamente forman indicios de productos accesorios junto con ácido láctico, que representa del 90 al 97% de la lactosa fermentada.

I. Thermobacterium.
(Lactobacillus).

- Bastoncitos alargados, aislados o en cadenas cortas.
- Termófilos (temperatura óptima entre 40° y 50°C).
- Acidificantes muy enérgicos, hasta 2.7% de ácido inactivo o levógiro.
- Actividad caseolítica notable.

II. Streptobacterium.
(Lactobacillus).

- Bastoncitos cortos, en cadenas.
- Temperatura óptima cercana a 30°C.
- Acidificación muy lenta, pero intensa (1% y más),- ácido inactivo o dextrógiro.
- Actividad caseolítica.

III. Streptococcus (género conservado).

- Formas esféricas, cadenas de longitudes diversas, que pueden ser muy cortas en los medios sólidos.
-

Continuación del cuadro 1.

B) Grupo Heterofermentativo : La producción de ácido es más débil; además del ácido láctico se forman otros ácidos, sustancias diversas y CO_2 .

IV. Bifidobacterium.

- Bastoncitos que se ahorquillan en los cultivos viejos.
- Producen ácido acético en proporción elevada y ácido láctico dextrógiro.
- Anaerobios : abundantes en las heces de los lactantes.

V. Betabacterium
(Lactobacillus).

- Formas en bastoncitos, producción de gas, de ácido succínico, entre otros.
- No actúan sobre la caseína. Acido láctico inactivo.

VI. Betacoccus.
(Leuconostoc).

- Formas esféricas, semejantes a los estreptococos, pero el ácido láctico producido es levógiro.
 - Proceden de los vegetales en descomposición como remolachas.
 - Fermentan las pentosas y descomponen las pectinas.
 - Fermentación viscosa con la sacarosa y producción de mucílago.
-

Entre paréntesis, las denominaciones actuales de los géneros.

morfología (bacilos y cocos Gram positivos, no esporulados, nula o rara movilidad) y fisiología (metabolismo fermentativo, producto final principalmente ácido láctico, catalasa negativa, microaerófilos y anaeróbicos, por sus requerimientos nutricionales son quimiorganotróficos y requieren compuestos complejos, se desarrollan a temperatura media, es decir, son mesófilos) (24).

Recientemente se colocó a las bacterias lácticas en una sola familia, la cual se dividía en dos tribus: la Streptococcaceae y la Lactobacillaceae. Posteriormente se modificó un poco esta clasificación y ahora estos microorganismos se agrupan en dos familias: Lactobacillaceae y Streptococcaceae (cuadro 2) (7,10,25).

CARACTERISTICAS GENERALES.

En la actualidad las bacterias lácticas se identifican como cocos o bacilos Gram positivos, inmóviles, no esporuladas, fermentadoras de carbohidratos con producción de ácido láctico principalmente, tolerantes a los ácidos (se refiere a la capacidad para desarrollarse a pH relativamente bajo), catalasa negativas, no poseen la citocromo-oxidasa y son anaerobias facultativas o microaerófilas (soportan tensiones reducidas de oxígeno). Sin embargo, todas estas características con excepción de la Gram positividad, admiten en la práctica una cierta elasticidad o interpretación especial cuando no verdaderas excepciones (4,--10,11).

El grupo de las bacterias lácticas comparte una característica significativa : son exigentes en sus demandas nutricionales pues requieren carbohidratos para satisfacer sus necesidades energéticas, aminoácidos como fuente de nitrógeno y una variedad de factores de crecimiento (11).

También presentan diversas propiedades, entre ellas se tiene que: no reducen los nitratos, presentan baja actividad proteolítica en la leche, degradan más fácilmente los disacáridos (maltosa, sacarosa, lactosa) que las hexosas (glucosa, fructuosa, galactosa) de las --

Cuadro 2. Clasificación de las bacterias lácticas (4).

Familia	Anaerobiosis	Género	Tipo de Fermentación	Grupo	Especies Principales	Observaciones
Streptococaceae.	facultativa	<u>Streptococcus</u>	homo-	piógeno	<u>S. pneumoniae</u>	parásitos
			homo-		<u>S. pyogenes, agalactiae, uberis</u>	patógenos
			homo-	láctico	<u>S. lactis, cremoris, diacetylactis</u>	
			homo-	termófilo	<u>S. thermophilus, bovis</u>	ferm. láct.
	estricta	<u>Pediococcus</u>	homo-	enterococos	<u>S. faecalis, licuefaciens</u>	especies de los mostos
			<u>Leuconostoc</u>	hetero-	<u>P. cerevisiae</u>	
			<u>Peptostreptococcus</u>	hetero-	<u>L. citrovorum, kefir</u>	ferm. láct.
Lactobacillaceae	facultativa	<u>Lactobacillus</u>	homo-	mesófilo	<u>L. casei, plantarum, Teichmanii, bifidus</u>	ferm. láct.
				termófilo	<u>L. lactis, helveticus, bulgaricus, acidophilus, thermophilus, - delbruckii</u>	
			hetero-	mesófilo	<u>L. brevis, pastorianus</u>	
				termófilo	<u>L. fermenti, caucasicum</u>	
	estricta	<u>Eubacterium</u>	<u>Catenobacterium</u>			parásitos
			<u>Ramibacterium</u>			patógenos
			<u>Cillobacterium</u>			
<u>Cillobacterium</u>						

que están formadas; producen diversos tipos de ácido láctico, algunas -- dan ácido dextrógiro, otras ácido levógiro y también se presenta el ácido racémico inactivo (4).

Dentro del grupo se designan como bacterias homofermentativas a aquellas que producen fundamentalmente un 90% de ácido láctico durante el proceso de la fermentación y bacterias heterofermentativas cuando lo generan en un 50% y cantidades apreciables de otras sustancias como CO₂, alcoholes, aldehidos y ácidos orgánicos. El género Streptococcus está constituido por microorganismos generalmente homofermentativos, el género Leuconostoc lo constituyen principalmente microorganismos heterofermentativos y dentro del género Lactobacillus se encuentran ambos tipos (10,11).

También presentan diversos caracteres que son de importancia para los estudios de clasificación, algunos de ellos se enuncian a continuación:

A. Caracteres cito-morfológicos (4) :

Las dos grandes familias de las bacterias lácticas se distinguen principalmente por la forma de la célula; la de los estreptococos es esférica y la de los lactobacilos es alargada. Sin embargo, los lactobacilos tienen formas diversas, desde el cocobacilo (bastoncito muy corto, casi ovalado) hasta la forma filamentosas. La identificación de las bacterias por observación al microscopio, nos permite resaltar algunos aspectos característicos de las cepas, sin embargo, el aspecto microscópico por sí solo no permite la identificación, además debe hacerse con precaución ya que existen dos causas principales de error:

a) La modificación de la forma de las células como consecuencia de un cambio importante en las condiciones del medio, por ejemplo, pase de un medio sólido a un medio líquido.

b) Por efectos de la coloración algunas bacterias -- alargadas pueden parecer estreptococos.

B. Caracteres fisiológicos (4) :

a) Los efectos de la influencia de la temperatura -- permiten obtener datos precisos para la clasificación. Es importante conocer la posibilidad de crecimiento de un cultivo a temperaturas relativamente bajas (10° - 15°C) o relativamente altas (45°C). También es interesante conocer la termoresistencia a 65°C - $60'$ (supervivencia tras una duración de calentamiento de treinta minutos o más).

b) La inhibición por cloruro de sodio a concentraciones de hasta 6.5% es un carácter importante, sobre todo para los estreptococos. Hay cepas que se desarrollan abundantemente en presencia de esos inhibidores, mientras otras no se multiplican.

C. Caracteres bioquímicos (4,17) :

a) La producción de gas carbónico (fermentación gaseosa de los azúcares) permite distinguir las cepas heterofermentativas.

b) La capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un carbohidrato específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas visible, es una de las propiedades más importantes para la clasificación. Los productos finales de la fermentación bacteriana varían con cada especie y depende del sistema enzimático existente en la especie y las condiciones del medio ambiente.

Es preciso realizar la prueba en condiciones bien definidas, ya que es una de las más sensibles a las condiciones experimentales; la composición del medio de cultivo y el pH, tienen una gran influencia.

c) La producción de acetoina (o acetilmetilcarbinol) determina la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro (acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa. Esta producción se pone de manifiesto gracias a reacciones coloreadas muy simples, como la de Voges-Proskauer.

d) Un organismo puede mostrar una o varias reacciones metabólicas en un medio lácteo; cada una de ellas propia de una especie determinada, ayudando así a la identificación bacteriana. La leche

tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un organismo: fermentación de la lactosa (producción de ácido láctico principalmente); reducción del tornasol; formación de coágulo. La acción de la leche tornasolada se representa a veces por las letras: A=acidificación, C=coagulación y R=reducción, que se colocan en el orden deseado.

e) Comprobar la presencia de la enzima catalasa nos ayuda a la diferenciación entre géneros y también entre las especies. La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo; por lo general, los organismos que no poseen citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, si se deja acumular es tóxico para las bacterias y produce su muerte.

f) Otra determinación que es útil para diferenciar géneros y especies, es la presencia de la enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa, este sistema sólo se encuentra, por lo general, en los organismos aeróbicos, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno en el proceso de la respiración aeróbica.

