

2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y MICROBIANO DE LOS BÚLGAROS, MICROBIOGLEAS QUE SE EMPLEAN EN MÉXICO PARA FERMENTAR LECHE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

SAMUEL AGUILAR OGARRIO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA ESTHER LAPPE OLIVERAS

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D.F.

1997



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 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Estudio estructural y microbiano de los búlgaros, microbigeas empleadas en México para fermentar leche.

realizado por Samuel Aguilar Ogarrío

con número de cuenta 8229493-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario
Codirectora
Propietario

Dra. Patricia Esther Lappe Oliveras

Patricia Lappe O.

Dra. Marfa del Carmen Wachter Rodarte

Ma. del Carmen Wachter

Propietario

Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa

Miguel Ulloa Sosa

Suplente

M. en C. Rebeca Martínez Flores

Rebeca Martínez Flores

Suplente

Biól. María Cristina Julia Pérez Reyes

Cristina Pérez Reyes

Consejo Departamental de Biología

**COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA**

Esta tesis fue realizada de manera interinstitucional en el laboratorio de micología del Departamento de Botánica del Instituto de Biología y el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia Lappe Oliveras y Dra. Carmen Wachter Rodarte.

A mis padres:

por su apoyo, cariño y comprensión.

Gracias.

A mi abuelita Clemen, Víctor, Angélica, Ángel, Gabriel, Angie y Susy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las doctoras Patricia Lappe Oliveras y Carmen Wachter Rodarte, por su acertada dirección en esta tesis, y por su confianza, ayuda y amistad.

Al Dr. Miguel Ulloa, por su apoyo, estímulo, confianza y amistad que depositó en mí para la finalización de este trabajo.

Al jurado dictaminador, sus valiosas sugerencias en la revisión de la tesis:

Dra. Patricia Lappe Oliveras
Dra. Carmen Wachter Rodarte
Dr. Miguel Ulloa Sosa
M. en C. Rebeca Martínez Flores
Biol. Cristina Pérez Reyes

Al Dr. Héctor Hernández Macías, director del Instituto de Biología, UNAM, y Dr. Alfonso Delgado, jefe del Departamento de Botánica de esta institución, por brindarme la oportunidad y las facilidades para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Clara Esquivel, del Lab. de Citología, Fac. de Ciencias, por su asistencia en la preparación de las muestras para la observación con microscopía electrónica de barrido y electrónica de transmisión, y la obtención de fotografías con MET.

A la Biól. Yolanda Ornelas, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por su intervención en la observación y toma de fotografías con MEB.

A la M. en C. Elvira Aguirre, por su apoyo, amistad, asesoramiento y consejos.

A la Dra. Mary Carmen González, por su amistad.

A Felipe Villegas, Biól. Tere Flores, M. en C. Rocío Santillana, Biól. Alfredo Wong y Fís. Josué González por su ayuda y amistad.

A Biól. Pedro Mercado, por permitirme usar el cuarto oscuro para la impresión de las fotografías de la tesis.

A todos los que de una u otra forma colaboraron conmigo, para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Los búlgaros están formados por la asociación simbiótica de bacterias y levaduras embebidas en una matriz de polisacárido, y se utilizan en nuestro país como cultivo iniciador para fermentar leche a nivel doméstico.

En este trabajo se realizaron observaciones con estereomicroscopía, microscopía electrónica de barrido y electrónica de transmisión. Se determinó que los búlgaros tienen tres formas: laminar, enrollada y convoluta, y que los microorganismos que las constituyen presentan una disposición en estratos definida. La forma laminar presenta dos superficies: una lisa, colonizada por lactobacilos cortos, y otra rugosa, en la que predominan las levaduras; entre ambas, se encuentra una porción intermedia, donde existe una sustitución de bacilos cortos por levaduras. La forma convoluta presenta tres capas: la externa, con predominancia de lactobacilos cortos; la media, con lactobacilos largos rectos, lactobacilos largos curvos y algunas levaduras, y la interna, con lactobacilos cortos y abundantes levaduras embebidos en una matriz cavernosa.

En el análisis microbiológico se aislaron e identificaron cuatro especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*, *Torulaspota delbrueckii* y *Pichia membranaefaciens*; y 3 géneros de bacterias lácticas: *Lactobacillus* (homo y heterolácticos), *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

Por lo anterior, y de acuerdo con lo descrito por otros autores para los búlgaros y los granos de kefir, se puede decir que se trata de modalidades del mismo tipo de microbiogreas. Sin embargo, para poder afirmar que los búlgaros y los granos de kefir son iguales, es necesario conocer la composición química del polisacárido que constituye la matriz de los primeros, así como determinar los productos obtenidos durante la fermentación de la leche con su intervención.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Los alimentos fermentados	1
Clasificación	1
La leche y sus derivados	3
Clasificación de las leches fermentadas	5
Tipos de kefir	8
Elaboración del kefir	9
Importancia nutricional y sanitaria de las leches fermentadas	9
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODO	14
Procedencia de la muestra	14
Microscopía electrónica de barrido	14
Microscopía electrónica de transmisión	15
Aislamiento de la microbiota	17
Identificación de bacterias lácticas	18
Mantenimiento y preservación de los cultivos	19
Caracterización e identificación de las levaduras	20
Caracterización e identificación del moho	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	42
COMENTARIOS	42
LITERATURA CITADA	43
Apéndice 1	47

INTRODUCCIÓN

LOS ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos y bebidas fermentados tradicionales se elaboran por la transformación microbiana de diversos productos vegetales o animales.

Estos productos han sido de suma importancia en la historia del hombre. A pesar de que las fermentaciones han sido utilizadas por siglos en muchos países y de que su origen se pierde en los albores de las civilizaciones, no se sabe con precisión cuándo surgieron; se cree que aparecieron como resultado del crecimiento espontáneo de microorganismos bajo condiciones adecuadas para efectuar la fermentación, y así evitar la descomposición. El hombre acoge estos productos rápidamente, ya que debido al proceso fermentativo se aumenta su calidad nutricional, se mejora su digestibilidad y cualidades organolépticas, se incrementa el tiempo de conservación y se evita la transmisión de enfermedades por alimentos. Uno de los alimentos fermentados más antiguos (que data de hace 6000 o 7000 años) es el **chu**, originario de China, que consistía de granos enmohecidos que se utilizaban como inóculo para elaborar una bebida (Wang, 1986).

CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS FERMENTADOS

Se pueden clasificar siguiendo diversos criterios, como el tipo de sustrato, tipo de fermentación (que puede ser ácido láctica, ácido acética, alcohólica y/o mixta), tipo y predominancia de los microorganismos que intervienen, y del producto que se obtenga.

Los alimentos fermentados pueden clasificarse de acuerdo a el o los productos finales de la fermentación en cuatro categorías (Ulloa, 1993; Steinkraus, 1995):

I. Tempe de Indonesia y fermentaciones relacionadas; alimentos enriquecidos de proteínas vegetales, que se consumen como sustitutos de carne. Son fermentaciones de productos sólidos

como soya, pulpa de coco y pasta de cacahuate transformados por *Rhizopus* o *Neurospora*, para preparar respectivamente el tempe (tempeh) kedele, el tempe bongkrek y el oncom.

II. Alimentos fermentados que involucran una fermentación ácida, en la que el producto final es el ácido láctico, con la participación de distintas especies de *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Entre éstos se pueden mencionar el sauerkraut (col agria), el kimichi coreano (mezcla fermentada de verduras, pescado y mariscos en solución salina), el hum choy y las salmueras malayas; también dentro de esta categoría se encuentran los panes y tortas preparados con masa fermentada de cereales, como el idli (que se prepara con la mezcla de harinas de arroz y de una leguminosa que es fermentada por bacterias lácticas heterofermentativas), el dosa, dhokla o kahaman de la India, el enjera de Sri Lanka, el puto de Filipinas y el pan de masa agria tradicional del Reino Unido. También pertenecen a este grupo los atoles agrios de cereales, como el ogi nigeriano, el oji keniano, el mahewu sudafricano y el pozol mexicano, entre otros, así como diversos tipos de leches fermentadas y cereales, como el dahi de la India, el laban rayeb, y otros productos egipcios; el yogurt o laban zabad de Turquía, las leches fermentadas de Irak, Libia y Malasia, la leche búlgara de Bulgaria; el koumiss y el kefir que se consume ampliamente en la exURSS.

III. Alimentos en los que el etanol es un producto principal. Los sustratos que se fermentan son los azúcares contenidos en mieles, savias de diversas plantas y jugos o pulpas de frutas, o los azúcares obtenidos del desdoblamiento o malteado de almidones o polisacáridos contenidos en cereales. Al primer grupo pertenecen los vinos de miel, el pulque, la tuba, los vinos de coco, el tepache y el colonche, por nombrar algunos; y al segundo, la cerveza elaborada en forma tradicional (como tesgüino, merissa, bouza, chicha) o industrial.

IV. Salsas y pastas fermentadas con sabor a carne (aminoácido/peptídicas). Existe una diversidad de salsas y pastas fermentadas por hongos, levaduras y bacterias, que son en su mayoría tradicionales del Oriente; fue ahí donde se descubrió cómo producir sabores a carne a partir de proteínas y lípidos vegetales, como son el shoyu, el miso y el natto de Japón.

