

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



METODOS DE CONSERVACION DE
BACTERIAS ACIDOLACTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA:

EMMA IDALIA GONZALEZ LEAL

MARIN, N. L.

ENERO DE 1997

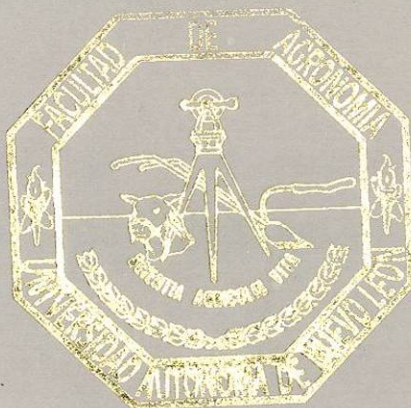
T
QR151
Q6
C.1



1080072042

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



METODOS DE CONSERVACION DE
BACTERIAS ACIDOLACTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA:

EMMA IDALIA GONZALEZ LEAL

RIRI IOTECA Agronomía II A M I

MARIN, N. L.

ENERO DE 1997

5323

12673

X
0251
56

040.637
FAI
97
C.5



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA**

DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**METODOS DE CONSERVACION DE
BACTERIAS ACIDOLACTICAS**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTA
EMMA IDALIA GONZALEZ LEAL**

COMISION REVISORA



Ph. D. Rigoberto González

ASESOR PRINCIPAL



Dr. Mario A. Ramírez

ASESOR AUXILIAR



Ing. Roberto Villarreal

ASESOR AUXILIAR

DEDICATORIAS

A mis padres:

Emma I. Leal de González

Horacio González González

Con mucho cariño por haberme apoyado siempre y darme la oportunidad de ser lo que soy ahora.

A mis hermanos:

Horacio

Oscar

Abundio

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por dejarme vivir en su mundo y por tantos sueños hechos
realidad

A mis asesores:

Ph. D. Rigoberto González

Ing. Roberto Villarreal

Dr. Mario A. Ramírez

Por su ayuda para la realización de este trabajo.

A la bióloga:

Juanita Aranda

Por su amistad y su ayuda incondicional

A mis compañeros y amigos:

Con los que conviví durante toda mi carrera y a quienes nunca
olvidaré

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	2
2.1. BACTERIAS ACIDOLACTICAS	2
2.2.1. Características de las Bacterias Acidolácticas	2
2.2.2. Importancia de las Bacterias Acidolácticas	3
2.2.3. Clasificación de las Bacterias Acidolácticas	4
2.2. GENEROS DE MAYOR IMPORTANCIA LACTOLOGICA	6
2.2.1. <i>Streptococcus</i>	6
2.2.1.1. <i>Sreptococcus cremoris</i>	7
2.2.1.2. <i>Streptococcus lactis</i>	8
2.2.2. <i>Lactobacillus</i>	13
2.2.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	14
2.2.2.2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	14
2.3. METODOS DE CONSERVACION	18
2.3.1. Conservación en Refrigeración	18
2.3.2. Conservación cubriendo los cultivos en Aceite Mineral	19
2.3.3. Conservación en Congelación	19
2.3.4. Conservación por Liofilización	20
2.3.5. Conservación por Deseccación de cultivos	21
III. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. MEDIOS DE CULTIVO	23
3.2. BACTERIAS ACIDOLACTICAS	24
3.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS	25

3.4. METODOS DE CONSERVACION	27
3.4.1. Conservación en Refrigeración	27
3.4.1.1. Medio Líquido	27
3.4.1.2. Medio Sólido	27
3.4.2. Conservación en Congelación	27
3.4.2.1. Medio Líquido	27
3.4.2.2. Medio Sólido	28
3.4.3. Conservación por Deseccación de cultivos	28
3.4.4. Conservación cubriendo los cultivos con Aceite	
Mineral	28
3.4.5. Conservación por Liofilización	28
3.5. REACTIVACION DE BACTERIAS	29
3.5.1. Reactivación de bacterias Congeladas, Refrigeradas	
y con Aceite Mineral	29
3.5.2. Reactivación de bacterias Deseccadas y Liofilizadas	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
4.1. PRUEBAS BIOQUIMICAS	30
4.2. INTERPRETACION DE RESULTADOS	30
4.2.1. Metodología	30
4.2.2. Comparación de siete métodos de conservación de	
bacterias	31
4.2.3. Comparación de cuatro bacterias acidolácticas durante	
<i>cuatro muestreos</i>	31
4.2.4. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro	
bacterias acidolácticas a las tres semanas	
de almacenamiento	34

4.2.5. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las seis semanas de almacenamiento	34
4.2.6. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las nueve semanas de almacenamiento	34
4.2.7. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las catorce semanas de almacenamiento	38
V. CONCLUSIONES	40
VI. OBSERVACIONES	41
VII. RESUMEN	42
VIII. BIBLIOGRAFIA	43
IX. ANEXO	46

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características más importantes de <i>S. cremoris</i> y <i>S. lactis</i> _____	8
Cuadro 2. Características más importantes de <i>L. bulgaricus</i> y <i>L. acidophilus</i> _____	15
Cuadro 3. Preparación de medios de cultivo para un litro de agua _____	24
Cuadro 4. Comportamiento general del crecimiento de <i>S. lactis</i> y <i>S. cremoris</i> bajo diferentes concentraciones de NaCl _____	25
Cuadro 5. Comportamiento general del crecimiento que deben mostrar <i>S. lactis</i> y <i>S. cremoris</i> bajo diferentes concentraciones de azul de metileno _____	26
Cuadro 6. Escala cualitativa para clasificar los resultados _____	30

INDICE DE FIGURAS

	Página
Gráfica 1. Comparación de siete métodos de conservación de bacterias -----	32
Gráfica 2. Comparación de cuatro bacterias acidolácticas durante cuatro muestreos -----	33
Gráfica 3. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las tres semanas de almacenamiento -----	35
Gráfica 4. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las seis semanas de almacenamiento -----	36
Gráfica 5. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las nueve semanas de almacenamiento -----	37
Gráfica 6. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las catorce semanas de almacenamiento -----	39
Diagrama 1. Distribución principal del género <i>Lactobacillus</i> -----	4
Diagrama 2. Distribución principal del género <i>Streptococcus</i> -----	5

INDICE DE ANEXO

	Página
Tabla 1. Medias de los métodos de conservación durante los cuatro muestreos -----	47
Tabla 2. Medias de las bacterias durante los cuatro muestreos -----	47
Tabla 3. Media de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 3 semanas de almacenamiento -----	48
Tabla 4. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 6 semanas de almacenamiento -----	48
Tabla 5. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 9 semanas de almacenamiento -----	48
Tabla 6. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 14 semanas de almacenamiento -----	49

I. INTRODUCCION

La necesidad de mantener gran número de cultivos durante largos períodos de tiempo, requiere del conocimiento de los mejores métodos para lograrlo. Es evidente que se necesita mucho tiempo para acumular datos sobre la eficacia de un método determinado para conservar la viabilidad de un cultivo. No todas las especies responden de igual modo, lo cual significa, sencillamente que lo que se consigue conocer respecto a un cultivo no puede aplicarse a los demás. El método de conservación y mantenimiento debe conservar todos los caracteres de la especie tal como son en el original. Además existen otras consideraciones de orden práctico, como son la cantidad de trabajo y atención que exigen, instalaciones de almacenamiento, y factores similares. Las bacterias que se usan de manera ocasional o con rareza, deben obtenerse cuando se requieren y no mantenerlas en el laboratorio. Las que son de uso constante pueden conservarse por períodos cortos mediante subcultivos seriados en refrigeración, por períodos largos por algunos de los procedimientos de desecación, congelación y cubriendo los cultivos con aceite mineral; pero si se quiere conservar indefinidamente se utiliza la liofilización.