Todas las características mencionadas con anterioridad tienen una gran relevancia a nivel práctico por diversas razones (3, 4,8).

a) La producción de ácido láctico y disminución del pH son importantes ya que, en algunos productos, se llevan a cabo condiciones de acidez que van a inhibir el desarrollo de bacterias putrefactivas, aumentando la vida de anaquel de dichos productos.

b) Porque establecen condiciones fisicoquímicas favorables para diversas transformaciones aplicables en la industria láctea, por ejemplo, el desuerado de la leche en la producción de quesos.

c) Por desarrollar sabores y olores deseados en los alimentos.

d) Porque son importantes en la dieta humana, sobre todo para individuos con problemas de intolerancia a la lactosa, además de fortalecer la flora bacteriana intestinal ejerciendo una acción anti-séptica por la producción de ácido láctico.

e) Por la producción a nivel industrial de ácido láctico.

f) Por la producción de enzimas que intervienen en la degradación de las proteínas, en especial de la caseína en el curso del afinado de los quesos.

g) Por su carácter inhibitorio debido a la producción de antibióticos, por ejemplo, la nisina y diplococcina producidas por estreptococos.

h) Porque en los alimentos se producen diversas alteraciones indeseables como: viscosidad, turbidez, gases, manchas, etc.

i) Por su utilización en valoraciones microbiológicas de vitaminas y aminoácidos aprovechando sus exigencias nutricionales.

DISTRIBUCION Y MEDIOS DE CULTIVO

El grupo de las bacterias lácticas se encuentra ampliamente distribuido. Pueden aislarse de una gran variedad de fuentes, tanto de naturaleza vegetal como animal.

Se les encuentra en abundancia en los productos vegetales; también existen normalmente en una gran variedad de alimentos, tanto crudos (verduras, frutas) como procesados (lácticos, cárnicos) (11).

En los humanos, las bacterias lácticas se localizan en el intestino, cavidad oral y vaginal, jugando un papel importante directa e indirectamente en la salud. Y específicamente, los lactobacilos llegan a ser muy abundantes en la materia fecal (11).

Una vez conocidas las fuentes de origen de estos mi-

carbohidratos fermentables. Los requerimientos nutricionales son característicos para cada especie.

Su rango de temperatura es de 5° - 53°C, pero el óptimo va de 30° - 40°C, generalmente son acidúricos, el pH óptimo es de - 5.5 a 5.8.

Se pueden aislar de productos lácteos y cárnicos; -- agua, aguas residuales, cerveza, vinos, fruta, jugos de fruta y vegetales en conserva. Se les encuentra en la boca, tracto intestinal y vagina de muchos animales homeotermos-incluyendo al hombre.

Género Streptococcus (7) :

Su forma celular va de esférica a ovoide, se presentan en pares o en cadenas cuando crecen en un medio líquido. Son Gram positivos y no móviles.

Son quimiorganotróficos con un metabolismo fermentativo, predominando como producto final de la fermentación de la glucosa, el ácido láctico dextrorrotatorio (homofermentativos), algunas especies fermentan ácidos orgánicos (málico y cítrico) y aminoácidos (serina y arginina). Los pigmentos solo se encuentran en los grupos B y D pudiendo ser rojos o amarillos.

Presentan una reacción negativa a las pruebas de benzidina y catalasa.

Son anaerobios facultativos, el oxígeno u otros aceptores de hidrógeno, pueden alterar los productos finales del metabolismo de los carbohidratos; el peróxido de hidrógeno puede ser acumulado en -- presencia de oxígeno.

Los requerimientos nutricionales son complejos y pueden involucrar aminoácidos, purinas, pirimidinas, péptidos, vitaminas y ocasionalmente ácidos grasos y altas tensiones de CO₂.

La temperatura óptima es alrededor de los 37°C, la temperatura mínima y máxima varían con la especie.

Se encuentran en el tracto alimenticio de rumiantes,

heces humanas, leche y productos lácteos.

Género Leuconoctoc (7) :

Las células presentan forma esférica y a veces se observa la forma lenticular, generalmente se encuentran en pares o cadenas. No son móviles. Son Gram positivos y no esporulados.

Son quimiorganotróficos y requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico y biotina.

El crecimiento depende de un carbohidrato fermentable; la glucosa es fermentada con la producción de ácido láctico D(-), -etanol y CO₂. Algunas cepas tienen un mecanismo oxidativo y en lugar de producir alcohol forman ácido acético.

Son catalasa negativa, no tienen citocromos.

No hidrolizan la arginina. Generalmente no acidifican ni coagulan la leche.

No son proteolíticos. No producen indol. No reducen los nitratos y no son hemolíticos.

Son anaerobios facultativos, su temperatura óptima está entre 20° y 30°C. No son patógenos para los animales y el hombre.

Se pueden aislar de soluciones azucaradas, vegetales fermentados, vinos y productos lácteos.

CULTIVOS INICIADORES

Los cultivos lácticos iniciadores pueden definirse como las mezclas de bacterias productoras de ácido láctico y otros compuestos aromáticos (como ácidos volátiles y diacetilo), que se usan en la preparación de diferentes variedades de productos de la industria alimentaria y que le confieren a éstos, características deseables en cuanto al aroma, sabor, textura y apariencia, además de ayudarles en su preservación (8).

Por otra parte, para que los cultivos iniciadores lo gren hacer los cambios deseados a la leche y obtener un producto de buena calidad, es necesario que estos cultivos lácticos cumplan con las características siguientes (8) :

a) Contener en forma balanceada los tipos de microorganismos deseados.

b) Poseer la capacidad de desarrollarse bajo las condiciones de uso y efectuar los cambios bioquímicos deseados durante la manufactura y maduración.

c) Estar libres de contaminantes.

La aplicación de los cultivos iniciadores en los procesos de manufactura de los derivados lácteos, se inició con el ya citado cultivo de Starch y Conn, a partir del cual se han desarrollado diversos cultivos comerciales producidos con cepas puras, éstos los podemos dividir en (20) :

1. Cultivos simples : formados por una sola cepa - (16,20).
2. Cultivos múltiples : formados por dos o más cepas del mismo género y especie (16,20).
3. Cultivos mixtos : formados por mezclas de cepas de géneros y especies diferentes (16,20).
4. Cultivos múltiples mixtos : elaborados con la combinación de cultivos múltiples, usando cepas de géneros y especies diferentes (16,20).

La preparación de estos cultivos iniciadores se hace con dos fines específicos:

1. Para productos donde se requiere únicamente la producción de ácido láctico (3).

Dentro de este grupo encontramos los cultivos de una sola cepa, que presentan la desventaja de ser muy sensibles a la inva --

sión por bacteriófagos, dado que éstos son específicos para cada cepa, - la industria láctea utiliza la rotación de cultivos como un método de -- prevención de contaminación fágica, pero tienen como consecuencia una variación en la calidad del producto aunque ello ocurre dentro de límites aceptables.

En cuanto a los cultivos de cepas múltiples, se aprovecha el efecto simbiótico entre los microorganismos para su desarrollo y la diferencia de cada uno en la velocidad de producción de acidez para evitar sabores amargos.

2. Para productos donde además de producir ácido se requiere el desarrollo de compuestos responsables del sabor y aroma (3) :

Dentro de este grupo encontramos los cultivos mix- - tos, en los cuales una especie es productora de ácido láctico y otros de los compuestos reponsables del sabor y aroma. Este tipo de cultivos tiene la ventaja de que si la cepa principal es atacada por bacteriófagos, - las demás son capaces de llevar a cabo a su fin la fermentación.

Los cultivos múltiples mixtos están formados por ce- pas múltiples de especies productoras de ácido, sabor y aroma.

En el siguiente cuadro se presentan los cultivos iniciadores involucrados en la elaboración de algunos productos lácteos -- (16,18,21).

Cuadro 3. Microorganismos involucrados en la elaboración de ciertos productos derivados de la leche.

Cultivo	Principal función conocida	Producto
<u>L. bulgaricus</u> <u>L. casei</u> <u>L. helveticus</u> <u>L. lactis</u>	ácido sabor	Yoghurt, quesos suizos, italianos, Emmental.
<u>L. acidophilus</u>	ácido	Crema ácida, leches ácidas.
<u>S. thermophilus</u>	ácido	Yoghurt, quesos italianos, Emmental, Cheddar.
<u>S. lactis</u>	ácido	Crema ácida, todos los tipos de quesos y fermentos.
<u>S. durans</u> <u>S. faecalis</u>	ácido sabor	Queso blando, Cheddar y algunos quesos suizos.
<u>Leuc. dextranicum</u> <u>Leuc. citrovorum</u>	sabor aroma	Crema ácida, queso cottage.

IMPORTANCIA DE LOS PRODUCTOS LACTEOS

Debido a las características atribuidas a los productos lácteos fermentados, existe en el mundo una marcada tendencia por el consumo de estos productos. El auge de estos productos se puede notar - en las estadísticas de consumo de países como Estados Unidos de Norteamérica en el que desde 1960 el consumo per capita de yoghurt ha sido duplicado (23), para el año de 1983 se tuvo 1.45 kg (2.3 lb) per capita (15); en la U.R.S.S. el consumo de cultivos de leche más crema fue de 1391 toneladas para el año 1983; en Francia para este mismo año se consumieron 230 toneladas de queso fresco (13).