Alimentos fermentados en México

Hay que destacar que los métodos tradicionales de elaboración de estos alimentos son sencillos, baratos, y emplean materias primas disponibles de bajo precio. Owens (1993) resalta que es de suma importancia el estudio de los alimentos fermentados mexicanos, puesto que sus tecnologías tradicionales son un potencial para una explotación más amplia, y así extender el consumo de los productos a un bajo costo.

LA LECHE Y SUS DERIVADOS

La leche es un producto secretado exclusivamente por las hembras de los mamíferos y tiene la función de alimentar a las crías en la primera etapa de vida. La leche de vaca está constituida de: agua 90.5 %, grasa 3.5 %, proteínas 3.4 %, lactosa 4.9 % y minerales 0.9 %. Esta leche es la que utiliza el hombre preferentemente para su alimentación (Alais, 1981).

La leche puede ser consumida directamente o en alguno de sus derivados o subproductos, los que generalmente se clasifican en:

a) Sólidos, como los quesos y las mantequillas; dentro de éstos se consideran también a los semisólidos, como las cremas ácidas.

b) Líquidos, como el caso de las leches fermentadas (leches ácidas, yogurt y kefir, entre otras).

La leche es un alimento muy completo, que fácilmente se contamina y/o descompone;

su fermentación permite conservarla por más tiempo, además de aumentar su calidad nutritiva y organoléptica. Los productos lácteos fermentados se definen como productos lácteos modificados por la actividad enzimática o fermentos lácticos, que resultan del crecimiento y metabolismo microbiano en condiciones propicias. Su historia puede remontarse a la época en la que el hombre realizó la domesticación de animales para su beneficio; en Irán, Irak y Turquía se han encontrado restos de cerdos, borregos, cabras y perros, con una antigüedad de 7 500-6 750 años antes de Cristo. Se mencionan diversos productos lácteos fermentados en libros sagrados, como el Antiguo Testamento de la Biblia (s. X a. C.) y en los Vedas (s. IX a. C.) (Steinkrauss, 1995). Kosikowski (1977) propone que dichos productos tuvieron su origen en el Cercano Oriente antes de la era fenicia y que su elaboración se extendió posteriormente a Europa Central y Oriental.

Del total de la producción de los alimentos fermentados actuales, un 20 % corresponden a leches fermentadas, los que se producen a gran escala en Europa, Medio Oriente, Norteamérica, Noráfrica y Oceanía. En Europa la elaboración de los productos lácteos ha evolucionado a partir de recetas tradicionales hasta llegar a procedimientos sofisticados, que requieren del aislamiento y propagación de cultivos microbianos especializados llamados iniciadores. El valor económico de estas actividades es muy elevado, ya que en la década de los 80 representó el 27 % de un total de 431.7 millones de litros de leche. Esto nos da una vista panorámica del por qué es importante conocer, manejar y conservar los alimentos y bebidas tradicionales para el bien de la humanidad.

CLASIFICACIÓN DE LAS LECHE FERMENTADAS

Rueda Manzano (1980) divide a las leches fermentadas en leches fermentadas ácidas (tipo yogurt) y leches fermentadas ácido-alcohólicas (tipo kefir). Por otra parte, Marshall (1986 *apud* García-Garibay *et al.*, 1993) las clasifica tomando como criterio más importante el tipo y la predominancia de la microbiota, y que García-Garibay *et al.* (1993) modifica como se muestra en la tabla 1.

Todas las leches fermentadas se caracterizan por la presencia de ácido láctico. Las leches kefir y koumiss son transformadas adicionalmente por levaduras fermentadoras de lactosa, las que producen alcohol etílico y dióxido de carbono (Kosikowski, 1977).

El kefir y los búlgaros están clasificados en el grupo IV de la tabla 1; son productos que se obtienen empleando cultivos mixtos que se encuentran asociados en los granos utilizados como inóculo, y su fermentación es ácido-alcohólica. La diferencia del kefir y de los búlgaros con las otras leches fermentadas radica en que su microbiota no está dispersa en la leche, sino que está restringida casi en su mayoría en los granos. Los granos de kefir y los búlgaros son microbiogleas (del gr. *mikrós*, pequeño; *bíos*, vida, y *glótos*, glutinoso, viscoso, Ulloa, 1991) constituidas por bacterias y levaduras en simbiosis embebidas en una matriz de polisacárido. Puesto que en los granos de kefir la asepsia no se mantiene durante el proceso de elaboración, no se evita la incorporación de otros microorganismos; sin embargo, parte de la composición microbiana permanece específica y constante.

Con el nombre de búlgaros se conocen en México un tipo de microbiogleas que se emplean como cultivo iniciador para la obtención de leche fermentada ácida, que es elaborada a nivel doméstico y se consume como alimento cotidiano. Los búlgaros son conglomerados de

bacterias lácticas y levaduras en una asociación simbiótica y estable, embebidas en una matriz de polisacáridos. Son de diversos tamaños (de 5 mm a 2.5cm) y formas (laminares, enrolladas o cerebriformes), de consistencia elástica y de color blanco a blanco-amarillento (Ulloa y Lappe, 1993).

Tabla 1. Clasificación de las leches fermentadas según la microbiota predominante, características de la bebida y el nombre del producto que se obtiene (según García- Garibay *et al.*, 1993)

Grupo	Microbiota	Características	Productos
I	<i>Lactococcus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> spp. (mesófilos)	acidez baja o moderada	jocoque, butter-milk, leches escandinavas
II	<i>Lactobacillus</i> spp.	acidez moderada o alta	leche búlgara, leche acidófila, yakult
III	<i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp. (termófilos)	acidez moderada o alta	yogurt, dahi, labneh, bio-ghut, prosto-kvasha, brano, gioddu
IV	Bacterias lácticas y levaduras	acidez y alcohol	kefir, koumiss, "búlgaros"

Se desconoce cuál es el origen, la antigüedad y la manera en que se introdujeron los búlgaros en nuestro país, ya que por generaciones han sido transferidos de una persona a otra. Ulloa y Lappe (1993) mencionan que probablemente estén relacionados con los llamados granos de kefir, los cuales se originaron en la región del Cáucaso (Molska *et al.*, 1980), y que se utilizan en la ex URSS, Canadá y Estados Unidos para elaborar el kefir. Ésta es una bebida viva, espumosa, denominada kiaphu, képu, kehapu y champaña del Cáucaso. Su sinónimo es de bienestar; en su lugar de origen se prepara con leche de cabra. Según Rueda Manzano (1980), su origen es muy remoto y se dice que los tártaros recibieron el fermento, "el hijo del profeta", de Mahoma, quien a su vez lo recibió de Alá; este fermento fue transmitido de una generación a otra, guardando el secreto de su fabricación por miedo a que perdiera su eficacia si caía en manos de los infieles (Rueda Manzano, 1980).

Tipos de kefir

Existen dos tipos: la leche kefir y el kefir espumoso. La primera es el producto de la fermentación después de 24 h de haber sido inoculada, la cual tiene una consistencia líquida. Por otro lado, el kefir espumoso es el que se ha sometido a un proceso de maduración consistente en una segunda fermentación, que da lugar a una bebida efervescente con mayor cantidad de CO₂ y alcohol, y con una consistencia viscosa y aroma afrutado agradable (Steinkraus, 1995).

Según Kosikowski (1977), para la obtención de una leche fermentada se requiere: leche de buen sabor, baja en concentración de bacterias y pasteurizada; inóculo activo y adecuado, y un proceso y enfriamiento rápidos. Estas características son en esencia las mismas para el kefir y los búlgaros.

Elaboración del kefir

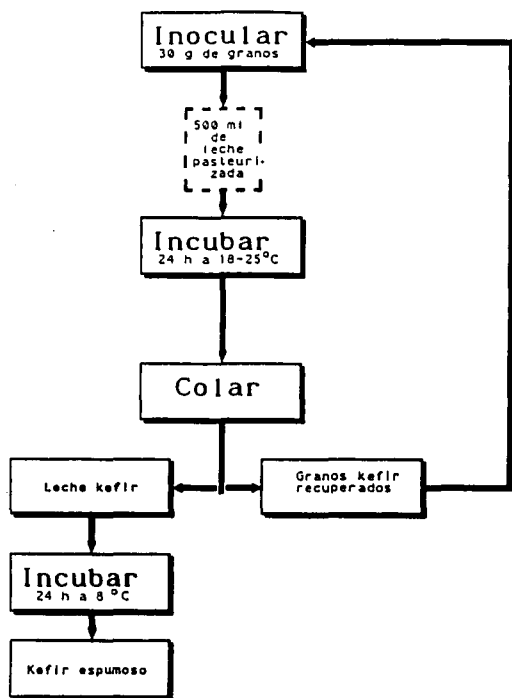
Para obtener la leche kefir se colocan de 25 a 30 g de granos kefir en 500 ml de leche de vaca fresca, pasteurizada (85 °C por 30 min) y fría, en una botella o un recipiente abierto de vidrio; la incubación se realiza a una temperatura de 18 a 25 °C durante 24 a 48 h. Es conveniente agitar 2 o 3 veces la botella con objeto de que la leche se corte y que en la superficie del líquido no se desarrollen hongos filamentosos (particularmente *Geotrichum candidum*); la botella se cubre con manta de cielo o con una tapa (Diagrama 1).