La presente investigación persigue como fin determinar el mejor método para la conservación de bacterias acidolácticas (***Streptococcus lactis***, ***Streptococcus cremoris***, ***Lactobacillus bulgaricus***, ***Lactobacillus acidophilus***.) que son de gran importancia para la industria láctea.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. BACTERIAS ACIDOLACTICAS.

2.1.1. Características de las Bacterias Acidolácticas.

Las características más importantes comunes a todas son, que se trata de bacterias esféricas o alargadas, gram positivas, inmóviles, asporuladas, microaerofilas, anaerobias, fermentan distintos azúcares produciendo ácido láctico, no desprenden oxígeno del peróxido de hidrogeno por no poseer catalasa y reaccionan negativamente a la prueba de reducción de los nitratos. Por lo contrario, responden rápida e intensamente a las pruebas de azul de metileno y de la resazurina. Existen dos grupos cuya diferencia principal entre ambas estriba en que las *Streptococcaceae* son bacterias de forma redondeada, que se presentan aisladas o unidas en cadenas más o menos largas, mientras que las *Lactobacillaceae* poseen forma de bastoncito, también aisladas o en cadenas. (Demeter, 1971 y Alais, 1970).

Habitualmente, estos organismos se dividen en dos grupos: los que producen primordialmente ácido láctico, partiendo de hidratos de carbono fermentables y que se conocen con el nombre de grupo de los homofermentativos; en el grupo de los heterofermentativos figuran los organismos que, además de ácido láctico producen ácido acético, etanol, glicerol, anhídrido carbónico (bióxido de carbono) y otras sustancias. Estas bacterias se hallan esparcidas en la naturaleza. Se ha encontrado que las albergan ciertas plantas, algunos alimentos, los utensilios lecheros, el estiércol y la saliva.(Foster, 1957).

2.1.2. Importancia de las Bacterias Acidolácticas.

Las lactobacterias son de gran importancia en la microbiología aplicada. Son esenciales para la producción de ácido láctico, col agria, encurtidos y ensilaje. En la industria lechera son indispensables para la producción de yogurth, quesos y mantequilla conteniendo cultivos. La acidificación impide o retrasa la proliferación de organismos proteolíticos y esta reacción puede considerarse como una forma de conservación del alimento. (Foster, 1957).

Las bacterias lácticas no son sólo indispensables para la fabricación de productos lácteos, juegan también un importante papel en la producción de otros alimentos, estimulantes y forrajes. Aquí se utilizan generalmente diversas especies de lactobacterias bacilares, mientras en la industria de la leche se sirve, junto a estas, predominantemente, de especies de forma esférica.

Finalmente, debe mencionarse que el ácido láctico puro se utiliza hoy ampliamente como sustancia auxiliar. Así en curtiduría, en la industria textil, en la industria de materiales sintéticos. En la industria de la alimentación se emplea en cantidades considerables sustituyendo a los ácidos de frutos para la fabricación de limonadas, zumos y jarabes de frutas. Además se utiliza para fines terapéuticos en Medicina y como aditivo en cosméticos. (Demeter, 1971).

2.1.3. Clasificación de las Bacterias Acidolácticas.

En los diagramas 1 y 2 se muestra la clasificación de las Bacterias Acidolácticas (Bottazzi, 1984).