En nuestro país también se presenta dicha tendencia y se tiene calculado que para el año de 1990 el consumo total de queso, mantequilla, crema y yoghurt será de 368000 toneladas (8). Sin embargo, al revisar la posición de la industria alimentaria en México, nos encontramos con el hecho de que nuestro país no es productor de los cultivos iniciadores lácticos. Como consecuencia de esto, en nuestro país se tiene lo siguiente:

a) Una variedad de productos típicos producidos a nivel artesanal sin ningún control, en donde la calidad de los mismos va a depender de las materias primas utilizadas y de la flora contaminante natural que éstas presenten (8).

b) La industria alimentaria que produce en pequeña o gran escala estos productos, la cual requiere de cultivos iniciadores lácticos ya comercializados, va a depender de la importación de los mismos (8).

También cabe resaltar que con la continua devaluación de nuestra moneda, cada vez será más alto el costo de importación de los cultivos iniciadores (cuadro 4) (8).

Cuadro 4. Volúmenes de importación de los cultivos iniciadores lácticos, así como su costo.

Año	Volúmen (Kg)	Valor (dlrs)	Peso/Dolar	Valor en Pesos	Pesos/Kg
1980	8 685	194 383	25	4 859,575	559
1981	37 921	459 526	25	11 488,150	307
1982	50 430	469 253	100	46 925,300	930
1983	18 278	208 002	150	31 200,300	1707

Debido a la importancia que tienen las bacterias lácticas como cultivos iniciadores en la producción de derivados lácteos y tomando en cuenta que en México, a la fecha, no se posee la tecnología adecuada para la producción y conservación de los cultivos iniciadores, se tiene como consecuencia que la industria láctea se enfrenta a la problemática de no contar con suficientes proveedores nacionales de dichos cultivos, lo que origina que la producción disminuya significativamente y con ello se incrementa el costo de los productos.

A efecto de poder brindar una solución adecuada a esta problemática, el presente trabajo se ha realizado con la finalidad de lograr los siguientes objetivos: aislar bacterias lácticas a partir de productos elaborados con leche e identificar las bacterias aisladas de los productos antes mencionados.

En trabajos posteriores se llevará a cabo la caracterización, conservación y producción de cultivos iniciadores, así como la implementación de un banco de cepas lácticas.

II. MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo se utilizó el material que, en general, se encuentra en un laboratorio común de Microbiología de alimentos.

MUESTREO

Las muestras que se utilizaron fueron de diversas -- marcas y se obtuvieron de tiendas comerciales. Se trabajaron un total - de 51 muestras distribuidas de la siguiente manera:

Producto	No. de Muestras
Mantequilla	7
Crema	5
Yoghurt	20
Queso	19
Total	51

AISLAMIENTO

Para realizar el aislamiento de las bacterias lácticas se utilizaron los medios de cultivo APN (Actidiona- Polimixina B-Nitrito de Sodio) y MRS (Man-Rogosa-Sharpe) por ser los recomendados en la bibliografía consultada (2,11). Los medios de cultivo y reactivos que se enuncian a lo largo de este capítulo se pueden revisar en el apéndice.

El aislamiento se realizó en condiciones de esterilidad, de acuerdo a la siguiente técnica (2) :

- 1) Se pesaron 10 g de la muestra en cuestión.

2) Se resuspendieron los 10 g en 90 ml de sol. salina al 0.85% y se licuaron por espacio de 30 a 60 segundos aproximadamente (dilución 1:10).

3) De la dilución anterior se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de ensaye que contenía 9 ml de sol. salina al 0.85%, así se obtuvo la dilución 1:100. Se procedió de la misma manera y se obtuvieron las diluciones 1:1000 y 1:10000.

4) Se inoculó 0.1 ml de la dilución 1:100, 1:1000 y 1:10000 en placas que contenían el medio APN y posteriormente se homogenizó con varilla de vidrio.

5) Se incubaron las placas a 37°C y 41°C durante 72 horas en atmósfera parcial de CO₂ (Esquema 1) (2).

6) Se seleccionaron las colonias de bacterias lácticas de las placas que presentaron crecimiento escogiendo diferentes colonias y sembrándolas cada una en placas que contenían el medio de APN, se incubaron a 37°C o 41°C por 48 horas en atmósfera parcial de CO₂. Este paso se repitió las veces necesarias hasta tener cultivos puros.

A continuación, se observó la morfología microscópica de las bacterias de cada colonia aislada por medio de la tinción de Gram (19). Y a cada colonia aislada se le realizó la prueba de la catalasa.

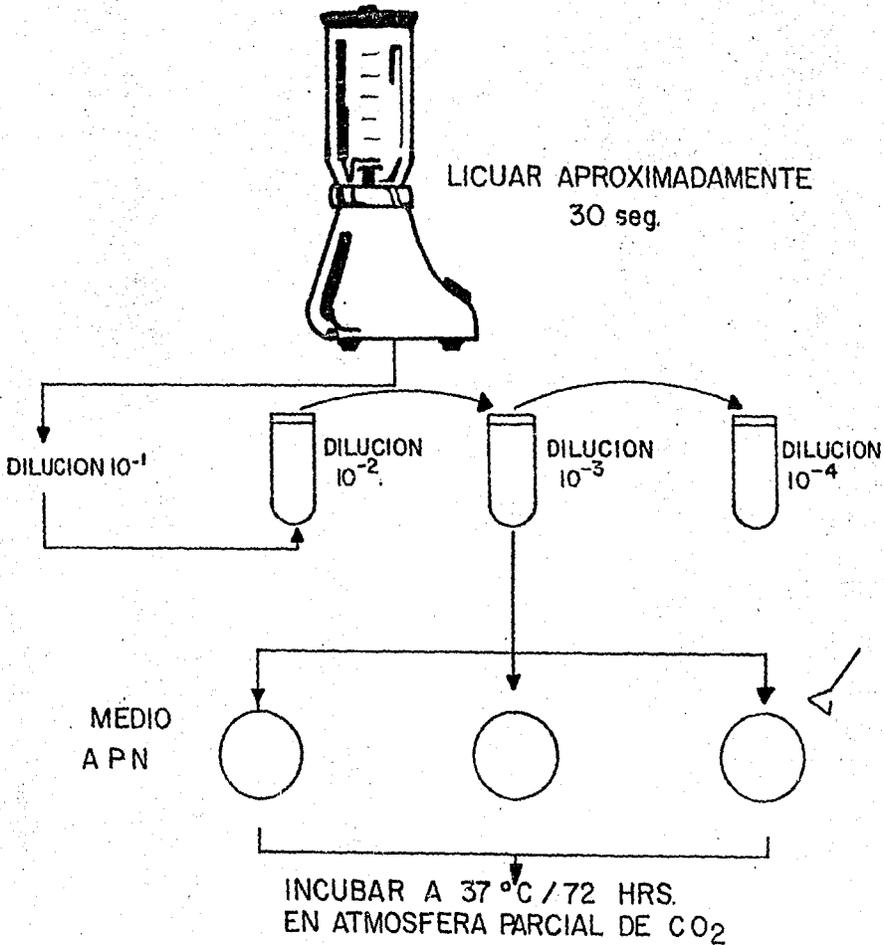
Si las observaciones anteriores indicaban que las bacterias presentaban forma de cocos o bacilos Gram positivos y que daban una reacción negativa a la prueba de la catalasa, entonces la colonia se sembró en un tubo con medio MRS inclinado. Los tubos se incubaron a 37°C o 41°C durante 48 horas en atmósfera parcial de CO₂.

A los tubos que presentaron crecimiento se les adicionó aceite mineral estéril y se guardaron en el refrigerador, de esta manera se mantuvieron para su posterior identificación bioquímica.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS LACTICAS

22

PESAR 10 gr DE MUESTRA { MANTEQUILLA
CREMA
YOGHURT
QUESO } + 90 ml. de SALINA 0.85 %



IDENTIFICACION BIOQUIMICA

Antes de iniciar la identificación bioquímica se comprobó que las cepas aisladas fueran cocos o bacilos Gram positivos y que respondieran negativamente a la prueba de la catalasa y oxidasa.

A continuación se describen las pruebas que se consideran como presuntivas para las bacterias lácticas (9,17).

1) Catalasa : Para realizar dicha prueba se siguió el método del portaobjetos, el cual consistió en recoger con una asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro de 18 a 24 h y se colocó sobre un portaobjetos, a continuación se agregó una gota de H_2O_2 al 30% sobre el organismo y se observó la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) tomando lo anterior como un resultado positivo.

2) Oxidasa : Se ocuparon tiras de papel impregnadas con reactivo, de marca Pathotec de General Θ Diagnostics. Se colocó la tira de prueba en una caja de petri; usando una asa bacteriológica, se tomó el centro de una colonia pura obtenida de un cultivo de 18 a 24 h y se colocó en la zona con reactivo (rosa-gris) de la tira de prueba; se frotó el inóculo en esta zona y se observó después de 30 segundos el color en el área inoculada de la tira de prueba. En una prueba positiva la enzima citocromo oxidasa acopla el alfa naftol y N,N-dimetil-fenildiamina y forman el indofenol el cual es un producto azul brillante. En una prueba negativa no se presenta el color azul.