Posteriormente, el kefir se cuela para recuperar los granos y así utilizarlos para una nueva fermentación. Si se desea obtener kefir espumoso, el kefir colado mejora en sabor y efervescencia por medio de una segunda fermentación de 24 h, ya sea a temperatura ambiente o de preferencia en refrigeración (8°C), ya que a esta temperatura se puede guardar por lo menos una semana. El sabor, la viscosidad y la efervescencia dependen del tamaño del inóculo, de la temperatura, de la duración de la incubación y del tiempo de almacenamiento; la efervescencia se puede incrementar con una tapa a presión (Steinkrauss, 1995). La manera de elaborar la leche fermentada con los búlgaros es similar a la empleada en la preparación de la leche kefir.

Importancia nutricional y sanitaria de las leches fermentadas

Las personas con baja o nula actividad de lactasa (β -galactosidasa) presentan trastornos intestinales al ingerir la lactosa. Debido a que la hidrólisis no se efectúa, la lactosa pasa intacta al intestino grueso donde las bacterias ahí presentes la degradan generando gases y ácidos orgánicos, produciendo flatulencia, diarrea, dolores intestinales, etc. La cantidad de lactosa que puede ser ingerida, así como la severidad de los síntomas depende de cada individuo. A este tipo

Elaboración de kefir



Elaboración de los búlgaros

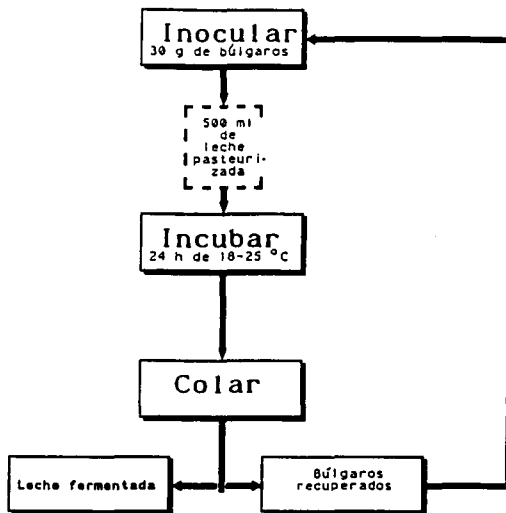


Diagrama 1. Proceso de elaboración de las leches fermentadas con granos kefir y con búlgaros (Rueda Manzano, 1980; Steinkraus, 1995).

de intolerancia se le denomina primaria y es irreversible. Cuando la intolerancia es debida a otras causas, como sucede con los bebés prematuros, las personas que acaban de sufrir un padecimiento gastrointestinal, o de desnutrición u otras afecciones que involucran las mucosas intestinales, se le denomina intolerancia secundaria, y por lo general es pasajera.

Los pediatras del mundo occidental recomiendan el consumo de leches fermentadas con la finalidad de restablecer la microbiota intestinal. Sugieren suministrar yogurt en la primeras etapas de vida y posteriormente el kefir.

La principal función de los microorganismos que constituyen los granos de kefir es realizar la hidrólisis de la lactosa y por tanto la producción de ácido láctico ; también lo es la producción de peróxidos, antibióticos y bactericidas, lo que permite a los granos de kefir retardar considerablemente el desarrollo de microorganismos patógenos (Earnshaw, 1993). Ésta es una evidencia de que el kefir puede restablecer la microbiota intestinal normal después de haber sido afectada por enfermedad o por tratamiento con antibióticos (Rehm, 1983 *apud* Angulo *et al.*, 1993). El efecto antibiótico de los granos se debe a los productos de la fermentación, que incluyen ácidos orgánicos, cambios en el potencial de oxidación y bacteriocinas, entre otros (Fernandes *et al.*, 1993).

Existen varios trabajos sobre los granos de kefir que abordan aspectos microbiológicos, químicos (de la composición de su matriz), morfológicos y ultraestructurales (La Rivière, 1963, 1967; Molska *et al.*, 1980; Bottazzi y Bianchi, 1980; Marshall *et al.*, 1984a,b; Angulo *et al.*, 1993).

Rueda Manzano (1980) realizó su trabajo de tesis profesional sobre la elaboración del kefir en México a diferentes niveles, desde el casero hasta la producción en planta piloto, con

objeto de dar a conocer un método de conservación de la leche al fermentarla utilizando como inóculo los granos de kefir traídos de la exURSS, con la intención de aplicarlo en medios rurales de nuestro país, en lugares donde se tengan excedentes de leche y se carezca de medios modernos de conservación, como la pasteurización, la refrigeración y la deshidratación; además, el consumo de este producto podría contribuir al mejoramiento del régimen alimenticio y nutritivo de los consumidores. Él afirma que al inicio de la década de los 80, en nuestro país se empezó a consumir leche fermentada de tipo yogurt, y que el kefir no se conocía; sin embargo, Ulloa y Lappe (1993) mencionan que los búlgaros se han venido cultivando y consumiendo desde principios de siglo.

Mucho tiempo antes de la realización de este estudio, en México se ha utilizado una tecnología tradicional de la fermentación de la leche, empleando los búlgaros como cultivo iniciador, que pueden recuperarse por filtración y usarse infinitamente, siempre y cuando se observen algunas medidas mínimas de higiene.

Como se puede apreciar la investigación sobre estas microbiogreas en nuestro país inició recientemente y han sido poco estudiadas, por lo que es necesario profundizar en los aspectos relacionados con su microbiología y su estructura. De esta manera será posible determinar que similitud existe entre el kefir y estas microbiogreas.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE LOS BÚLGAROS

1. Estudiar su morfología macroscópica con estereomicroscopía.
2. Estudiar su ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión.
3. Establecer la disposición de las bacterias y levaduras embebidas en estas

microbiogleas.

4. Identificar los microorganismos que las componen.

5. Comparar estos aspectos considerados para los búlgaros con los de los granos de kefir.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microbiota

Procedencia de la muestra de búlgaros.

Los búlgaros fueron donados por Carmen García, secretaria del Departamento de Botánica, quien tenía 3 años de mantenerlos en cultivos sucesivos para la elaboración de la leche fermentada; las microbiogreas se propagaron en el laboratorio de Micología, IBUNAM, siguiendo el procedimiento del diagrama 1, hasta obtener la biomasa necesaria para el estudio.

Microscopía electrónica de barrido

Los búlgaros se separaron de la leche por medio de una coladera y se enjuagaron varias veces con agua destilada. Una parte de la muestra se analizó a simple vista y con el microscopio estereoscópico; se detectaron tres tipos de formas: laminares, enrolladas y convolutas. De estos tres tipos se realizaron cortes de 1 mm de grosor, los que se fijaron en una solución de glutaraldehído al 4 % (p/v), con amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7) durante 4 h. Enseguida se efectuaron varios cambios de amortiguador cada uno de 30 min (Ulloa y Lappe, 1993).

Los cortes se volvieron a fijar, ahora en una solución 1 % (p/v) de tetraóxido de osmio, con el mismo amortiguador, en refrigeración durante 1 h. Posteriormente, los cortes fueron deshidratados en soluciones graduales de alcohol al 30, 50, y 70 %, durante 10 min en cada uno de ellos. Los cortes en alcohol al 70 % se mantuvieron en refrigeración por 24 h. El proceso de deshidratación se continuó con los alcoholes de 80 y 95 %, por un período de 15 min en cada uno. Después, se transfirieron a alcohol absoluto (1 h), a acetona (2 a 4 h) y por último se llevaron a punto crítico. Los cortes ya deshidratados se adherieron a la platina de aluminio de

los portamuestras y se recubrieron con oro. Dichas muestras se observaron y fotografiaron con un microscopio Jeol JSM-35, operado y acelerado a 20 Kv, según los parámetros y técnicas utilizados por Bottazi y Bianchi (1980) y Marshall *et al.* (1984b).

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras se rebanaron en fragmentos de 1 mm de grosor y se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3 % (p/v), con un amortiguador de cacodilatos 0.2 M durante 1.5 h, y se lavaron tres veces con amortiguador de cacodilatos.

Para la postfijación, los cortes se sumergieron por 1 h en una solución con 1 % (p/v) de tetraóxido de osmio y cacodilatos al 0.1 M, que además contenía 0.15 % (p/v) de rojo de rutenio. Posteriormente se lavaron con agua destilada y enseguida se continuó la deshidratación durante 10 min en soluciones graduales de etanol al 30, 50, y 70 %. En el alcohol al 70 % los cortes se taparon con parafilm y se refrigeraron 24 h. Después se continuó la deshidratación con los alcoholes al 85 y 95 % (15 min en cada uno), hasta llegar al alcohol etílico absoluto en el que se realizaron 3 cambios de éste (con una duración de 20 min en cada cambio); enseguida se sumergieron en una mezcla de la resina Epon y óxido de propileno (50:50), y nuevamente se refrigeraron por 48 h, para después incluir los cortes en la misma resina, aunque al 100 %. Con un microtomo Sorvall MT2-B, se hicieron cortes ultrafinos (90 nm), los que se contrastaron con citrato de plomo y se examinaron y fotografiaron con un microscopio de transmisión M10 Zeiss (Diagrama 2).