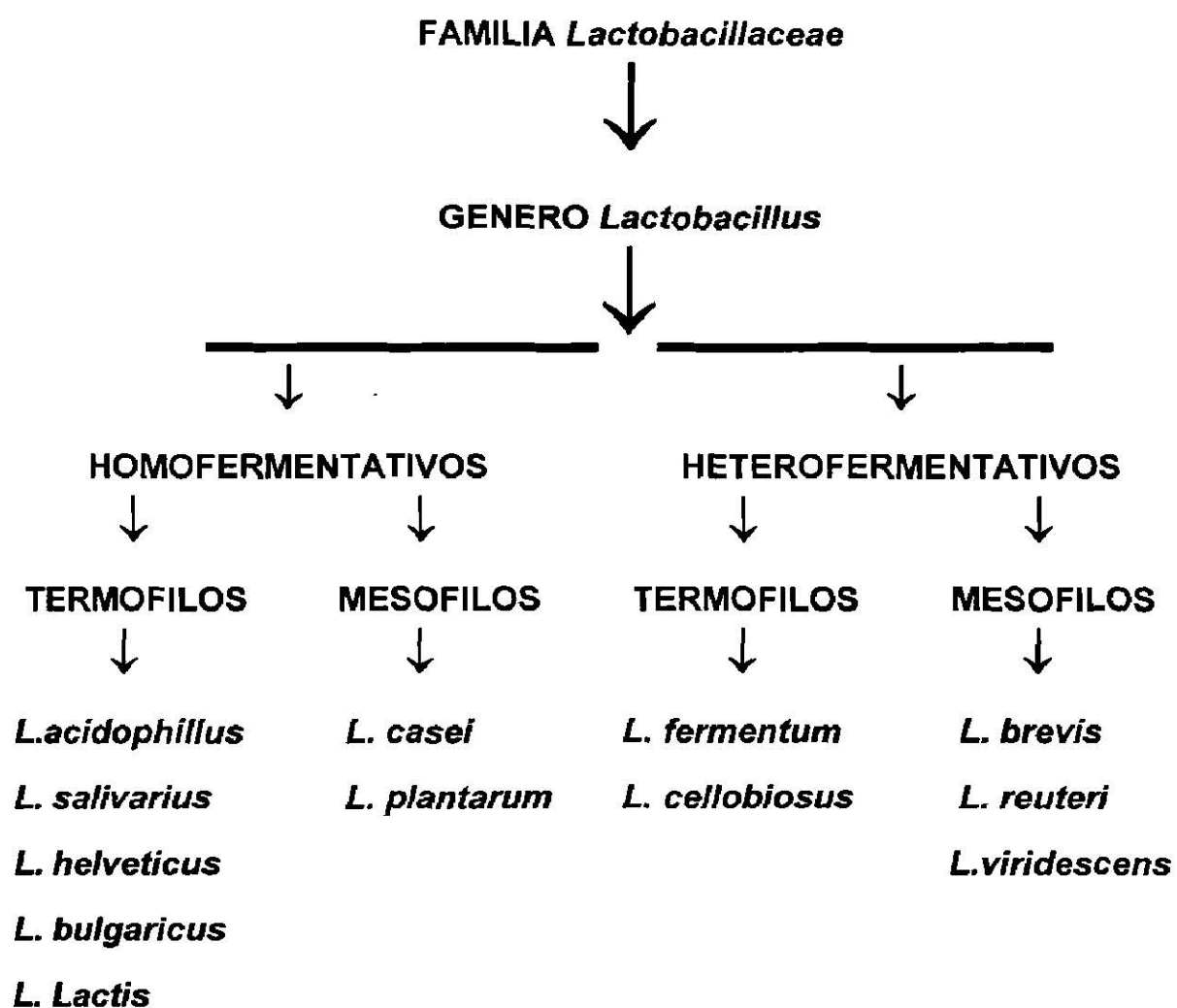


Diagrama 1. Distribución principal del género *Lactobacillus*.

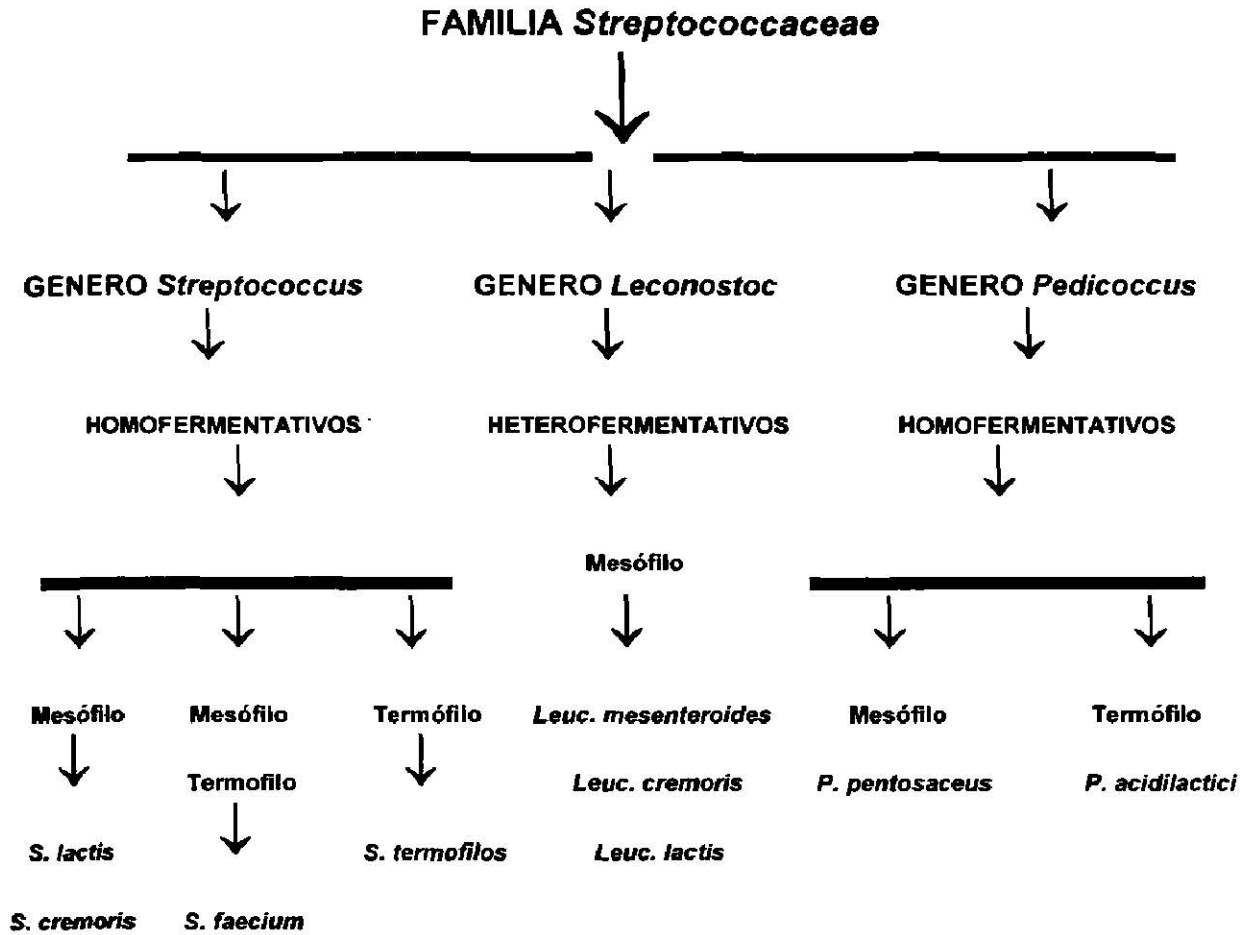


Diagrama.2.-Distribución principal del género Streptococcus.

2.2. GENEROS DE MAYOR IMPORTANCIA LACTOLOGICA

Los géneros de mayor importancia lactológica, dentro de ambas subfamilias, son: *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Una propiedad trascendental para fines tecnológicos de las distintas especies de estos géneros es el distinto mecanismo de la fermentación de azúcares: mientras unas, las denominadas especies " homofermentativas", producen más del 90% de ácido láctico a partir del azúcar fermentado (además originan un pequeño porcentaje sólo de CO₂, ácido acético y alcohol), las otras, denominadas especies " heterofermentativas ", fermentan los azúcares produciendo menos del 90% (por lo menos el 50%) de ácido láctico; además forman ácido acético, alcohol y CO₂ en mayores cantidades. La pureza del sabor puede estar más o menos negativamente influenciada por estos productos secundarios.

Las especies del género *Streptococcus* son todas homofermentativas, las del género *Leuconostoc* todas heterofermentativas, mientras que en el género *Lactobacillus* existen especies homo y heterofermentativas (Demeter, 1971).

2.2.1. *Streptococcus*.

Estas especies constituyen habitualmente la flora dominante de la leche, de la crema y de los quesos frescos. Puede decirse que no existe leche cruda sin *Streptococcus*. Apesar de su nombre, los *Streptococcus* adoptan frecuentemente la forma de diplococos; pocas especies dan cadenas largas. Es necesario hacer constar que algunos *Streptococcus* producen, en medio gelosado, células que adoptan una forma ligeramente alargada, que puede prestarse a confusión.