Para la identificación bioquímica de las cepas se realizaron las siguientes pruebas, las cuales son las recomendadas por la literatura (9,17).

Pruebas de identificación:

- 1) Fermentación de Carbohidratos:
Rafinosa, Dextrosa, Dulcitol, Maltosa
Manosa, Manitol, Fructuosa, Sacarosa
Lactosa, Sorbitol, Celobiosa, Xilosa
Galactosa.

- 2) Producción de Acetoína.
- 3) Prueba de la Leche Tornasolada.
- 4) Supervivencia a :
63°C, 60' y a 65°C, 30'
- 5) Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl : 2%, 4% y 6.5%.

Las pruebas de identificación de fermentación de carbohidratos, producción de acetoína, leche tornasolada, supervivencia y crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, se realizaron a partir de cultivos puros en caldo MRS incubados de 18 a 24 h de las cepas aisladas, con el objeto de partir de inóculos homogéneos; a continuación se describen brevemente las pruebas.

1) Fermentación de Carbohidratos : Se preparó caldo MRS modificado en tubos de tapón de rosca de 13X100 conteniendo 3 ml cada uno; posteriormente se agregó 0.5 ml de la solución madre del carbohidrato deseado estéril en una concentración final de 1%, en condiciones de esterilidad. A continuación se adicionaron, con pipeta pasteur, dos gotas de la cepa a probar a los tubos que contenían los diferentes carbohidratos. Se incubaron a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ por 24 horas.

Ya que se tuvo crecimiento bacteriano en los tubos se procedió a la lectura de las 24 horas, para lo cual se agregaron, en condiciones de esterilidad, dos gotas del colorante rojo de clorofenol al 0.2% a cada tubo; si la coloración en el tubo se tornaba roja se interpretó como un resultado negativo y si se observaba un color amarillo se tomó como un resultado positivo (el microorganismo utiliza como única fuente de carbono el carbohidrato a probar). Se incubaron nuevamente los tubos, bajo las mismas condiciones, por espacio de 24 horas más y se procedió a la lectura de las 48 horas, de esta manera se corroboraron los resultados obtenidos.

2) Producción de Acetoína : Se utilizó el medio MR--VP de Bioxon de México preparándose conforme a las especificaciones del fabricante. Se preparó el medio en tubos de tapón de rosca de 13X100 -

conteniendo 3 ml cada uno; se inoculó cada tubo con dos gotas de la cepa en cuestión y se incubaron a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ por 48 horas. A continuación se agregó primero 0.6 ml de una solución alfa naf--tol al 5% y en segundo lugar 0.2 ml de una solución de KOH al 40%; se agitó el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener una reacción de color; se incubó el tubo de 10 a 15 minutos antes de la interpretación del resultado. Una reacción positiva se tomó cuando se obtuvo un color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina) y una reacción negativa cuando se presentó un color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo).

3) Prueba de la Leche Tornasolada : Se utilizó el medio de Leche Tornasolada de los laboratorios Difco preparándose conforme a las especificaciones del fabricante. Se preparó el medio en tubos de tapón de rosca de 13X100 conteniendo 3 ml cada uno; se inoculó cada tubo con dos gotas de la cepa a probar y se incubaron a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ por 48 horas. A continuación se realizó la lectura de la prueba tomándose como fermentación de la lactosa cuando la leche tornasolada presentó un color rojo-rosado, debido a la producción principalmente de ácido láctico, ya que el medio inicialmente es de color azul - púrpura cuando no está inoculado; cuando las bacterias no fermentan la lactosa pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche, se libera amoniaco dando en consecuencia un pH alcalino que se manifiesta en un color púrpura azulado. La reducción del tornasol se manifiesta por el cambio del color del medio a color blanco y esto se logra cuando los organismos son capaces de reducir el tornasol a una leucobase. Las bacterias lácticas son capaces de formar un coágulo el cual tiene la característica de ser firme, gelatinoso y que no se separa fácilmente de las paredes del tubo; se produce el coágulo por la precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de la lactosa. La digestión o peptonización de la caseína se produce cuando la bacteria que se desarrolla en la leche tornasolada contiene la enzima -- proteolítica caseasa y esto se manifiesta por la formación de una parte acuosa en la superficie del coágulo. También se puede observar la forma

ción de gases como resultado final de la fermentación de la lactosa produciéndose una fermentación turbulenta.

4) Sobrevivencia a 63°C durante 60 minutos y a 65°C durante 30 minutos : En dos tubos con caldo MRS se inoculó la cepa deseada y enseguida se sometieron a baño María, uno a 63°C durante 60 minutos y el otro a 65°C durante 30 minutos, posteriormente se incubaron a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ por 24 horas y se observó si se presentaba o no crecimiento.

5) Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl (2%, 4% y 6.5%) : Se inoculó cada una de las cepas en tubos con caldo MRS que contenían NaCl a las concentraciones correspondientes y se incubaron a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ por 24 horas y se observó si había o no crecimiento.

III. RESULTADOS

Para el aislamiento realizado en el presente trabajo se obtuvo que de las 51 muestras, 20 resultaron positivas, 14 negativas y 17 "no viables". Las muestras positivas se refieren a aquellos productos de los cuales se pudieron aislar microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas; las muestras negativas se refieren a los productos en los que al realizar el aislamiento, no se obtuvo ningún tipo de crecimiento microbiano, o bien, se encontraron microorganismos no pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas; y las muestras consideradas como "no viables" se refieren a los productos de los que se aislaron bacterias lácticas pero que en el transcurso del aislamiento, purificación e identificación perdieron su viabilidad (cuadro 5).

Cuadro 5. Aislamiento de bacterias lácticas a partir de productos derivados de la leche.

Producto	Muestras Positivas	Muestras Negativas	Muestras "No Viables"	Total
Mantequilla	1	4	2	7
Crema	2	1	2	5
Yoghurt	5	9	6	20
Queso	12	0	7	19
Total	20	14	17	51

Se obtuvieron un total de 469 cepas a partir de las muestras estudiadas, de las cuales 136 cepas fueron bacterias lácticas, 239 perdieron su viabilidad en alguna de las etapas del estudio y 94 cepas pertenecieron a microorganismos no lácticos.

Para las muestras de mantequilla se obtuvieron en total 29 cepas, en las muestras de crema 87 cepas, para el yoghurt 180 cepas y para las muestras de queso 173 cepas. El número de cepas de bacterias lácticas, cepas de microorganismos que perdieron su viabilidad y cepas de microorganismos no lácticos que se obtuvieron para cada producto analizado se encuentra representado en el cuadro 6.

Cuadro 6. Microorganismos aislados de productos lácteos.

Producto	Bacterias Lácticas	Microorganismos "No Viabiles"	Otros Microorganismos	Total
Mantequilla	3 (10.34%)	13 (44.82%)	13 (44.82%)	29
Crema	23 (26.43%)	59 (67.81%)	5 (5.74%)	87
Yoghurt	44 (24.44%)	67 (37.22%)	69 (38.33%)	180
Queso	66 (38.15%)	100 (57.80%)	7 (4.04%)	173
Total	136	239	94	469

Del total de cepas obtenidas en el aislamiento fue - en las muestras de queso donde se obtuvo el porcentaje mayor (38.15%) de cepas de bacterias lácticas, en las muestras de crema se tuvo el más alto porcentaje (67.81%) de cepas de bacterias lácticas "no viables" y en las muestras de mantequilla fue donde se obtuvo un mayor porcentaje -- (44.82%) de microorganismos no lácticos.

En lo que respecta a la identificación bioquímica, - los resultados experimentales obtenidos se compararon con los teóricos - de la bibliografía consultada (3,7,9,20), la que señala que la similitud de características teóricas debe ser igual o mayor al 80%, las caracte-- rísticas teóricas se presentan en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 7. Comportamiento bioquímico teórico de bacterias lácticas correspondientes al género Lactobacillus.

Prueba	1	2	3	4	5	6
Gram	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Sobrevivencia a:						
63°C 60'	-	-	-	-	-	-
65°C 30'	-	-	-	-	-	-
Prod. de Acetoína	d	d	-			
Crecimiento en NaCl:						
2%	+	+	+	+		
4%	+	+	-	-		
6.5%	d	d	-	-		
Fermentación de Carbohidratos:						
Rafinosa	-	+	d	-	-	-
Dextrosa	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	d	d	d	-	-	-
Maltosa	d	+	+	-	+	+
Manosa	+	+	+	-	+	-
Manitol	+	+	-	-	-	-
Fructuosa	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	d	+	+	-	+	-
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	d	-	-	-
Xilosa	-	d	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	+
Leche Tornosolada	ACR	ACR	ACR	ACR		
1. <u>Lactobacillus casei</u>						
2. <u>Lactobacillus plantarum</u>						
3. <u>Lactobacillus acidophilus</u>						
4. <u>Lactobacillus bulgaricus</u>						
5. <u>Lactobacillus lactis</u>						
6. <u>Lactobacillus helveticus</u>						

Simbolos: Reacción positiva + ; Reacción negativa - ;
Reacción variable d ; Acidifica, Coagula, Reduce ACR.

Cuadro 8. Comportamiento bioquímico teórico de bacterias lácticas correspondientes a los géneros Streptococcus y Leuconostoc.