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

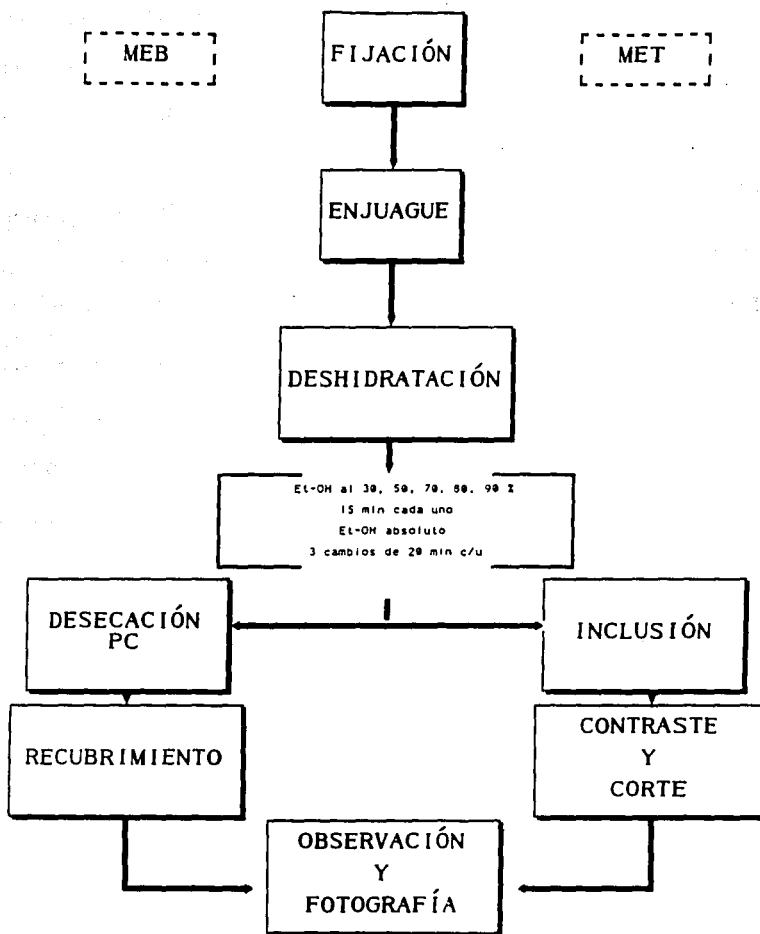


Diagrama 2. Resumen de las técnicas utilizadas en los dos tipo de microscopía electrónica utilizadas en este trabajo: Microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET) (Bottazzi y Bianchi, 1984; Marshall *et al.*, 1984b).

Al observar los cortes al microscopio electrónico se tuvo cuidado de que, en las preparaciones, las membranas intra y extracelulares fueran continuas y sin ningún accidente o rugosidad, y que no existieran espacios. También se procuró que el material biológico estuviera bien conservado, para lo cual se sometió a una fijación que evitara el colapso de la organización celular y molecular de la muestra, y así conservar indefinidamente su ultraestructura (González-Santander, 1969).

Aislamiento de la microbiota presente en los búlgaros.

Para aislar la microbiota, se molieron 10 g de muestra en 90 ml de una solución de agua peptonada al 0.1 % (Avilés *et al.*, 1983). Se hicieron diluciones en serie de la muestra hasta 10^9 ; de las diluciones $1:10^7$ a $1:10^9$ se sembraron alícuotas de 0.1 ml por triplicado en varios medios de cultivo selectivos: MRSA (Man-Rogosa-Sharpe Agar) para bacterias lácticas, M17A para estreptococos lácticos, medio de Garvie para *Leuconostoc* (Garvie, 1960 *apud* Harrigan y McCance, 1976), y RBDCA (rosa de bengala dicloran-cloranfenicol-agar) para levaduras y mohos. Las placas se incubaron a 30 y 37°C para las bacterias lácticas y a 27°C para las levaduras y los mohos.

Las bacterias lácticas se purificaron en los medios indicados anteriormente, las levaduras en medio de GELPA (glucosa extracto de levadura peptona agar) acidificado a pH 3.7 (Lachance *et al.*, 1988), y los mohos en PDA (papa dextrosa agar). Los cultivos puros de levaduras y el moho se mantuvieron en medios de cultivos inclinados: las levaduras en GELPA y el moho en PDA; las bacterias lácticas se mantuvieron en medio APT semisólido (caldo APT, Difco medio de crecimiento especial para *Lactobacillus viridescens*). Los cultivos axénicos se guardaron a 4°C para su posterior identificación.

Identificación de las bacterias lácticas.

Para la identificación de las bacterias lácticas se siguieron las metodologías propuestas por Nuraida (1988), Harrigan y McCance (1976), Sneath *et al.* (1984) y Mc Faddin (1990). Las pruebas realizadas fueron: tinción de Gram y prueba de catalasa (en estas pruebas se revisaron las características morfológicas y la pureza), producción de CO₂ a partir de glucosa, producción de amoníaco a partir de arginina, producción de dextrana a partir de sacarosa y lactosa, y crecimiento en 6.5 % de NaCl.

Preparación del inóculo. Cada una de las cepas problema puras se inocularon en APT y se incubaron durante 48 h a 30 °C.

Producción de CO₂ a partir de glucosa. La prueba fue usada para distinguir bacterias lácticas heterofermentativas. En el medio semisólido de Gibson, se adicionaron 100 ml de jugo de tomate, de acuerdo con Harrigan y McCance (1976). A este medio se le agregaron 0.5 ml del inóculo y se selló con 2 tapones del medio AA (agua agar, estéril y enfriado a 45°C) de 2 cm de profundidad cada uno, para producir anaerobiosis. Los cultivos se incubaron a 30°C por 5 días. Las bacterias heterofermentativas se manifestaron por la ruptura del sello de agar y la formación de burbujas de gas.

Producción de NH₃ a partir de arginina. Para la identificación del género *Lactobacillus*, se utilizó el caldo MRS-arginina preparado de acuerdo con Sharpe (1962, *apud* Harrigan y McCance, 1976).

Para la determinación del género *Lactococcus* se utilizó el caldo arginina (triptona 5 g, ext. lev. 2.5 g, D-glucosa 0.5 g, K₂HPO₄ 2.0 g, monoclóhidrato de arginina 3 g, H₂O 1000 ml). El pH se ajustó a 7.0. A este medio se añadió una asada del inóculo y se incubó a 30°C

durante 5 días. Posteriormente 2 ml del cultivo se pipetearon en un tubo de ensayo con la misma cantidad de reactivo de Nessler (Harrigan y McCance, 1976). El cambio de color anaranjado a café indicó la presencia de amoníaco.

Producción de polisacárido a partir de sacarosa y de lactosa. Placas de medio de Garvie (1960 *apud* Harrigan y Mc Cance, 1976) y de medio de Garvie modificado, sustituyendo la sacarosa por lactosa, se inocularon por estría con una asada del inóculo. Las placas se incubaron de 1 a 4 días a 30 °C. La producción de dextranas se detectó por el desarrollo de colonias mucoides en placas que contenían 5 % de sacarosa y de lactosa, utilizando como control el medio que contenía 0.1 % de sacarosa y de lactosa, respectivamente.

Crecimiento en 6.5 % de NaCl. A tubos con caldo APT con 6.5 % de NaCl se les agregó una asada del inóculo en estudio y se incubaron a 30 °C por 5 días, examinándose la turbidez diariamente.

Mantenimiento y conservación de los cultivos. Para las bacterias lácticas se utilizaron dos métodos: el de conservación a corto plazo (1-2 meses) en el medio de APT semisólido con trazas de carbonato de calcio a una temperatura de 5 °C, y el de almacenamiento a -76 °C (a largo plazo), utilizando los parámetros y métodos descritos por Feltham *et al.* (1977), y que se resumen a continuación. Los cultivos puros se inocularon en tubos de centrifuga con 20 ml de caldo APT y se incubaron a 30 °C de 2 a 4 días. Posteriormente se centrifugaron (a 5 000 rpm/10 min), se decantó el sobrenadante y el paquete celular se lavó agitando con agua destilada estéril (10 ml) repitiendo el proceso 2 veces más. El paquete de bacterias se resuspendió en agua destilada estéril y se pasó a los viales criogénicos de 2 ml de capacidad, que contenían entre 20 y 30 cuentas de vidrio, con 1.5 ml de caldo nutritivo y 15 % de glicerol (v/v), los cuales ya

se habían esterilizado previamente. Los concentrados de bacterias se agitaron, se retiró el medio con glicerol, se anotaron los datos respectivos y se guardaron en una ultracongeladora a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Caracterización e identificación de las levaduras

La identificación de las cepas de levaduras aisladas se hizo siguiendo los criterios y la metodología de van der Walt y Yarrow (1984) que se describen en el cuadro 1, y las claves taxónomicas de Kreger-van Rij (1984).