Respecto a los *Latobacillus*, y aparte sus caracteres morfológicos, los *Streptococcus* se distinguen por una acidificación moderada de la leche (de 0.5 a 1% de ácido láctico para las especies homofermentativas), aunque la producción de ácido se inicia a mayor velocidad. El pH alcanza justamente el punto isoeléctrico de la caseína (4.6). La actividad proteolítica de los *Streptococcus* es en general débil, su equipo enzimático no contiene proteínas ni peptidasas activas, en la mayor parte de las especies.

Dentro del género *Streptococcus* se encuentra el grupo de los *Streptococcus lácticos* (*S. lactis* y *S. cremoris*) que son bacterias lácticas mesófilas, homofermentativas, pertenecientes al grupo serológico N. Estos *Streptococcus* son los agentes habituales de la coagulación de la leche abandonada a la temperatura ambiente; constituyen los fermentos lácticos cultivados entre 20°C y 30°C, zona de óptimo crecimiento. Se desarrollan aún a 10°C, a veces a menos, pero no a 45°C; son fácilmente destruidos por calentamiento moderado, como el de la pasteurización baja (63°C-30 minutos); son sensibles a la sal, al 6.5%, y no poseen carácter patógeno.

2.2.1.1. *Streptococcus cremoris*.

Este *Streptococcus* es más lábil y difícil de cultivar que las otras especies de este género; depende estrechamente de la leche, ya que no puede utilizar otros glúcidos más que la lactosa y sus dos componentes. Es muy sensible a diversos agentes químicos, como la sal; no se desarrolla o lo hace muy mal a 37°C, no obstante, algunas cepas pueden desarrollarse a temperaturas muy bajas, hasta 3°C. Parece que no posee proteínasa y no desamina la arginina. Su

morfología es bastante característica; suele presentarse en la leche, bajo la forma de largas cadenas (Alais, 1970).

2.2.1.2. *Streptococcus lactis*

Existe originalmente en materias vegetales, pero hoy ha llegado a ser el más típico "habitante" de la leche y de todos los aparatos en contacto con ella no desinfectados correctamente. Aunque muere por pasteurización corta y alta, puede existir por esa razón frecuentemente también en leche pasteurizada como germen re infectante. Es el causante principal de la disminución de la estabilidad de la leche debida a temperaturas superiores a 10°C. (Demeter, 1971)

Cuadro 1.- Características más importantes de *S. cremoris* y *S. lactis*

	<i>S. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>
Taxonomía		
Orden	<i>Eubacteriales</i>	<i>Eubacteriales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillaceae</i>
Tribu	<i>Streptococceae</i>	<i>Streptococceae</i>
Género	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Especie	<i>cremoris</i>	<i>lactis</i>
Grupo	Grupo láctico del género <i>Streptococcus</i>	Grupo láctico del género <i>Streptococcus</i>
Familia sinónima	<i>Lactobacteriaceae</i>	<i>Lactobacteriaceae</i>

Características celulares

Morfología	Esféricas	Esféricas, muchas células alargadas
Tinción	Gram positiva	Gram positiva
Encontradas	En largas cadenas, a veces en pares	En pares y cortas cadenas
Tamaño	0.6 a 1.0 μ de diámetro	0.5 a 1 μ
Hábitat	Leche cruda y productos lácteos	Leche y productos lácteos

Características del cultivo

Colonias en agar nutritivo.	No crece sobre medio artificial.	Pequeña, redonda, gris y firme.
Gelatina stab.		Filiforme, contadas en el cultivo.
Caldo de glucosa.		Turbia.

Serología

Antígenos agrupados	Contiene grupos, antígeno del grupo N de <i>S. lactis</i>	Unas especies específicas del suero pueden estar produciendo el llamado grupo N
Tipificado	Muchos tipos serológicos	

Utilización Industrial

Productos		Producción de D—ácido láctico
Procesos	Usado en comercio por ser un productor de ácido	Usado como iniciador para el sauerkraut. Importante en el madurado y curado del queso Cheddar.

Características bioquímicas

Producción de antibióticos	Produce un antibiótico el cual es diferente de Nisin producido por <i>S. lactis</i>	
Productos químicos finales	Si fermenta azúcar esta presente, utiliza ácido cítrico produciendo ácido acético, diacetil y bióxido de carbono	
Producción de enzimas		Proteínasa producida sobre el sustrato de α —caseína, pH óptimo 6.5

Características fisiológicas

Acción Bioquímica		
Hidrólisis del almidón	Negativa	Negativa
Hemolisis	Alfa (ligero) hasta Gama (no) hemolisis	Negativa, puede mostrar un poco verde ligero
Amoniaco	No formado para 4% de Peptona o Arginina	Formado de 4% de Peptona
Tirosine		No descarboxilada

<p>Licuefacción o digestión de la proteína</p> <p>Gelatina</p> <p>Sangre</p>	<p>No hay licuefacción</p> <p>No hay hemolisis sobre la placa de sangre</p>	<p>No hay licuefacción</p>
<p>Reacciones indicadoras</p> <p>Leche litmus</p>	<p>Acido, reducción completa antes de coagulado; línea roja sobre el extremo; separación de la leche cuajada al hacerse viscosa; no hay digestión de caseína</p>	<p>Reducción completa antes de coagulada, ácido, los cultivos jóvenes reducen el indicador con la tira roja sobre el extremo; no hay digestión o gas</p>

Factores de crecimiento

<p>Oxígeno</p> <p>Temperatura</p> <p>Optima</p> <p>Mínima</p> <p>Máxima</p> <p>Tiempo de muerte térmica</p> <p>pH</p> <p>Tolerancia</p> <p>Azul de metileno</p> <p>Penicilina</p> <p>Cloruro de sodio</p> <p>Bilis</p>	<p>Anaerobios facultativos</p> <p>30°C</p> <p>10°</p> <p>37°C</p> <p>65°C a 70°C; pueden sobrevivir a 60°C por 30 minutos</p> <p>pH final en caldo de glucosa 4.6 a 4.0; inhibido a 9.2 y 9.6</p> <p>Tolera 0.01% y puede tolerar 0.1%; rara vez puede tolerar 0.3%</p> <p>Sensible</p> <p>No crece en caldos conteniendo 4%, no inhibido con 2%</p> <p>Crece en agar sangre con 4.0% de bilis</p>	<p>Anaerobios facultativos</p> <p>Crece a 10°C; 40°C</p> <p>No crece a 45°C; Algunas clases pueden sobrevivir a 60°C por 30 minutos</p> <p>Crece a pH 9.2; excepto a 9.6</p> <p>Tolera hasta 0.3%</p> <p>Crece a 2% y 4% de solución salina; puede no crecer a 6.5%</p> <p>No inhiben el crecimiento; no tiene acción el litio</p>
---	--	--