Prueba	1	2	3	4	5
Gram	+	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-
Sobrevivencia a:					
63°C 60'	+	+	+	-	
65°C 30'	+	+	+	-	
Prod. de Acetoína	-	-	-	+	
Crecimiento en NaCl :					
2%	+	-	+	+	
4%	+	-	+	+	
6.5%	+	-	-	-	-
Fermentación de Carbohidratos :					
Rafinosa	+	-	+	-	-
Dextrosa	+	+	+	+	+
Dulcitol					
Maltosa	+	-	+	+	d
Manosa	+	-	+	+	-
Manitol	+	-	-	+	-
Fructuosa	+	-	+	+	-
Sacarosa	+	+	-	+	-
Lactosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	
Celobiosa					-
Xilosa	-	-	+	-	-
Galactosa	+	-	+	+	d
Leche Tornosolada	ACR	ACR	ACR	ACR	

1. Streptococcus faecalis var. licuefaciens
2. Streptococcus thermophilus
3. Streptococcus lactis
4. Leuconostoc lactis
5. Leuconostoc cremoris

Simbolos : Reacción positiva + ; Reacción negativa - ;
Reacción variable d ; Acidifica, Coagula, Reduce ACR.

De acuerdo a la identificación bioquímica realizada se obtuvo que de las 136 cepas aisladas correspondieron al género Lactobacillus 111 (81.61%) cepas, al género Streptococcus 23 (16.92%) cepas y 2 (1.47%) cepas al género Leuconostoc (cuadro 9).

Cuadro 9. Géneros identificados mediante pruebas bioquímicas.

Género	No. de Cepas	Porcentaje
<u>Lactobacillus</u>	111	81.61
<u>Streptococcus</u>	23	16.92
<u>Leuconostoc</u>	2	1.47
Total	136	100.00

En cuanto a los géneros obtenidos en los diferentes productos se tiene que: las 3 cepas de las muestras de mantequilla correspondieron al género Lactobacillus; en las muestras de crema las 23 cepas se identificaron como pertenecientes al género Lactobacillus; los resultados obtenidos para el yoghurt nos indicaron que las 44 cepas correspondieron al género Lactobacillus y para las muestras de queso se obtuvo que 41 cepas pertenecieron al género Lactobacillus, 23 al género Streptococcus y 2 al género Leuconostoc (cuadro 10).

Cuadro 10. Géneros identificados mediante pruebas -
bioquímicas a partir de productos lácteos.

Producto	No. de Cepas	Género
Mantequilla	3	<u>Lactobacillus</u>
Crema	23	<u>Lactobacillus</u>
Yoghurt	44	<u>Lactobacillus</u>
Queso	41	<u>Lactobacillus</u>
	23	<u>Streptococcus</u>
	2	<u>Leuconostoc</u>

En el cuadro 11 se presentan los resultados obtenidos en la identificación de las cepas aisladas a nivel de especie.

Cuadro 11. Identificación de bacterias lácticas aisladas
de productos derivados de la leche.

Producto	Muestra	Cepa	Género	Especie
Mantequilla	A	1,2,3	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
Crema	B	1,3,6,7,9	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		4,5,8	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		2	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u> o <u>L. lactis</u>

Cuadro 11. Identificación de bacterias lácticas
aisladas de productos derivados de
la leche (continuación).

Producto	Muestra	Cepa	Género	Especie
Crema	C	4,10,13	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		2,14	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
		1,7	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. helveticus</u>
		8,9,11,12	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		3,5,6	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. lactis</u>
Yoghurt	D	1	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
Yoghurt	E	4,7,8,9,10, 12,13,14,15, 18,19,20,21, 22,23	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		1,2,3,5,6, 11	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		6,17	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. lactis</u>
Yoghurt	F	1,2,3,4,5, 6,7	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
Yoghurt	G	1,4,5,8	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		2,3,6,7	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. lactis</u>
Yoghurt	H	1,2,5	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		3,4	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>

Cuadro 11. Identificación de bacterias lácticas
aisladas de productos derivados de
la leche (continuación).

Producto	Muestra	Cepa	Género	Especie
Queso	I	1	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		2	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
Queso	J	7,10,12,13, 14	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
		9	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		1,2,4	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>liquefaciens</u>
		3,8,11	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>liquefaciens</u> o <u>S. thermophilus</u>
		5,6	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>liquefaciens</u> o <u>S. lactis</u>
Queso	K	3	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
		1,2,3,4,5,6	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
Queso	L	1	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
Queso	M	5	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		3,4	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. plantarum</u> o <u>L. lactis</u>
		2,8	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>liquefaciens</u>

Cuadro 11. Identificación de bacterias lácticas
aisladas de productos derivados de
la leche (continuación).

Producto	Muestra	Cepa	Género	Especie
		1	<u>Streptococcus</u>	<u>S. lactis</u>
		6	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u> o <u>S. lactis</u>
		7	<u>Leuconostoc</u>	<u>L. lactis</u>
Queso	N	9,16	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u>
		3,7,10,11, 12,14,17	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
		13,15	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		4	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. acidophilus</u>
		8	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u>
		2	<u>Streptococcus</u>	<u>S. lactis</u>
		1,5,6	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u> o <u>S. lactis</u>
Queso	O	2	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u>
		1	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u> o <u>S. lactis</u>
Queso	P	1,2,3	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
Queso	Q	1	<u>Streptococcus</u>	<u>S. lactis</u>

Cuadro 11. Identificación de bacterias lácticas aisladas de productos derivados de la leche (continuación).

Producto	Muestra	Cepa	Género	Especie
Queso	R	1,2,3,4,5	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
		7	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. acidophilus</u>
		6	<u>Streptococcus</u>	<u>S. lactis</u>
Queso	S	2	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. lactis</u>
		1	<u>Lactobacillus</u>	<u>L. casei</u> o <u>L. plantarum</u>
		3	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u>
Queso	T	1	<u>Streptococcus</u>	<u>S. faecalis</u> var. <u>Ticuefaciens</u>
		2	<u>Leuconostoc</u>	<u>L. lactis</u>

Al llevar a cabo la identificación bioquímica nos encontramos con cepas que presentaron al mismo número de características similares a las teóricas para 2 ó 3 especies, por lo que se designaron como cepas de especies de clasificación incierta. De las 136 cepas de bacterias lácticas se encontraron 82(60.29%) especies de clasificación definida y 54(39.71%) especies de clasificación incierta. Para el género Lactobacillus se encontraron 67(60.36%) cepas de especie definida y 44(39.64%) cepas de especie incierta; para el género Streptococcus se tuvieron 13(56.52%) cepas de especie definida y 10(43.48%) cepas de especie incierta; y para el género Leuconostoc 2(100%) cepas de especie definida (cuadro 12).

Cuadro 12. Identificación de especies de clasificación definida e in cierta.

Género	Especies Definidas	Especies Inciertas	Total
<u>Lactobacillus</u>	67 (60.36%)	44 (39.64%)	111
<u>Streptococcus</u>	13 (56.52%)	10 (43.48%)	23
<u>Leuconostoc</u>	2 (100%)	-	2
Total	82 (60.29%)	54 (39.71%)	136

En el cuadro 13 se presentan las especies identificadas del género Lactobacillus en cada producto analizado, en donde se obtuvo que la especie incierta L. casei o L. plantarum fue la dominante - para las muestras de mantequilla, la especie L. casei fue la que se obtuvo con mayor frecuencia en las muestras de crema y yoghurt, para las -- muestras de queso la especie L. lactis fue la que se presentó con más - frecuencia.

Cuadro 13. Especies del género Lactobacillus identificadas mediante pruebas - bioquímicas, obtenidas de productos lácteos.

Producto	A	B	C	D	E	F	G	H
Mantequilla	-	-	-	3	-	-	-	-
Crema	8	2	2	7	-	3	-	1
Yoghurt	29	-	-	9	-	6	-	-
Queso	3	22	-	12	2	-	2	-
Total	40	24	2	31	2	9	2	1

A. L. casei
 B. L. lactis
 C. L. heiveticus
 D. L. casei o L. plantarum
 E. L. casei o L. acidophilus
 F. L. casei o L. lactis
 G. L. plantarum o L. lactis
 H. L. casei o L. plantarum o L. lactis

Nota : El número que señala la tabla corresponde al número de veces que se identificó esa especie en cada producto analizado.

En el cuadro 14 se presentan las especies identificadas del género Streptococcus y Leuconostoc. Estos género sólo se presentaron en las muestras de queso, en donde se obtuvo un mayor número de veces la especie S. faecalis var. licuefaciens y para el género Leuconostoc sólo se obtuvieron cepas de la especie L. lactis.

Cuadro 14. Especies del género Streptococcus y Leuconostoc identificadas mediante pruebas bioquímicas, obtenidas de productos lácteos.