Conservación de levaduras. Se realizó empleando dos métodos, el de conservación en tubos inclinados de GELPA y el de conservación en una suspensión del cultivo en agua destilada; en ambos casos los tubos se guardaron a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para el estudio de las levaduras aisladas de los búlgaros (van der Walt y Yarrow, 1984)

I. Características morfológicas

A. Macromorfología o características culturales de los aislamientos

B. Micromorfología

1. Características de las células vegetativas

- a) Morfología en medio sólido
- b) Formación de pseudomicelio y de micelio verdadero

2. Características de la reproducción asexual o vegetativa

3. Características de la reproducción sexual

- a) Proceso de la formación de ascas y ascosporas
- b) Características de las ascas y ascosporas

II. Características fisiológicas y bioquímicas

1. Utilización de compuestos de carbono

- a) Fermentación de 6 carbohidratos
- b) Asimilación de 19 compuestos de carbono

2. Utilización de compuestos de nitrógeno

- a) Asimilación de KNO_3 ,
- b) Asimilación de $NaNO_2$,
- c) Asimilación de cadaverina
- d) Asimilación de hidrocloreuro de etilamina

3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento

- a) Crecimiento en medio libre de vitaminas

4. Resistencia al antibiótico cicloheximida

100 ppm y 1000 ppm

5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica

- a) Tolerancia a 50 % de glucosa
- b) Tolerancia a 10 % de $NaCl$ y 5 % de glucosa

6. Crecimiento a 37 °C

7. Reacción al colorante DBB

Caracterización e identificación del moho

El moho se identificó según los criterios de Domsch *et al.* (1980) y Carmichael (1957).

Conservación del moho. Se conservó en tubos inclinados en PDA a una temperatura de 4 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología y estructura. Al observar los búlgaros con un estereomicroscopio se distinguieron formas laminares, enrolladas y convolutas, lo cual concuerda con lo descrito por Ulloa y Lappe (1993) para los búlgaros y por Marshall *et al.* (1984b) para los granos de kefir.

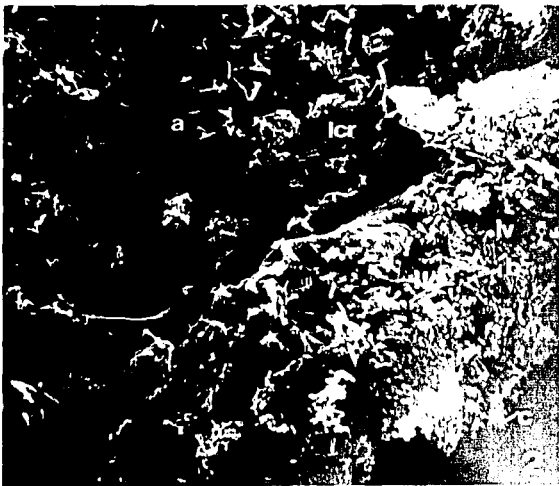
Con el MEB la estructura laminar presentó 3 capas: la externa o lisa (Figs. 1-3), compuesta principalmente por bacilos cortos rectos (lcr) (Figs. 3-5); la intermedia (Fig. 2), con bacilos largos algo curvos (llc), bacilos largos (bl) tanto individuales como en cadenas, y algunas levaduras (Fig. 6); y la interna o rugosa (Fig. 7) con abundantes levaduras entremezcladas con bacilos cortos y que presenta una matriz cavernosa y reticular. La forma convoluta (Fig. 8) presentó también tres estratos [externo (e), medio (m) e interno (i)], en los que se observaron diferentes microorganismos (Fig. 9): lactobacilos cortos y rectos (lrc) (Fig. 10) en el estrato externo; lactobacilos cortos, curvos y gruesos escasos (lccg), lactobacilos largos y curvos (llc) y algunas levaduras (lv) (Figs. 11-13) en el estrato medio; y predominancia de levaduras (lv) embebidas en la matriz cavernosa (mc) en el estrato interno (Figs. 14,15). En esta capa se observaron aglutinaciones (ag) de bacilos semejantes a las que Molska (1980) denominó "microcolonias" (Fig. 14). Ulloa y Lappe (1993) observaron la misma distribución de los microorganismos en las dos formas estudiadas, con la única diferencia de que en el estrato medio de la microbioglea convoluta encontraron abundantes lactobacilos cortos, curvos y gruesos. Fue evidente el remplazo paulatino de los diferentes microorganismos en cada una de las capas de los búlgaros laminares y convolutos, llegándose al predominio de un grupo microbiano en cada estrato.

Por medio de MEB Molska (1980) describió concentraciones de bacilos y levaduras, a

Imágenes de MEB

Figuras 1-7. Forma laminar

- 1. Corte de 1 mm de grosor de una microbioglea laminar visto por su cara lisa con el MEB.**
 - 2. Corte de una microbioglea laminar en la que se distingue la capa lisa (a) con lactobacilos cortos y rectos (Icr), la capa intermedia (b) con bacilos largos algo curvos (Ilc) y levaduras (lv), y la capa externa o rugosa (c) donde predominan las levaduras.**
- Las capas señaladas como a, b y c están amplificadas en las fotografías correspondientes (3-7)



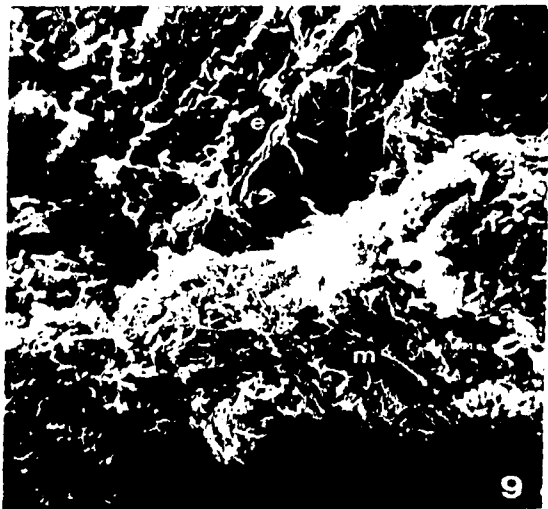
Figuras 8-11. Forma convoluta.

8. Fragmento de una microbioglea convoluta de 3 mm de diámetro.

9. Corte de 1 mm de grosor de una microbioglea convoluta, en la que se distinguen la porción externa (e) y la porción media (m), y cuyos detalles se muestran en las figs **10** y **11**.

10. Capa externa con lactobacilos cortos rectos (lcr).

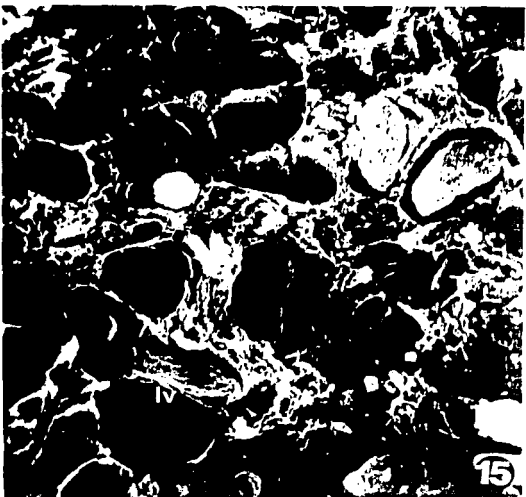
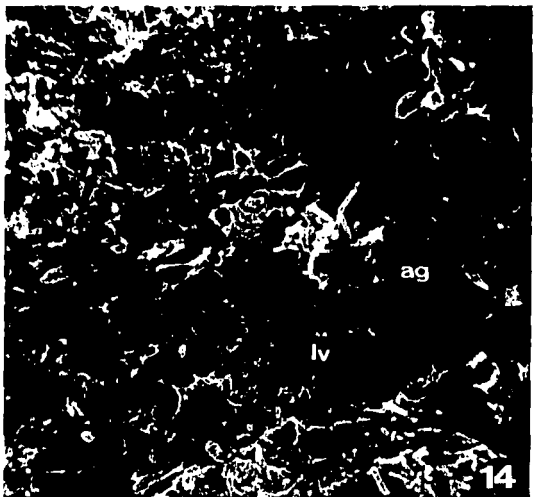
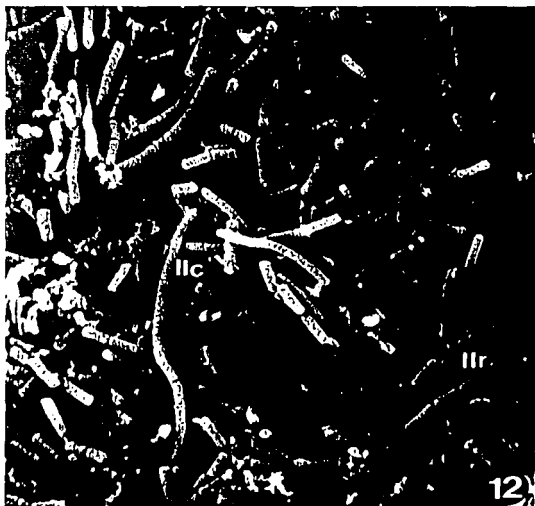
11. Capa media con lactobacilos largos rectos (llr), lactobacilos largos algo curvos (llc) y levaduras (lv).



Figuras 12-15. Detalles de los estratos medio (m) e interno (i) que constituyen la microbioglea convoluta de la siguiente manera: el primero con lactobacilos cortos (lcr), lactobacilos largos curvos y algunas levaduras; y el segundo con levaduras principalmente.

12 y 13. Porción media con lactobacilos largos rectos (llr) lactobacilos largos algo curvos (llc) lactobacilos cortos rectos (lcr) levaduras (lv) en la matriz cavernosa.