Fermentación de reacciones		
◆ Monosacáridos		
Arabinosa	No fermentada	
Xilosa	No fermentada	Variable
Glucosa	Acido	Acido
◆ Disacáridos		
Lactosa	Acido	Acido
Sucrosa	Rara vez fermentada	
Maltosa	Puede ser fermentada	Acido
Trialosa	Variable	
◆ Polisacáridos		
Rafinosa	Rara vez fermentada	No ácido; algunas clases variables
Inulina	No fermentada	No ácido
◆ Alcoholes y polialcoholes		
Glicerol	No fermentado	No ácido
Manitol	Rara vez fermentado	No ácido
Sorbitol	No fermentado	No ácido
◆ Glucósidos		
Esculin	No hidrolizado	
Salicin	Variable	

2.2.2. *Lactobacillus*

Las diferencias más importantes para la tecnología lactológica entre este género y los *Streptococcus* esta en su mayor poder acidificante y en su capacidad proteolítica más intensa. Mientras que las concentraciones absolutas de ácido láctico formado por las especies de *Streptococcus* en la leche alcanza siempre menos del 1% y el valor del pH no es inferior a 4.3-4.5, las especies del género *Lactobacillus* acidifican la leche hasta un pH de 3.2-3.5 y un contenido en ácido láctico del 1 hasta más del 3%. (Demeter, 1971)

Los *Lactobacillus* están muy difundidos. En la leche cruda son mucho menos abundantes que los *Streptococcus*; por el contrario dominan en diversos tipos de quesos, especialmente en los que se fabrican a temperaturas relativamente altas (superiores a 40°C), tras un cierto tiempo. Los *Lactobacillus* tienen un papel importante en la preparación de diversas leches fermentadas (yoghurth, leche acidófila, etc.) en las fermentaciones de productos vegetales; ensilado, "choucroute", escabeches; en la fermentación maloláctica de los vinos, y en las salazones. Se encuentran presentes en la saliva, en las caries dentarias, en el intestino del hombre y de los animales, etc. (Alais, 1970)

El género *Lactobacillus* se divide en dos grupos: los homofermentativos y los heterofermentativos. El grupo de los homofermentativos (*L. acidophilus* y *L. bulgaricus*) es aquel que se observa cuando es metabolizada la glucosa, pero no necesariamente cuando se metabolizan las pentosas, ya que algunos homolácticos producen ácidos acético y láctico cuando se utilizan pentosas. Así mismo, el carácter homofermentativo de los homolácticos pueden modificarse en algunas cepas alterando las condiciones culturales tales como la concentración de

glucosa, pH y limitación de nutrientes. Los homolácticos obtienen el doble de energía de una determinada cantidad de glucosa que los heterolácticos (Jay, 1978)

2.2.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Esta ampliamente distribuido y se encuentra en la leche y productos lácteos y es un comensal del tracto digestivo de los animales. Se utiliza para hacer la "leche acidificada" y se supone esta relacionado con la caries dental del hombre. Existe con relativa frecuencia en el intestino de niños y adultos, sobretodo con una alimentación, en la que predominen la leche, azúcar de leche y dextrina. Por eso muchos científicos admiten, que este microorganismo sea un componente necesario de la flora intestinal normal del hombre (no demostrado hasta el presente). Esto conducirá a la fabricación de diversos productos lácteos, que contendrían este germen, a los que se atribuye un efecto curativo en trastornos intestinales patológicos, hecho éste tampoco comprobado de una manera general. (Demeter, 1971)

2.2.2.2. *Lactobacillus bulgaricus*

Existe en la leche cruda, también en algunos quesos duros; junto con *Streptococcus termophilus*, sirve para la fabricación de yogurth típico, así como de otras formas de leche agria, especialmente de las de los países templados; igualmente se utiliza para la acidificación de setas.(Demeter, 1971)

El *Lactobacillus bulgaricus* no forma más que un grupo serológico (E) y produce el tipo de ácido láctico (D). Sin embargo se distingue por sus limitadas aptitudes para fermentar los azúcares; no puede utilizar más que la lactosa y sus componentes. (Alais, 1970)

Cuadro 2.- Características más importantes de *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*

	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
Taxonomía		
Orden	<i>Eubacteriales</i>	<i>Eubacteriales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillaceae</i>
Tribu	<i>Lactobacilleae</i>	<i>Lactobacilleae</i>
Género	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>acidophilus</i>	<i>bulgaricus</i>
Tipo	X o R, el cual produce colonias ásperas; e Y o S, el cual produce colonias lisas; la clase R puede dividirse hasta formar S pero la regresión es difícil	
Características celulares		
Morfología	Bastones terminación redondeada	Bastones, cortos con terminación redondeada
Movilidad	Sin movilidad	Sin movilidad
Tinción	Gram positivas, los cultivos viejos pueden volverse gram negativas	Gram positivas, los cultivos viejos pueden mostrar porciones no teñidas
Encontradas	Separadas, en pares y cortas cadenas	Frecuentemente en cadenas
Tamaño	0.6 a 0.9 por 1.5 a 6.0 μ	
Hábitat	Productos lácteos	Productos lácteos

Características del cultivo

Sembrar en agar o en agar tomate	Colonias de larga superficie y de forma retorcida; el centro es oscuro y espeso; las colonias oscuras son irregulares con fina radiación	
Sembrar en agar inclinado	Escaso crecimiento, seco	
Sembrar en caldo	Fino sedimento viscoso después de 48 hrs	
Gelatina	No crece a 20°C	
Colonias en agar suero		Circular hasta irregular
Suero gelatina		No hay licuefacción
Papa		Colonias blanco amarillentas; algunas veces no crece

Características fisiológicas

Acción bioquímica		
Leche	Coagulación desde el fondo hacia arriba; crecimiento lento	Coagulación a 37°C; no hay gas; no hay descomposición de caseína; alta actividad
Azúcar	<i>i</i> - ácido láctico y ácidos orgánicos volátiles	
Indole de producción		Negativa
Nitrito		No hay formación de nitrato
Licuefacción de la proteína		
Gelatina	No hay licuefacción	

Fermentación de reacciones		
◆ Monosacáridos Arabinosa Ramnosa Xilosa Glucosa Fructuosa Galactosa Manosa Sorbosa	No fermentada No fermentada No fermentada Acido, sin gas Acido Acido Acido	No fermentada No fermentada No fermentada Acido (fría) no fermentada Acido No fermentada
◆ Disacáridos Lactosa Sucrosa Maltosa Trialosa	Acido, sin gas Acido, sin gas Acido Fermentación variable	Acido Variable Usualmente no ácida
◆ Polisacáridos Rafinosa Dextrin Manitol Ducitol	Fermentación variable Algunas clases, acción ligera	No fermentada No fermentada

Factores de crecimiento

Factores de crecimiento		
Oxígeno	Microaerofílicos	Aeróbicos
Temperatura		
Optima	37°C	45° a 50°C; organismos de alta temperatura
Máxima	43° a 48°C	
Mínima		22°C
No crece	20° a 22°C	
Nutrición	Careciendo el medio de carbohidratos; no hay crecimiento	
pH	Crece en medio ácido	