Producto	A	B	C	D	E
Mantequilla	-	-	-	-	-
Crema	-	-	-	-	-
Yoghurt	-	-	-	-	-
Queso	9	4	2	3	7
Total.	9	4	2	3	7

A. S. faecalis var. licuefaciens

B. S. lactis

C. L. lactis

D. S. faecalis var. licuefaciens o S. thermophilus

E. S. faecalis var. licuefaciens o S. lactis

Nota: El número que señala la tabla corresponde al número de veces que se identificó esa especie en cada producto analizado.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IV. D I S C U S I O N

Al llevar a cabo el aislamiento de las bacterias lácticas nos dimos cuenta que es un proceso difícil y poco exitoso, ya que en menos del 50% de las muestras trabajadas se obtuvieron resultados positivos, lo cual pudo deberse a varias razones:

1. A sus complejas exigencias nutricionales. Las bacterias lácticas necesitan para su desarrollo determinados nutrientes que son específicos para cada especie, la literatura reporta una gran variedad de medios de cultivo que son aceptables para la propagación de estos microorganismos (24). El medio de cultivo APN utilizado en el presente trabajo pudo no ser lo suficientemente efectivo para aislar todas las especies involucradas en la elaboración de los productos lácteos ya que pudo carecer de nutrientes específicos que fueron vitales para el desarrollo de ciertas bacterias lácticas. Puede ser que el carácter selectivo del medio APN, que se le confiere al nitrito, no sea tolerado por ciertas especies, o que la actidiona (inhibidor de levaduras) y polimixina (inhibidor de bacterias Gram negativas) también puedan inhibir el crecimiento de bacterias lácticas que sean más sensibles (2,11). Como todos sabemos los agentes selectivos utilizados en los medios de cultivo pueden en un momento determinado tener una acción inhibitoria, aun sobre la misma flora microbiana que se trata de aislar, dependiendo del estado fisiológico en que se encuentren los microorganismos, pudiendo estas sustancias ejercer un efecto inhibitorio sobre las bacterias lácticas que estuvieran dañadas ("estresadas"), ya sea por los tratamientos aplicados en la obtención de los productos o por el efecto de la flora microbiana normal de estos alimentos.

2. A su temperatura óptima de crecimiento. Se tomó como base una temperatura promedio (37° -41°C) para lograr el crecimiento de la mayoría de las bacterias, sin embargo, algunas especies son más sensibles en este carácter y necesitan una temperatura precisa para desarrollarse, la cual pudo encontrarse por arriba o abajo del promedio utilizado (7).

3. Crecimiento de otros microorganismos. En el proceso del aislamiento también nos encontramos con crecimiento de microorganismos no pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas como levaduras y bacterias del género Bacillus, éstos se identificaron por su morfología microscópica y su reacción a la prueba de la catalasa que es positiva en ambos casos. El crecimiento de dichos microorganismos pudo inhibir a las bacterias lácticas, presentándose el fenómeno de antibiosis, el cual es una asociación antagónica entre microorganismos para el detrimento de uno de ellos (5).

4. A la invasión por bacteriófagos. Hay productos que están elaborados con cultivos iniciadores simples, los cuales son fácilmente atacados por los bacteriófagos, pudiendo ser ésta la causa por la que no se presentó crecimiento bacteriano (3,16,25).

5. Al efecto del pH. Si el pH del medio se mantiene constante a niveles favorables la población bacteriana se puede incrementar, sin embargo, el descenso del pH en el medio se presenta por la producción de ácido láctico proveniente de las bacterias lácticas, de esta manera se puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias lácticas, ya que no todas sobreviven a las mismas condiciones de pH, por ejemplo, se ha descrito que las bacterias del género Lactobacillus son más resistentes a las condiciones de acidez que las pertenecientes al género Streptococcus (10,22).

6. Elaboración de los productos por métodos no biológicos. En algunos productos con determinada marca comercial se repitió varias veces el proceso de aislamiento sin obtener en ellos ningún tipo de crecimiento microbiano, lo que nos hace pensar que en su elaboración no intervienen agentes biológicos y que para obtener las características propias del producto utilizan métodos químicos o enzimáticos; también pudieran contener inhibidores (antibióticos, preservativos o conservadores) adicionados intencionalmente con la finalidad de prolongar la vida de anaquel de esos productos, ya que no es factible que los productos estudiados, en condiciones normales de producción (sin adición de inhibidores), puedan estar ausentes de flora microbiana. En nuestro --

país, a la fecha, las normas sanitarias de productos derivados de la leche, no incluyen pruebas que testifiquen la presencia de bacterias lácticas en los mismos, por lo que el fabricante puede o no incluirlos en sus procesos de elaboración a pesar de manejar en la publicidad que están -- elaborados con cultivos iniciadores (2,11).

Es importante destacar que durante el aislamiento, - purificación e identificación de las bacterias lácticas, encontramos cepas que perdieron su viabilidad, lo cual pudo deberse a las condiciones de acidez no favorables en los productos estudiados, ya que se ha descrito que las bacterias lácticas en condiciones desfavorables presentan un tiempo de sobrevivencia corto y en los alimentos estudiados se desconocía la fecha de elaboración; por tanto, los productos pudieron tener un tiempo de almacenamiento (previo al estudio) prolongado, aunque los productos analizados presentaron características organolépticas aceptables y las muestras de yoghurt estaban dentro de fechas anteriores a la caducidad.

Como puede observarse en el cuadro 5, el porcentaje en el aislamiento de bacterias lácticas fue mayor (38.15%) en las muestras de queso, esto pudo deberse a que tras el proceso de desuerado, el queso suele contener un número de bacterias muy elevado que puede llegar a varios miles de millones por gramo y normalmente dominan las bacterias lácticas (4). En las muestras de crema fue donde se encontró el porcentaje más alto (67.81%) de bacterias lácticas "no viables", esto pudo darse porque quizá en un principio hubo crecimiento de cepas que produjeron una cierta cantidad de ácido láctico la cual sirvió para inhibir el posterior desarrollo de dichas bacterias, tal vez por lo expuesto anteriormente al principio del aislamiento se tuvo crecimiento de bacterias lácticas pero al pasar el tiempo las condiciones del medio se hicieron desfavorables para la sobrevivencia de las mismas bacterias (4). En las muestras de mantequilla fue donde se obtuvo un porcentaje mayor (44.82%) de microorganismos no lácticos, esto tal vez se debió a que las leches insuficientemente esterilizadas presentan como parte esencial de la flora microbiana a especies esporuladas (Bacillus) y levaduras; en la actualidad la pasteurización en el proceso de elaboración de la mantequilla -

esta tomando gran importancia: sin embargo, no todos los fabricantes la llevan a cabo, por lo que es posible obtener los resultados antes mencionados (4, 25).

En los resultados obtenidos se observa que el mayor número de bacterias aisladas pertenecen al género Lactobacillus (81,61%), siguiendo en orden decreciente el género Streptococcus (16.92%) y finalmente el género Leuconostoc (1.47%), esta distribución pudo deberse a:

1. Que los fabricantes de productos derivados de la leche utilicen en la composición de los cultivos iniciadores un mayor número de bacterias pertenecientes al género Lactobacillus por las características específicas que desarrollan en sus productos.

2. La competencia entre bacterias lácticas. La composición de los cultivos iniciadores es variada en cuanto a cepas pero - conforme transcurre la fermentación láctica una de ellas tiende a predominar e inhibir a las otras y en este caso pudo suceder lo antes señalado y predominar los lactobacilos. Las causas de este dominio pudieran explicarse por una mayor resistencia de los lactobacilos a altas concentraciones de ácido láctico y a fagos (26).

3. Al proceso mismo de elaboración en los productos. Para el queso y el yoghurt en un principio se tiene una flora de estreptococos siendo posteriormente desplazada por lactobacilos, quedando de esta manera solo los lactobacilos en la etapa final del proceso de los productos y de aquí que se identifique en mayor proporción al género -- Lactobacillus.

En lo que se refiere al proceso de identificación -- bioquímica se encontraron cepas que puede incluirse en dos o tres especies distintas (cepas de clasificación incierta) esto es, presentaron el mismo número de características para designarlas como una u otra especie. Se identificaron 82 (60.29%) especies de clasificación definida y 54 (39.71%) especies de clasificación incierta. Para poder esclarecer este problema es necesario realizar pruebas adicionales y/o específicas que requieran las especies en cuestión, como temperatura específica de creci

miento y pruebas de requerimientos nutricionales.

Es importante destacar que para llevar a cabo la identificación bioquímica de las bacterias lácticas se requiere de un número grande de pruebas (aproximadamente 20) las cuales involucran gran cantidad de material, tiempo y un costo elevado; por lo que se sugiere estudiar o implementar algunos otros métodos para su identificación como lo son los métodos miniaturizados (14). Estas técnicas actualmente están implementándose en el laboratorio en el cual se realizó este trabajo, por lo que no fueron utilizados para el desarrollo del mismo.

En las muestras de mantequilla solo se obtuvieron cepas pertenecientes a la especie incierta Lactobacillus casei o Lactobacillus plantarum. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura ya que es muy común encontrar a la especie L. casei como flora normal de la leche cruda ya que frecuentemente se encuentra en las máquinas de ordeñar y en los utensilios que están en contacto con la leche, además muchas cepas sobreviven a la pasteurización corta (10,12). La literatura reporta que para darle el aroma a la mantequilla, cuando ésta es madurada con cultivos iniciadores, se necesita la presencia de especies del género Leuconostoc; L. citrovorum y L. dextranicum. Sin embargo, en las muestras procesadas no se aislaron estas especies, lo cual pudo deberse a que las especies del género Leuconostoc son muy susceptibles a los antibióticos y que basta aproximadamente con 0.1 unidad de penicilina por ml para impedir su proliferación (12). Este antibiótico pudo haber llegado a la leche por adición a la misma para cubrir las condiciones antihigiénicas con las que se obtuvo y manejó la leche, o bien, porque los animales de los cuales se obtuvo la leche pudieran estar bajo tratamiento veterinario (aplicación de antibióticos) y en la leche proveniente de estos animales estar presente el antibiótico que inhibiera el desarrollo de este género. Otra circunstancia que pudo darse es que este producto no fue madurado con cultivos iniciadores y durante su elaboración se adicionó solamente el compuesto químico (diacetilo) responsable del sabor característico de la misma.