14 y 15. Porción interna con lactobacilos largos algo curvos (llc) en la matriz cavernosa y levaduras (lv).



las que consideró como microcolonias que daban origen a nuevos granos; con este tipo de microscopía se reveló que en una porción de los granos de kefir las bacterias eran dominantes y en la otra lo eran las levaduras. Los estudios realizados por Bottazzi y Bianchi (1980) con MEB en los granos de kefir destacaron que en la porción periférica predominaban bacilos cortos, y en la media observaron una sustitución progresiva de los bacilos por levaduras, hasta alcanzar el predominio de éstas, en la porción interna. La distribución espacial de los microorganismos en ninguna de las capas mostró un patrón definido. Marshall *et al.* (1984b) al estudiar un grano de kefir de estructura laminar con MEB encontraron que la parte lisa estaba densamente poblada de bacilos cortos, que la porción media presentaba una microbiota constituida en su mayoría por bacilos largos y curvos; mientras que la porción áspera se encontraba colonizada por lactobacilos largos curvos y levaduras. Estos mismos autores demostraron también la presencia de una matriz fibrilar en la que estaban embebidos los microorganismos, y que es esencial para la integridad y crecimiento de la microbioglea.

En este estudio, con MET se observó con más detalle la estructura y la disposición tanto de los microorganismos como del polisacárido que constituyen estas microbiogleas. En la periferia de un búlgaro laminar se detectaron levaduras (lv) asociadas con cocos (cc) y diplococos (dc) (Figs. 16-18); en la parte media se observaron lactobacilos largos (ll) embebidos en la matriz fibrilar (Figs. 19,20) la cual puede formar paquetes que ocupan los espacios entre las bacterias (Fig. 20), y en la parte interna se observaron algunas levaduras. Todo esto concuerda con lo descrito por Marshall *et al.* (1984b) quienes además mostraron que los lactobacilos largos de la capa media presentaban la pared típica de las bacterias gram positivas.

Los resultados que obtuvieron Marshall *et al.* (1984b) y Bottazzi y Bianchi (1980), con

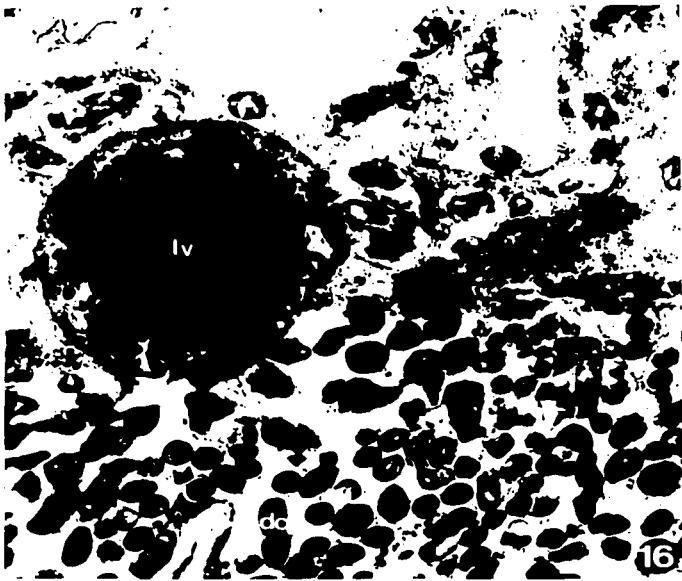
Imágenes de MET

Figuras 16-20. Cortes de una microbioglea.

16. Capa externa áspera (rugosa) de un búlgaro laminar, en al que se observamos una levadura, cocos aislados y diplococos.

17. Detalle amplificado de la figura 16.

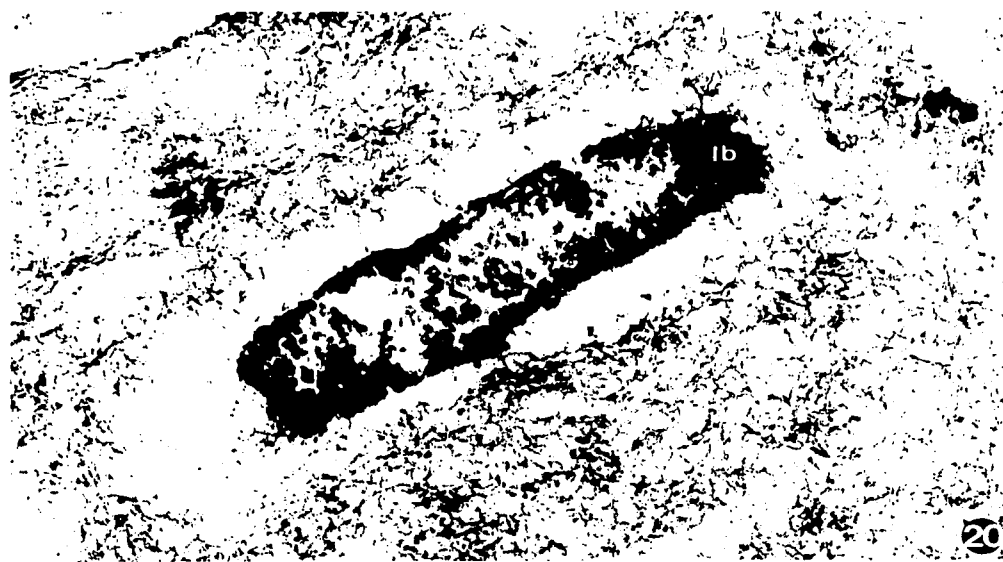
18. Corte de la porción central de una microbioglea convoluta, en la que se observa corte transversales de las células de levadura y lactobacilos embebidos en la matriz fibrilar.



Imágenes en MET

19. Corte longitudinal de la parte media de un búlgaro, en el que se observan lactobacilos largos curvos y una levadura.

20. Amplificación del corte longitudinal de un lactobacilo largo embebido en la matriz fibrilar.



respecto a la observación de la estructura y distribución de la microbiota de los granos de kefir utilizando el MEB y el MET, son semejantes a los obtenidos en este trabajo.

Microbiología. La tabla 2 indica los microorganismos aislados de los búlgaros en los medios de cultivo específicos empleados.

Tabla 2. Microorganismos aislados a partir de los búlgaros (ufc/g).

Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Microorganismos ufc/g
MRSA	30°C	bacterias lácticas 5.9×10^8
MRSA	37°C	bacterias lácticas 4.6×10^7
RBDCA	30°C	levaduras 1.4×10^7

Los 69 aislamientos de bacterias fueron identificados a nivel de género tentativo (ver Apéndice 1), siendo éstos: *Lactobacillus* (27 heterofermentativos y 26 homofermentativos), *Lactococcus* (9) y *Leuconostoc* (7). Ulloa y Lappe (1993) únicamente determinaron el género *Streptococcus*.

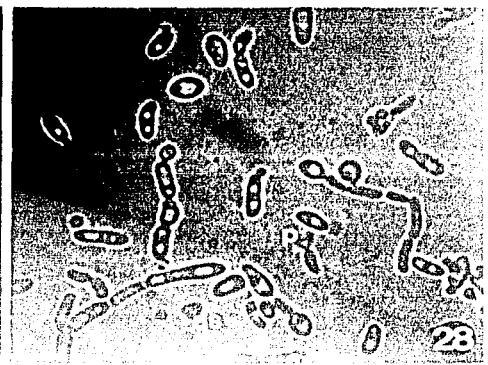
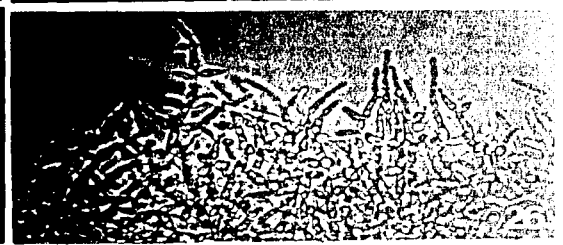
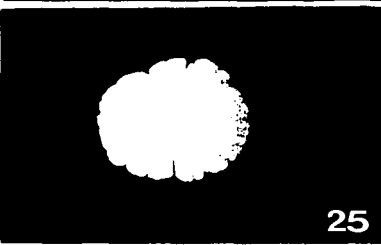
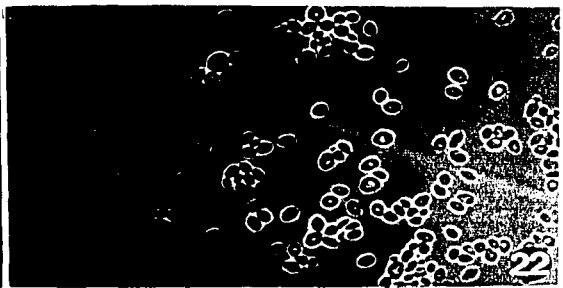
Con relación a las levaduras, se obtuvieron 9 aislamientos que correspondieron a *Saccharomyces cerevisiae* [5] (Figs. 21, 22), *Candida kefir* [2] (Figs. 23, 24), *Torulaspota delbrueckii* [1] (Figs. 25, 26) y *Pichia membranaefaciens* [1] (Figs. 27, 28). El único moho

Figs. 21 y 22. *Saccharomyces cerevisiae*. 21: Colonia gigante, de un mes de edad en GELPA. 22: Células vegetativas en GELPA.

Figs 23 y 24. *Candida kefir*. 23: Colonia gigante, de un mes de edad en GELPA. 24: Seudomicelio en placa de Dalmau, en harina de maíz agar (HMA).

Figs 25-26. *Torulaspota delbrueckii*. 25: Colonia gigante, de un mes de edad en GELPA. 26: Seudomicelio en placa de Dalmau, en HMA.