Utilización industrial

Productos		Acido láctico
Procesos	Leche de <i>acidophilus</i>	Manufactura suero de manteca, queso crema, quesos relacionados, yogurth, otras leches fermentadas. Cultivos usados para impedir el desuerado del suero de manteca durante la pasteurización de crema ácida Usado hasta madurar y formar gas en quesos . Fermentación normal en ensilaje

Utilización médica

	Terapia de varios disturbios gastrointestinales; la clase R empleada usualmente	
--	---	--

Patogenicidad

	No es patógeno para animales de laboratorio	
--	---	--

2.3. METODOS DE CONSERVACION

2.3.1. Conservación en Refrigeración

Los cultivos bacterianos pueden mantenerse vivos en los tubos de medio en que se cultivan transfiriéndolos periódicamente a un medio reciente. Los intervalos de tiempo entre una y otra transferencia varían con el microorganismo. Muchas de las bacterias se conservan viables durante semanas o meses en medios con agar

nutritivo. Cuando se emplea este procedimiento para mantener una colección de cultivos, hay que cerciorares previamente de tres condiciones: el medio adecuado para cada especie, la temperatura, y el lapso de tiempo a que deben hacerse las transferencias al medio nuevo. Por ejemplo, *Bacillus spp* se conserva en agar nutritivo con tiempos de transferencia de 12 meses o más, almacenado a 10°C. (Pelczar, 1978)

Uno de los problemas que presenta este método es en el almacenaje ya que los cultivos pueden desarrollar características alteradas en subcultivos prolongados. (Norton, 1981)

2.3.2. Conservación cubriendo los cultivos con Aceite Mineral

Muchas bacterias pueden conservarse en buenas condiciones cubriendo su cultivo en agar inclinado con aceite mineral esterilizado. El aceite debe cubrir por completo la superficie inclinada, para asegurar lo cual conviene que sobrepase como un centímetro el extremo superior del declive. El mantenimiento de la viabilidad por este procedimiento varía con las especies, pero por lo general es de varios años. Algunas especies se conservan en buen estado durante 15 a 20 años. Este método tienen la singular ventaja de que permite tomar a voluntad una muestra de cultivo bajo el aceite con el alambre de inoculación, para sembrarlo en un medio nuevo, conservando protegido el cultivo original. (Pelczar, 1978)

2.3.3. Conservación en Congelación

Aunque la congelación impide el crecimiento de los microbios, no siempre determina su muerte. De hecho la congelación es uno de los mejores medios de conservar muchos cultivos microbianos para posterior estudio y es utilizada

extensamente en los laboratorios de investigación. En general las células grandes son más sensibles a la congelación que las pequeñas y las desprovistas de paredes celulares más sensibles que las que las poseen. Incluso en organismos que soportan la congelación, generalmente mueren algunas células cuando se congela un cultivo, probablemente debido a la formación de cristales de hielo en el protoplasma y consiguiente destrucción de la integridad celular. Si una célula sobrevive a la congelación interna puede permanecer viable en estado de congelación durante largos períodos de tiempo. Esto es realmente una situación de vida suspendida, solamente cuando se deshuela el cultivo puede recompensar el metabolismo. (Brock, 1973)

La cristalización del agua por congelación no puede dudar perturbar el estado coloidal de la célula. Por otra parte, la mortalidad de la célula puede ser debido a "muerte salina" o a la concentración excesiva de cristales así como la separación del solvente puro de la solución. La congelación y descongelación pueden volverse más destructivas por alterar el estado coloidal del protoplasma de la célula (Weiser, 1968)

Una vez congeladas, las células sobrevivientes conservan su viabilidad indefinidamente si la temperatura es mantenida debajo del punto de congelación de las diferentes sales presentes (ca -20°C para NaCl).(Delbecco, 1968)

2.3.4. Conservación por Liofilización

En estado seco la capacidad germinativa de muchas bacterias, y a caso la mayoría se conservan durante años. En las colecciones de conservación de bacterias, las células vegetativas se secan por lo general en estado congelado

(liofilización) y se conservan a temperatura ambiental o a temperatura baja en el vacío. (Schlegel, 1979)

En este procedimiento, volúmenes pequeños de un cultivo vivo son colocados en vasos de vidrio. Estos son rápidamente congelados a una muy baja temperatura esto se logra introduciéndolos en una mezcla de hielo seco (dióxido de carbono sólido) y alcohol (-78°C). Luego se conectan a la conducción de alto vacío y las células permanecen firmemente congeladas hasta que toda el agua se pierde, después los vasos de vidrio son sellados a bajo vacío. (Norton, 1981, y Pelczar, 1978)

Este procedimiento es el más eficaz para la conservación de cultivos. Muchas especies bacterianas permanecen viables y sin alteración durante más de 20 años conservadas por este método. Las importantes ventajas que presenta esta técnica son el largo plazo de supervivencia, a la menor oportunidad para cambios en los caracteres del cultivo, y el pequeño volumen de los viales de conservación. En un pequeño espacio pueden almacenarse cientos de cultivos liofilizados. (Pelczar, 1978)

2.3.5. Conservación por Desecación de cultivos

Son satisfactorios dos métodos. Para desecar por el método de Stamp, se hace una pequeña cantidad de gelatina al 10% en caldo nutritivo y se añade 0.25% de ácido ascórbico. Se añade una suspensión densa de gérmenes antes de que el medio gelifique (de manera que se obtenga una densidad final alrededor de 10 organismos/ml). Se sumergen hojas de papel encerado en cera, se escurren y se dejan solidificar. Se desecan en un desecador de vacío con

petóxido de fósforo. Pueden utilizarse en lugar de papel encerado placas de petri recubiertas de una solución al 20% de silicona en éter de petróleo y desecados en el horno de aire caliente.

El método de Rayson difiere ligeramente. Se usa caldo suero al 10% o caldo gelatina y se distribuyen en gotas sobre discos de unos 10 cm de diámetro cortados en papel celofán y esterilizados dentro de placas de petri Se secan en un desecador de vacío sobre petóxido de fósforo. Se guardan en frascos de tapón a rosca, en el frigorífico. (Collins, 1989)

III. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el kilómetro 17.5 de la carretera Marín-Zuazua en el municipio de Marín, Nuevo León.

La duración aproximada fue de 7 meses, iniciando en Febrero de 1996 para terminar en Agosto del mismo año.

Se utilizaron métodos tradicionales de conservación de microorganismos reportados previamente por diferentes autores (Pelczar, 1978 y Collins, 1989). Las modificaciones a los métodos para adaptarlos a la disponibilidad de material y equipo se explicarán posteriormente.

3.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se utilizaron en esta investigación fueron; cultivo en agar láctico y cultivo en caldo lactosado, los cuales se prepararon en el laboratorio de biotecnología microbiana y cuyas diferencias se observan a continuación (cuadro 3).