En las muestras de crema la especie con mayor inci--

dencia fue Lactobacillus casei y además se encontraron en menor cantidad las especies Lactobacillus lactis y Lactobacillus helveticus. Estos resultados son similares a lo reportado en la bibliografía ya que estas especies existen frecuentemente en la leche cruda y las podemos encontrar normalmente en las máquinas de ordeñar y utensilios que están en contacto con la leche (10). Además la especie L. casei tiene gran importancia en el agriado natural de la leche y crema por lo que este microorganismo es muy utilizado y se encuentra comunmente como componente en la elaboración de la crema (10,12). Sin embargo, la literatura también nos dice que las cepas de fermentos lácticos para la siembra de la crema son: estreptococos lácticos acidificantes (Streptococcus cremoris) y productores de diacetilo (Streptococcus diacetylactis). Las especies antes mencionadas no se aislaron en el presente trabajo lo cual pudo deberse a -- que S. cremoris para su crecimiento depende estrechamente de la leche, -- ya que no puede utilizar otros glúcidos más que la lactosa y los medios de cultivo que se utilizaron para el aislamiento de las bacterias carecían de este componente; además este microorganismo no se desarrolla o -- lo hace muy mal a 37°C y ésta fué la temperatura usada en el aislamiento para lograr el crecimiento de la mayoría de las bacterias (4). Ahora -- bien, S. diacetylactis se ha encontrado en las plantas y en los productos vegetales, que parecen constituir su hábitat normal, por lo que pudo ser esta la causa de no encontrarlo en los productos derivados de la leche analizados (4).

En las muestras de yoghurt la especie aislada con mayor frecuencia fue Lactobacillus casei, sin embargo, este resultado no es semejante a lo reportado en la literatura, ya que para la fabricación del yoghurt se utilizan, según la bibliografía, las especies Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus (10,12,25,26,27). Por lo cual se puede pensar que L. casei se presentó en el yoghurt por ser microorganismo normal de la flora bacteriana de la leche y no por ser utilizado como cultivo iniciador que se adicionó al producto. Quizá la causa por la cual no se encontraron cepas pertenecientes a S. thermophilus en las muestras procesadas es que los estreptococos proporcionan el pH necesario (por medio de su ligera acidificación) y las condiciones de --

tensiones bajas de oxígeno específicas para el crecimiento de los lactobacilos, aunque los lactobacilos a su vez le proveen a los estreptococos de los aminoácidos necesarios para su desarrollo; los lactobacilos producen más ácido láctico y los estreptococos son inhibidos y reemplazados por ellos, ya que son más sensibles a altas concentraciones de ácido -- (10,26). Ahora bien, la causa posible por la cual no se obtuvieron especies de L. bulgaricus pudo ser que su viabilidad se perdiera en el período de almacenaje del producto, ya que la sobrevivencia de este organismo en el producto es muy corto.

El número mayor de especies del género Lactobacillus identificadas para las muestras de queso fue L. lactis, esto concuerda con la literatura ya que como se dijo anteriormente, esta especie es muy común encontrarla en la leche cruda y además es uno de los microorganismos participantes en la maduración de los quesos en razón de sus propiedades proteolíticas (12). Las especies del género Streptococcus sólo se identificaron en las muestras de queso y la que se presentó con mayor incidencia fue S. faecalis var. licuefaciens, este resultado es similar a la bibliografía ya que esta especie es relativamente termoestable y -- por eso además de encontrarse en la leche cruda puede existir en la leche pasteurizada y especialmente en leche templada de quesería; un aspecto negativo de este microorganismo es que puede formar sustancias de sabor amargo (defectos del queso) (10), pero debido a su tolerancia a la sal y al calor se ha empezado a utilizar como cultivo iniciador en la -- elaboración de diversos quesos (10). También se aislaron cepas pertenecientes a la especie S. lactis, resultado que va acorde a la bibliografía, ya que es un típico habitante en la leche y en todos los aparatos -- en contacto con ella, aunque muere por pasteurización corta y alta puede estar en la leche pasteurizada como germen que ingresa después de la pasteurización (10,12). Se utiliza generalmente como cultivo iniciador por ser homoláctico y producir pequeñas cantidades de productos secundarios como ácido acético y diacetoilo (6). Algunas cepas de S. lactis elaboran un polipéptido complejo denominado "nasin" que es inhibidor de S. cremoris (12) y tal vez esta fue la causa por la que no encontramos en las -- muestras estudiadas a este microorganismo ya que es una especie que se --

utiliza frecuentemente como cultivo iniciador en la elaboración de quesos madurados. Para el género Leuconostoc sólo se identificó la especie L. lactis, lo cual concuerda con la literatura, ya que esta especie se ha encontrado en leches pasteurizadas debido a su termorresistencia (4).

Por lo expuesto hasta ahora, es evidente que muchos son los factores que intervienen en el aislamiento e identificación de las bacterias lácticas, incluyendo también el desconocimiento no solo a nivel técnico sino profesional de cómo manejar, sembrar, estudiar estos cultivos, ya que como se sabe a nivel de la industria el manejo de los cultivos se hace en forma casi empírica, utilizando cultivos que se solicitan para la elaboración de tal o cual producto, sin saber con certeza de qué cepas está constituido el cultivo.

Es importante destacar que cada proveedor de cultivos señala cuales son las condiciones en que se deben manejar los mismos para obtener la producción adecuada, utilizando generalmente como medio de propagación de estos cultivos a la leche y no proporcionan mayor información, por lo que pensamos que es importante continuar con este tipo de estudios que nos permitan un mejor conocimiento de cómo cultivar, aislar e identificar a estos microorganismos.

V. CONCLUSIONES

1. El aislamiento de las bacterias lácticas es un -- proceso difícil debido a las exigencias nutricionales que éstas requie-- ren para desarrollarse.

2. El aislamiento de bacterias lácticas fue más exi-- toso a partir de queso y crema, aunque la viabilidad de las cepas aisla-- das de este último producto fue menor.

3. El aislamiento de microorganismos no lácticos se -- presentó con mayor frecuencia en las muestras de mantequilla estudiados.

4. Se aisló un porcentaje mayor de cepas del género -- Lactobacillus (81.61%) en relación al porcentaje de los géneros Strep-- tococcus (16.92%) y Leuconostoc (1.47%) a partir de los productos -- estudiados.

5. La identificación bioquímica hasta especie de las bacterias lácticas requiere de un gran número de pruebas (aproximadamen-- te 20); sin embargo, es necesario en algunos casos incluir además prue-- bas de crecimiento a temperatura específica y de requerimientos nutricio-- nales para no obtener especies de clasificación incierta.

6. Las especies que se presentaron con más frecuen-- cia en los productos analizados fueron Lactobacillus casei y Streptoco-- ccus faecalis var. licuefaciens.

VI. RESUMEN

Debido a la importancia que tienen las bacterias lácticas como cultivos iniciadores en la producción de derivados lácteos y tomando en cuenta que en México, a la fecha, no se posee la tecnología adecuada para la producción y conservación de los cultivos iniciadores, se realizó en este trabajo el aislamiento e identificación de bacterias lácticas a partir de productos elaborados con leche, y en trabajo posteriores se llevará a cabo la caracterización, conservación y producción de cultivos iniciadores, con el fin de poder brindar una solución adecuada a esta problemática del país.

Se analizaron 51 muestras comerciales de productos lácteos (mantequilla, crema, yoghurt, queso), aislándose 136 cepas de bacterias lácticas, las cuales pertenecieron a los géneros Lactobacillus, Streptococcus y Leuconostoc. Se identificaron las siguientes especies : Lactobacillus casei, Lactobacillus lactis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus acidophilus, Streptococcus faecalis var. liquefaciens, Streptococcus lactis, Streptococcus thermophilus y Leuconostoc lactis.

VII. A P E N D I C E

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE APN (Actidiona-Polimixina B-Nitrito de Sodio)
(2,11)

INGREDIENTES	g/lt
Peptona	10.0
Leche peptonizada	10.0
Extracto de levadura	10.0
Glucosa	7.5
Extracto de carne	2.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.575
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.05
Tween 80	1.0
Agar	15.0

PREPARACION

Disolver los ingredientes en agua destilada a unos - 50°C, ajustar el pH a 5.5 y completar el volumen a 570 ml con agua destilada, distribuir en frascos en volúmenes de 97 ml y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Dejar enfriar a unos 50°C y adicionar a cada frasco 1 ml de cada una de las siguientes soluciones : nitrito de sodio al 6.0% recién preparada y esterilizada por filtración; actidiona al 0.1% y sulfato de polimixina B al 0.3%. Mezclar bien y utilizar.