Figs 27 y 28. *Pichia membranaefasciens*. 27: Colonia gigante, de un mes de edad en GELPA. 28: Células vegetativas, aisladas y en cadenas cortas, ascas (as) con ascosporas hemicirculares y fragmentos de la pared (p) de un asca dehisciente, en GELPA.



aislado fue *Geotrichum candidum*. De estas especies, Ulloa y Lappe (1993) encontraron *S. cerevisiae*, *C. kefir* y *P. membranaefaciens*, además de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* y *Candida valida*.

Saccharomyces cerevisiae y *T. delbrueckii* se caracterizan por su incapacidad de fermentar lactosa, por lo que dependen de las bacterias lácticas y de *C. kefir* para hidrolizar este disacárido. Actualmente a *C. kefir* se le utiliza en la producción a gran escala de la lactasa (β -galactosidasa).

Entre los más revelantes estudios microbiológicos de kefir se encuentran los realizados por La Rivière *et al.* (1967), quienes proponen como microbiota predominante a *Saccharomyces delbrueckii* (actualmente sinónimo de *T. delbrueckii*), *Lactobacillus brevis* y *Geotrichum candidum*. Kosikowski (1977) encontró *Saccharomyces kefir* (sin. de *C. kefir*), *Torula kefir* (sin. de *C. kefir*), *Lactobacillus caucasicus* (sin. de *L. brevis*), *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *G. candidum*. Rueda Manzano reportó *Saccharomyces fragilis* (sin. de *C. kefir*), *Torula kefir* (sin. de *C. kefir*), *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *Leuconostoc citrovorum*, *L. dextranicum*, *Betabacterium* sp. y *Streptobacterium caucasicum*; *Bacterium casei* es sinónimo de *Lactobacillus helveticus*. Iwasawa (1982) reportó *Torulopsis holmii* (sin. de *C. holmii*), *L. brevis* y *L. buchneri*. Marshall *et al.* (1984a, b) aislaron *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *C. kefir*, *C. pseudotropicalis* y *Lactobacillus desidiosus* (actualmente considerado como *L. kefir*).

En 1993, Angulo *et al.* estudiaron 8 muestras de granos de kefir de la región de Galicia, que habían sido empleados durante 5 años para elaborar kefir. Identificaron 8 especies de levaduras: *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *S. unispórus*, *C. kefir*, *C. holmii*, *C. friedrichii* (sin. de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*) y *Pichia fermentans*. De estas especies solamente *T.*

delbrueckii, *S. cerevisiae* y *C. kefir* se encontraron en la muestra de búlgaros estudiada en el presente trabajo. En lo que a las bacterias se refiere, Angulo *et al.* determinaron 12 especies: *L. brevis*, *L. viridescens*, *L. kefir*, *L. fermentum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. casei* subsp. *tolerans*, *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc* spp. *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*, lo que concuerda con los géneros de bacterias encontrados en este trabajo, con excepción de *Septococcus*.

Steinkraus (1995) propone como microorganismos dominantes del kefir a *T. holmii* (sin. de *C. holmii*) y *S. delbrueckii* (sin. de *T. delbrueckii*), y considera a *L. kefir* como sinónimo de *L. brevis*. De las bacterias lácticas aisladas 4 produjeron polímero a partir de lactosa, que es el azúcar que se encuentra en la leche. El género tentativo de estos 4 es *Lactobacillus*. Esto indica que las bacterias de este género son las responsables de la síntesis de la matriz de los búlgaros. Esto constituye una similitud más de los búlgaros con el kefir, ya que La Rivière *et al.* (1967) reportó una especie de este género responsable de la producción de kefirana en los granos de kefir.

Por lo expuesto anteriormente se puede indicar que las especies predominantes para los granos de kefir son *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *C. kefir* y *L. brevis*, mientras que para los búlgaros, según lo reportado por Ulloa y Lappe (1993) y lo encontrado en la presente investigación, son *S. cerevisiae*, *C. kefir* y *P. membranaefaciens*; sin embargo, para poder aseverarlo es necesario estudiar un número mayor de muestras de búlgaros.

Al comparar las levaduras encontradas en los granos de kefir y en los búlgaros se puede decir que ambas comparten los mismos géneros pero sólo algunas especies. Esto posiblemente se debe a la procedencia de las muestras, así como a su manipulación y condiciones de cultivo.

CONCLUSIONES

1. Los estudios de estereomicroscopía revelaron 3 tipos de formas en los búlgaros: laminares, enrolladas y convolutas.
2. Con microscopía electrónica de barrido y electrónica de transmisión se logró establecer la disposición, estratificación y sustitución de los microorganismos presentes en las formas laminar y convoluta, lo que coincide con los estudios realizados por otros autores en los granos de kefir.
3. La microbiota de los búlgaros es muy similar a lo que se ha reportado para esos granos. Probablemente los granos de kefir y los búlgaros representan modalidades del mismo tipo de microbiogleas.

RECOMENDACIONES

Aunque es clara la semejanza estructural y microbiana de los búlgaros de México con los granos de kefir, aún queda por estudiarse la composición química de la matriz de los búlgaros, conocer la función que desempeña cada uno de los microorganismos en la fermentación de la leche y los productos de esta fermentación.

COMENTARIOS. Sería conveniente consumir y utilizar la leche fermentada por los búlgaros de igual manera como el yogurt; Berman y Katz (1983) proponen 100 formas de usarlos en su libro "El yogurt alimento milagroso".

En zonas rurales de nuestro país donde hay excedentes de leche y se carece de medios de conservación (pasteurización, refrigeración o deshidratación), esta tecnología de fermentación, sencilla y económica, se podría utilizar para conservar este producto perecedero; además, el consumo de la leche fermentada podría contribuir al mejoramiento del régimen alimenticio de los pobladores de estas regiones.

LITERATURA CITADA

- Alais, C. 1981. *Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera*, 2a. ed. Continental, México, D. F.
- Angulo, L., E. Lopéz y C. Lema. 1993. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *J. Dairy Res.* 60: 263-267.
- Avilés, R., A. Cortés, G. Eusebio, M. Flores, G. Lugo, L. Mota, J. Mora, M. Padierna y R. Rodríguez. 1983. *Manual de laboratorio de microbiología sanitaria*. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.
- Berman, C. y S. Katz. 1983. *El milagroso yogurt*, 6a. ed. Posada, México, D. F.
- Bottazzi, V. y F. Bianchi. 1980. A note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granules. *J. Appl. Bacteriol.* 48: 265-268.
- Carmichael, J. W. 1957. *Geotrichum candidum*. *Mycologia* 49: 820-830.
- Domsch, K., W. Gams y T-H. Anderson. 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. Academic Press, Londres.
- Earnshaw, R. G. 1993. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: Wood, B. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease*. Elsevier, Londres.
- Felthman, R., A. Power, P. Pell y P. Sneath. 1977. A simple method for storage of bacteria at -76 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 313-316.
- Fernandes, C. F., R. C. Chandan y K. M. Shahani. 1993. Fermented dairy products and health. In: Wood, R. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease*. Elsevier, Londres.
- García-Garibay, M., M. Revah S. y L. Gómez, 1993 . Productos lácteos. In García-Garibay,

- M., Ramírez, Q. y A. López-Munguía (Comp.), *Biotecnología alimentaria*. LIMUSA, México, D. F.
- González-Santander, R. 1969. *Técnicas de microscopía electrónica en biología*. Aguilar, Madrid.
- Harrigan, W.F. y M. E. McCance. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press, Londres.
- Hesseltine, C. W. y H. L. Wang (Eds.). 1986. *Indigenous Fermented Foods of Non-Western Origin. Mycologia Memoir No. 11*. J. Cramer, Berlín.
- Iwasawa, S., M. Ueda, N. Miyata, T. Hirota y K. Ahiko. 1982. Identification and fermentation character of kefir yeast. *Agr. Biol. Chem.* 46: 2631-2636.
- Kosikowski, F. V. 1977. *Cheese and fermented products*, 2a. ed. Edwards Brothers, Ann Arbor.
- Kreger van Rij, N. J. W. (Ed.). 1984. *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 3a. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Lachance, M. A., W. T. Starmer y H. J. Phaff. 1988. Identification of yeasts found decaying cactus tissue. *Can. J. Microbiol.* 34: 1025-1036.
- La Rivière, J. W. M. 1963. Studies on the kefir grain. *Proceedings of the Society for General Microbiology*.
- La Rivière, J. W. M. y P. Kooiman. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mikrobiol.* 59: 269-278.
- Mc Faddin, J. F. 1990. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Panamericana, México, D. F.
- Marshall, V.M., W.M. Cole y J. E. Farrow. 1984a. A note on the heterofermentative

- Lactobacillus* isolated from kefir grains. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 503-505.
- Marshall, V. M., W. M. Cole y B. E. Brooker. 1984b. Observations on the structure of the kefir grains and the distribution of the microflora. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 491-497.
- Molska, I., J. Kocon y S. Zmarlicki. 1980. Electron microscopic studies on structure and microflora of kefir grains. *Acta Alim. Polon.* 6: 145-154.
- Nuraida, L. 1988. Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. Tesis de Maestría en Ciencias en Microbiología de Alimentos, Universidad de Reading, Inglaterra.
- Owens, J. D. 1993. Indigenous fermented foods. Generalities and Perspectives. In: Wachter, M. C. y P. Lappe (Comp.), *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. PUAL, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Rueda Manzano, A. 1980. Elaboración de kefir en México. Tesis profesional, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Sneath, P. N., M. Mair, E. Sharpe y J. Holt (Eds.). 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. William & Wilkins, Baltimore.
- Steinkraus, K. H. (Ed.). 1995. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, 2a. ed. Marcel Dekker, Nueva York.
- Ulloa, M. 1991. *Diccionario ilustrado de micología*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Ulloa, M. 1993. Biotecnología de la fermentación en la alimentación tradicional. In Ferrera-Cerrato, R. y R. Quintero (Comp.), *Agroecología, sostenibilidad y educación*. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.