Cuadro 3.-Preparación de medios de cultivo para un litro de Agua.

	Agar Láctico (medio sólido)	Caldo lactosado (medio líquido)
Agar de Soya	20 gr	—
Triptocaseína		
Caldo de Soya	—	20 gr
Triptocaseína		
Extracto de Levadura	5 gr	5 gr
Gelatina Bacteriológica	2.5 gr	—
Glucosa	5 gr	5 gr
Sacarosa	5 gr	5 gr
Lactosa	5 gr	5 gr
Cloruro de Sodio	4 gr	4 gr
Acetato de sodio	1.5 gr	1.5 gr
Acido Ascórbico	.5 gr	.5 gr
Agar Bacteriológico	15 gr	—

3.2. BACTERIAS LACTICAS

En esta investigación se utilizaron las siguientes bacterias lácticas: *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*; obtenidas del cepario del laboratorio de biotecnología microbiana de la Facultad de Agronomía en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS

En esta investigación fue necesario hacer pruebas bioquímicas para poder diferenciar a *Streptococcus cremoris* de *Streptococcus lactis*.

Las pruebas bioquímicas diferenciales que se utilizaron fueron las reportadas para estas especies (Morris, 1960). Una de las pruebas consistieron en el crecimiento en caldo lactosado con NaCl. (Cuadro 4)

Se prepararon 4 matraces modificados (matraz Erlen Meyer 50 ml con tubo de ensayo para lectura de espectrofotometro) para cada bacteria con 10 ml de caldo lactosado y su respectiva concentración de NaCl (0%, 2%, 4%, 6.5%); a cada concentración se le hicieron dos repeticiones. Después se procedió a sembrar con *S. cremoris* y *S. lactis* respectivamente; se incubaron a 35°C por 24 hrs, y se determinó su crecimiento midiendo la turbidez como densidad óptica a 686 nm, en un espectrofotometro marca Spectronic 21DUV, modelo Milton Roy 332279.

Cuadro 4.-Comportamiento general del crecimiento de *S. lactis* y *S. cremoris* bajo diferentes concentraciones de NaCl (Morris, 1960)

Crecimiento en Densidad Optica			
NaCl	Control	<i>S. lactis</i>	<i>S. cremoris</i>
0%	0	✓	✓
2%	0	✓	✓
4%	0	✓	—
6.5%	0	0	0

Otra prueba consistió en el crecimiento en agar láctico con azul de metileno (Cuadro 5)

Se preparó agar láctico para las 6 concentraciones de azul de metileno (0, .01, .1, .2, .3, .5), luego se llenaron 2 cajas de petri para cada concentración (2 repeticiones) se inocularon las 2 especies de bacterias y se dejaron en incubación a 35° C por 24 hrs. Se reporta el crecimiento bacteriano.

Cuadro 5.-Comportamiento general del crecimiento que deben mostrar *S. lactis* y *S. cremoris* bajo diferentes concentraciones de azul de metileno (Morris, 1960).

% de Azul de Metileno (Solución al 4%)		Control	<i>S. lactis</i>	<i>S. cremoris</i>
0	0%	0	✓	✓
.01	.0625%	0	✓	✓
.1	.625%	0	✓	✓
.2	1.35%	0	✓	?±
.3	1.875%	0	✓	0
.5	3.75%	0	0	0

Las bacterias identificadas se aislaron en medio de cultivo (agar láctico) y se almacenaron en refrigeración a 4°C para su uso posterior.

3.5. METODOS DE CONSERVACION

3.5.1. Conservación en Refrigeración

3.5.1.1. Medio Líquido

Se prepararon 4 matraces con 35ml de caldo lactosado (Cuadro 3) para cada una de las 4 bacterias lácticas (*S. lactis*, *S. cremoris*, *L. bulgaricus*, *L. acididophilus*) los cuales fueron sembrados respectivamente y se dejaron incubando a 35°C por 24 hrs. Para cada uno de los matraces se llenaron 7 tubos estériles con 4 ml de caldo lactosado con los microorganismos y se conservaron en refrigeración a 5°C.

3.5.1.2. Medio Sólido

Se prepararon 7 tubos con agar láctico (Cuadro 3) inclinado para cada una de las bacterias lácticas, inoculándolos respectivamente. Se incubaron a 35°C por 24 hrs, para posteriormente pasarse a conservar en refrigeración a 5°C.

3.5.2. Conservación en Congelación

3.5.2.1. Medio Líquido

Al igual que en el tratamiento anterior se inocularon los matraces que contenían medio líquido (caldo lactosado) con cada una de las bacterias lácticas y se repartieron 4 ml de muestra en 7 tubos de ensayo estériles de cada uno de los matraces y se procedió al tratamiento de congelación (-20°C), pero previo a este se bajo la temperatura poco a poco de 5°C a 0°C y al final -20°C.

3.5.2.2. Medio Sólido

Luego de tener 7 tubos con agar láctico inclinado ya inoculado de cada una de las bacterias lácticas, se pasarán a conservar en congelación a -20°C siguiendo el tratamiento descrito previamente.

3.5.3. Conservación por Desección de cultivos

Se utilizaron 4 matraces con 15 ml de caldo lactosado (Cuadro 1) con cultivos frescos de 24 hrs de las bacterias lácticas. Luego se preparó agar (2 gr de agar bacteriológico en 50 ml de agua) para cada uno de los matraces. Se prepararon 7 cajas de petri las cuales contenían un disco de papel encerado del tamaño de la caja y esterilizado junto con ella. La mezcla de caldo láctico con bacterias y el agar como agente gelificante se distribuyó en pequeños círculos en cada caja, aproximadamente de medio centímetro, incubándose y secándose posteriormente a 35°C . Ya secas las hojuelas se despegan asepticamente y se guardan en bolsas de plástico estériles (una para cada caja), se etiquetaron y se almacenaron en refrigeración a 5°C .

3.3.4. Conservación cubriendo los cultivos con Aceite Mineral

Se prepararon 7 tubos con agar láctico (Cuadro 3) inclinado para cada una de las bacterias lácticas, se sembraron y se incubaron a 35°C por 24 hrs, luego se agregó aceite mineral estéril hasta cubrir la parte superior del declive y posteriormente se dejaron en refrigeración a 5°C .