MEDIO DE LECHE TORNASOLADA
(2,11)

INGREDIENTES	g/lt
Leche descremada en polvo	100.0
Tornasol	0.75
pH final 6.8	

PREPARACION

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Distribuir en tubos y esterilizar a 121°C -- (15 libras de presión) durante 15 minutos.

MEDIO MRS (Man, Rogosa y Sharpe)
(11)

INGREDIENTES	g/lt
Proteosa peptona No. 3 o Polipeptona	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1.0
Fosfato dibásico de potasio	2.0
Acetato de sodio trihidratado	5.0
Citrato de triamonio	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.05

PREPARACION

Disolver con calentamiento, agregar 20 g por litro - de agar, ajustar el pH a 6.5-6.6, antes de esterilizar a 121°C durante - 15 minutos.

CALDO MRS (Man, Rogosa y Sharpe)
(11)

Para preparar caldo MRS se adicionan los mismos ingredientes que para el anterior, con excepción del agar y se siguen las mismas instrucciones.

CALDO MRS MODIFICADO (para identificación bioquímica)
..(3,20)

INGREDIENTES	g/lit
Proteosa peptona No. 3 o Polipeptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Tween 80	1.0
Fosfato dibásico de potasio	2.0
Acetato de Sodio trihidratado	5.0
Citrato de triamonio	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.05

PREPARACION

Se disuelven perfectamente todos los ingredientes, se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Posteriormente se agrega, en condiciones de esterilidad, la solución madre del carbohidrato deseado estéril en una concentración final de 1%.

CALDO MRS CON CLORURO DE SODIO
(3,20)

Se prepara con las mismas instrucciones que el caldo MRS, solo que antes de repartir en los tubos, se disuelve NaCl en el volumen de caldo como se indica a continuación :

CONCENTRACION	NaCl	VOLUMEN
2%	2 g	100 ml
4%	4 g	100 ml
6.5%	6.5 g	100 ml

CALDO RM / VP (Vogues Proskauer)
(2)

INGREDIENTES	g/lit
Mezcla de peptona	7.0
Dextrosa	5.0
Fosfato de potasio	5.0
pH final 6.9 ± 0.1	

PREPARACION

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada y mezclar bien. Si es necesario caliéntese un poco hasta disolverlo, se distribuye y esteriliza entre 118°C y 121°C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

REACTIVOS Y COLORANTES

SOLUCION MADRE DE CARBOHIDRATOS
(3,20)

INGREDIENTES

Carbohidrato	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml

PREPARACION

Se disuelve perfectamente y se esteriliza a 118°C -
(10 libras de presión) durante 10 minutos.

SOLUCION SALINA AL 0.85%
(2,11)

INGREDIENTES

Cloruro de Sodio	0.85 g
Agua destilada	100.0 ml

PREPARACION

Mezclar bien y utilizar.

SOLUCION DE ALFA NAFTOL
(2,11)

INGREDIENTES

Alfa naftol	5.0 g
Alcohol etílico absoluto	100.0 ml

PREPARACION

Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón -
esmerilado.

SOLUCION DE HIDROXIDO DE POTASIO
(2,11)

INGREDIENTES

Hidróxido de potasio		40.0 g
Agua destilada	aforar	100.0 ml

PREPARACION

Mezclar bien y conservar un frasco ámbar con tapón -
esmerilado.

COLORANTE ROJO DE CLOROFENOL
(3,20)

INGREDIENTES

Rojo de clorofenol		0.2 g
Agua destilada		100.0 ml

PREPARACION

Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón -
esmerilado.

ALCOHOL - ACETONA (coloración de Gram)
(1)

INGREDIENTES

Alcohol atílico absoluto		250 ml
Acetona		250 ml

PREPARACION

Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón -
esmerilado.

SOLUCION DE SAFRANINA (coloración de Gram)
(1)

INGREDIENTES

Safranina O	2.5 g
Alcohol etílico absoluto	100.0 ml

PREPARACION

Diluir la safranina 1:5 o 1:10 con agua destilada. -
Guardar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

CRISTAL VIOLETA (coloración de Gram)
(1)

INGREDIENTES

a) Cristal violeta (sol. concentrada) :

Cristal violeta	20.0 g
Alcohol etílico absoluto	100.0 ml

b) Solución concentrada de oxalato:

Oxalato de amonio	1.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

PREPARACION

Diluir el cristal violeta 1:10 con agua destilada y
mezclar con 4 volúmenes de oxalato. Guardar en frasco ámbar con tapón -
esmerilado.

SOLUCION DE YODO (LUGOL) (coloración de Gram)
(1)

INGREDIENTES

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g

Disolver completamente en 5 ml de agua destilada y
agregar:

Agua destilada	240.0 ml
Bicarbonato de sodio al 5% en sol. acuosa	60.0 ml

PREPARACION

Mezclar bien y conservar en frasco ámbar con tapón -
esmerilado.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Academia de Profesores de Bacteriología Médica. (1983). Manual de -- Bacteriología Médica. 4a. ed. E.N.C.B. IPN. México.
2. Academia de Profesores de Microbiología Sanitaria. (1983). Manual -- de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. 1a. ed. E.N.C.B. IPN. -- México.
3. Aguilar, V.M. (1985) Preservación y caracterización de bacterias -- del género Streptococcus y Leuconostoc de interés en la industria -- láctea. Tesis Profesional. Depto. de Microbiología. E.N.C.B. IPN. México.
4. Alais, Ch. (1980) Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 1a. ed. Compañía Editorial Continental, S. A. México.
5. Babel, F.J. (1977) Antibiosis by lactic culture bacteria. Symposium: practical performance of lactic streptococci. J. Dairy Sci. 60 : 815 -821.
6. Bergere, J. L. (1984) Microbiology of cheese lactic fermentation. -- Simposio internacional de las fermentaciones lácticas en la indus- -- tria alimentaria. Organizado por la UAM-I del 27 al 29 de noviembre de 1984. Publicado en las memorias.
7. Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons. (1974) Bergey's manual of determinati ve bacteriology. 8a. ed. The Wilkins Co. Baltimore. U.S.A.
8. Chávez, G. B. (1987) Catabolismo y regulación de azúcares y citrato en bacterias lácticas del género Streptococcus. Tesis Predoctoral.- Depto. Microbiología. E.N.C.B. IPN. México.
9. Cowan, S. T. (1974) Manual for the identification of medical bacte- ria. 2a. ed. Cambridge University Press. Gran Bretaña.

10. Demeter, K.L. (1971) Elementos de microbiología lactológica. 6a. - ed. Acribia. Zaragoza, España.
11. Fernández, E. E. (1981) Microbiología Sanitaria. Agua y alimentos. Vol. I. EDUG/Universidad de Guadalajara. México.
12. Foster, E. M. (1965) Microbiología de la leche. 1a. ed. Herrero. - México.
13. Harper, W.J. (1985) Cultured dairy products. Food Tech. in New -- Zealand. Vol. 20. 10 : 29-33.
14. Jayne, D.J. (1975) Miniaturized methods for the characterization of bacterial isolates. J. appl. Bact. 38 : 305-309.
15. Jacobson, R. E. (1986) Review of current and future consumption - trends for milk and dairy products. Symposium : Impacts on the con- sumption of dairy products. J. of Dairy Science. Vol. 69. 5 : - 1447-1453.
16. Kosikowsky, F.V. (1978) Cheese and fermented milk foods. 2a. ed. - Edwards Brothers Inc. Michigan, U.S.A.
17. Mc Faddin, J. F. (1984) Pruebas bioquímicas para la identificación_ de bacterias de importancia clínica. 1a. ed. Editorial Médica Pana- mericana. México.
18. Manuales para educación agropecuaria. (1984) Elaboración de produc- tos lácteos. 2a. reimpresión. Trillas. México.
19. Mara, D.D. (1974) Bacteriology for sanitary engineers. 1a. ed. - Churchill Livingstone. Gran Bretaña.
20. Ocaña, E.J. (1984) Preservación y caracterización de bacterias -- del género Lactobacillus de interés en la industria láctea. Tesis_ Profesional. Depto. de Microbiología. E.N.C.B. IPN. México.

21. Oliver, G. (1984) Uso de fermentaciones lácticas regionales. Simposio internacional de las fermentaciones lácticas en la industria -- alimentaria. Organizado por la UAM-I del 27 al 29 de noviembre de 1984. Publicado en las memorias.
22. Pérez-Gavilán, E.J. y J. Pérez-Gavilán E. (1984) Bioquímica y microbiología de la leche. 1a. ed. Limusa. México.
23. Smith, W. & H. Emery. (1986) Public health concerns of yoghurt and other fermented milk products. Dairy and Food Sanitation. Vol. 6.-
1 : 10-11.
24. Stamer, J.R. (1976) The lactic acid bacteria : microbes of diversity. Food Technol. 33 : 60-65
25. Veisseyre, R. (1972) Lactología técnica. 1a. ed. Acribia. España.
26. Velázquez, R. (1984) Ecología de la fermentación láctica en alimentos amiláceos. Simposio internacional de las fermentaciones lácticas en la industria alimentaria. Organizado por la UAM-I del 27 al 29 de noviembre de 1984. Publicado en las memorias.
27. Warner, J. (1976) Principles of dairy processing. 1a. ed. John -
Wiley & Sons. India.