- Ulloa, M. y P. Lappe. 1993. Primer estudio microbiano, y estructural con microscopía electrónica de barrido, de los búlgaros, microbiogreas utilizadas en México para fermentar leche. *Micol. Neotrop. Apl.* 6: 109-126.
- Van der Walt y D. Yarrow. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification. In Kreger-van Rij, N. J. W. (Ed.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 3a. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Wang, L. H. y S. F. Fang. 1986. History of Chinese Fermented Foods. In Hesseltine, C. W. y H. L. Wang. (Eds.), *Indigenous Fermented Foods of Non-Western Origin. Mycologia Memoir* No. 11. J. Cramer, Berlín.
- Wood, B. J. B. y W. H. Holzappel (Eds.). 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Apéndice 1:

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GÉNEROS TENTATIVOS DE LAS BACTERIAS
LÁCTICAS AISLADAS DE BÚLGAROS (Harrigan y McCance, 1974; Wood y Holzapfel, 1995)

Lactobacillus

Bacilos cortos, crecimiento variable en NaCl 6.5 %

Homofermentativos:

Aislados en medio M17: 1,7,9,10,13,14,16,17,19,21,22,25,26.

Aislados en medio G: 5,10

Aislados en medio MRS: 3,5,7,8,9,12,15,18,20,21,24,

Heterofermentativos (producción de NH₃ positiva).

Aislados en medio M17: 3,4,5,6,8,12,23.

Aislados en medio G: 2,4,7,11,15.

Aislados en medio MRS: 1,2,4,6,10,11,13,14,16,17,19,22,23,25,26.

Lactococcus

Cocos homofermentativos, producción de NH₃ de arginina positiva o negativa,
crecimiento en 6.5 % NaCl negativa.

Aislados en medio M17: 2,11,15,18,20,24,3',3"

Aislados en medio G: 9

Leuconostoc

Cocos heterofermentativos, producción de NH₃ ge arginina negativa, producción
de dextrana a partir de sacarosa, crecimiento en 6.5 % NaCl variable

Aislados en medio G: 1,3,6,8,12,13,14

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas a cepas de bacterias lácticas aisladas de los búlgaros en agar M17 (17); medio Gravie (G) y agar MRS (RS).

Medio	Morf	Prod. de gas de glucosa	Prod. NH ₃ a partir de arginina	Prod. Polisac. a partir de sac.	Prod. Polisac. a partir de lac.	Crec 6.5% NaCl
17.1	bc	-	-	-	-	-
17.2	c	-	-	-	-	-
17.3	bc	+	+	-	-	+
17.4	bc	+	+	-	-	++
17.5	bc	+	+	-	-	++
17.6	bc	+	+	-	-	+
17.7	bc	-	-	-	-	++
17.8	bc	+	+	-	-	+
17.9	bc	-	-	-	-	++
17.10	bc	-	-	-	-	++
17.11	c	-	+	-	-	-
17.12	bc	+	+	-	+	++
17.13	bc	-	-	-	-	++
17.14	bc	-	-	-	-	++
17.15	c	-	-	-	-	-
17.16	bc	-	-	-	-	++

Continuación Tabla 3.

Medio	Morf	Prod. de gas de glucosa	Prod. NH ₃ a partir de arginina	Prod. Polisac. a partir de sac.	Prod. Polisac. a partir de lac.	Crec 6.5% NaCl
17.17	bc	-	-	-	-	++
17.18	c	-	+	-	-	-
17.19	bc	-	-	-	-	-
17.20	c	-	-	-	-	-
17.21	bc	-	-	-	-	++
17.22	bc	-	-	-	-	++
17.23	bc	+	+	-	-	++
17.24	c	-	-	-	-	-
17.25	bc	-	-	-	-	-
17.26	bc	-	-	-	-	-
17.3'	c	-	-	-	-	++
17.3"	c	-	-	-	-	++
G 1	c	+	-	++	-	++
G 2	bc	+	+	-	-	++
G 3	c	+	-	++	-	++
G 4	bc	+	+	-	-	++
G 5	bc	-	-	-	-	--
G 6	c	+	-	++	-	--

Continuación Tabla 3.

Medio	Morf	Prod. de gas de glucosa	Prod. NH ₃ a partir de arginina	Prod. Polisac. a partir de sac.	Prod. Polisac. a partir de lac.	Crec 6.5% NaCl
G 7	bc	+	+	-	-	--
G 8	c	+	-	--	-	--
G 9	c	-	+-	-	-	--
G 10	bc	-	-	-	-	-
G 11	bc	+	+	-	-	--
G 12	c	+	-	--	-	--
G 13	c	+	-	--	-	+
G 14	c	+	-	--	-	--
G 15	bc	+	+	-	-	-
RS.1	bc	+	+	-	--	-
RS.2	bc	+	+	-	--	-
RS.3	bc	-	-	-	-	--
RS.4	bc	+	+	-	-	-
RS.5	bc	-	-	-	-	--
RS.6	bc	+	+	-	-	--
RS.7	bc	-	-	-	-	--
RS.8	bc	-	-	-	-	--

Continuación Tabla 3.

Medio	Morf	Prod. de gas de glucosa	Prod. NH ₃ a partir de arginina	Prod. Polisac. a partir de sac.	Prod. Polisac. a partir de lac.	Crec 6.5% NaCl
RS.9	bc	-	-	-	-	-
RS.10	bc	+	+	-	-	++
RS.11	bc	+	+	-	++	++
RS.12	bc	-	-	-	-	++
RS.13	bc	+	+	-	-	++
RS.14	bc	+	+	-	-	++
RS.15	bc	-	-	-	-	-
RS.16	bc	+	+	-	-	++
RS.17	bc	+	+	-	-	+
RS.18	bc	-	-	-	-	+
RS.19	bc	+	+	-	-	++
RS.20	bc	-	-	-	-	-
RS.21	bc	-	-	-	-	-
RS.22	bc	+	+	-	-	++
RS.23	bc	+	+	-	-	++
RS.24	bc	-	-	-	-	++
RS.25	bc	+	+	-	-	++
RS.26	bc	+	+	-	-	+

bc = bacilo + = reacción positiva +- = reacción débil
c = coco - = reacción negativa

Tabla 4. Características fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras aisladas de los búlgaros (van der Walt y Yarrow, 1984),

1. Utilización de compuestos de carbono	Sc	Ck	Tb	Pm
a) Fermentación				
D-glucosa	+	+	+	-
Galactosa	+	+	d	-
Maltosa	-	-	-	-
α -metil-D-glucósido	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	-	-
Trehalosa	-	-	-	-
Melibiososa	-	-	-	-
Lactosa	-	+	-	-
Celobiososa	-	-	-	-
Melecitosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Inulina	-	+	-	-
b) Asimilación				
D-galactosa	+	+	-	-
L-sorbose	-	-	-	-
D-ribosa	-	-	-	-
D-xilosa	-	+	-	+
L-arabinosa	-	+	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-
L-ramnosa	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	-
Maltosa	-	-	-	-
Celobiososa	-	+	-	-
Salicina	-	+	-	-
Melibiososa	-	-	-	-
Lactosa	-	+	-	-
Rafinosa	-	+	-	-
Melecitosa	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-
Almidón soluble	-	-	-	-
Glicerol	-	+	-	-
Eritritol	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-
Galactitol	-	-	-	-
D-manitol	-	+	+	-
D-glucitol	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-
Ácido DL-láctico	-	+	-	-
Ácido succínico	d	+	+	d
Ácido cítrico	-	+	-	d
HCl-Dglucosamina	-	-	-	d
α -metil-D-glucósido	-	-	-	-
D-gluconato de K	-	-	-	-

Continuación tabla 4

	Sc	Ck	Tb	Pm
c) Desdoblamiento de arbutina		+		
2. Utilización de compuestos de nitrógeno				
a) Asimilación de KNO ₃	-	-	-	-
b) Asimilación de NaNO ₂	-	-	-	-
c) Asimilación de HCl de etilamina	-	-	-	-
3. a) Crecimiento en medio libre de vitaminas	-	-	-	+
4. Resistencia al antibiótico cicloheximida				
a) 0.01 %	-	-	-	-
5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica				
a) Tolerancia a 50 % de glucosa	-			
c) Tolerancia a 10 % NaCl y 5 % de glucosa				+
7. Crecimiento a 37 C	-	+	-	d
Reacción DBB		-		

Sc = *Saccharomyces cerevisiae*
 Ck = *Candida kefir*
 Tb = *Torulaspora delbrueckii*
 Pm = *Pichia membranaefaciens*

- = reacción negativa
 + = reacción positiva
 d = reacción débil