3.5.5. Conservación por Liofilización

Se prepararon 50 ml de caldo lactosado (Cuadro 3) para cada una de las cuatro bacterias lácticas, se sembraron respectivamente una en cada matraz y se

incubaron a 35°C por 24 hrs; para posteriormente bajarles la temperatura gradualmente como sigue de 5°C, a 0°C, y después -20°C. Luego se conectaron los matraces al liofilizador marca Lyph-Lock 4.5L, modelo Labconco 77510 y se aplicó el alto vacío (menos de .01mmHg), después de haberse completado la desecación se recuperaron las muestras para cada bacteria, conservándolas en cada matraz a temperatura ambiente. De estos matraces se tomaron muestras para análisis posteriores

3.4. REACTIVACION DE BACTERIAS

3.4.1. Reactivación de bacterias Congeladas, Refrigeradas y con Aceite Mineral

Se tomaron muestras de las bacterias conservadas bajo estos tres métodos y se reactivaron sembrando 5 repeticiones en cajas de petri con agar láctico. De las 7 repeticiones se reactivaron 5 de ellas a las 3 semanas, 6 semanas, 9 semanas y a las 14 semanas, en el último tratamiento se reactivaron las 7 repeticiones (2 de ellas sirviendo de control de tratamiento desde su incubación hasta el final).

3.4.2. Reactivación de bacterias Desecadas y Liofilizadas

Para estos tratamientos fue necesario primero reactivar las bacterias lácticas en caldo lactosado; para posteriormente en cajas de petri con agar láctico sembrarlas con una asa y determinar cualitativamente la presencia de bacterias lácticas. Las 7 repeticiones se muestrearon de acuerdo a lo descrito previamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PRUEBAS BIOQUIMICAS

Para la realización de esta investigación se hicieron dos pruebas bioquímicas diferenciales para identificar a *S. lactis* de *S. cremoris*, las cuales consistieron en crecimiento en caldo lactosado con diferentes concentraciones de NaCl y crecimiento en agar láctico para diferentes concentraciones de azul de metileno; estas mostraron que las dos especies que se tenían correspondían con las que se querían trabajar, además de que sus características morfológicas observadas mediante tinción correspondían a cada una de ellas (Ver tabla 1 en características celulares)

4.2. INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.2.1. Metodología

Para la realización de esta investigación fue necesario usar una escala cualitativa para clasificar los resultados (ver cuadro 6)

Cuadro 6. Escala cualitativa para clasificar los resultados

Escala	Clasificación
1	Casi nulo
2	Muy poco
3	Poco
4	Regular

5	Abundante
6	Muy abundante
7	Demasiado abundante

Los resultados se analizaron comparando las medias de calificación de los diferentes tratamientos. Debido a que la variable analizada no cuenta con distribución normal, no se realizó comparación estadística; esta comparación no es necesaria debido a que los resultados son muy contrastantes entre los diferentes métodos de conservación y bacterias.

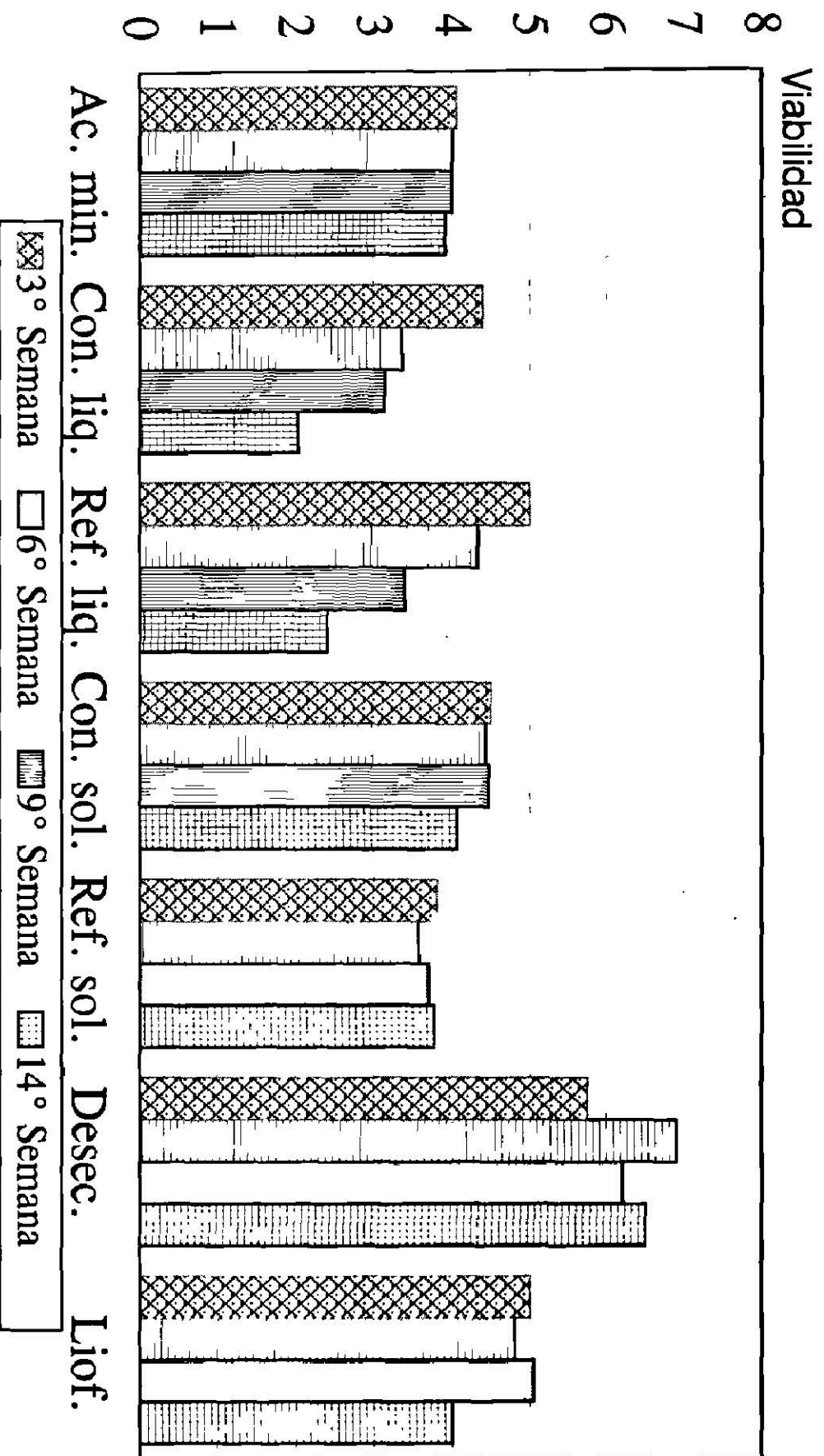
4.2.2. Comparación de siete métodos de conservación de bacterias

En esta gráfica 1 se muestra el comportamiento de los siete métodos de conservación durante los cuatro muestreos, donde se observó que en los métodos de conservación con aceite mineral, congelación y refrigeración en medio sólido se mantuvieron constantes; mientras los métodos de congelación y refrigeración en medio líquido disminuyeron la viabilidad de las bacterias durante los muestreos. Los métodos que respondieron mejor fueron liofilización y desecación de cultivos siendo este último el más satisfactorio.

4.2.3. Comparación de cuatro bacterias acidolácticas durante cuatro muestreos

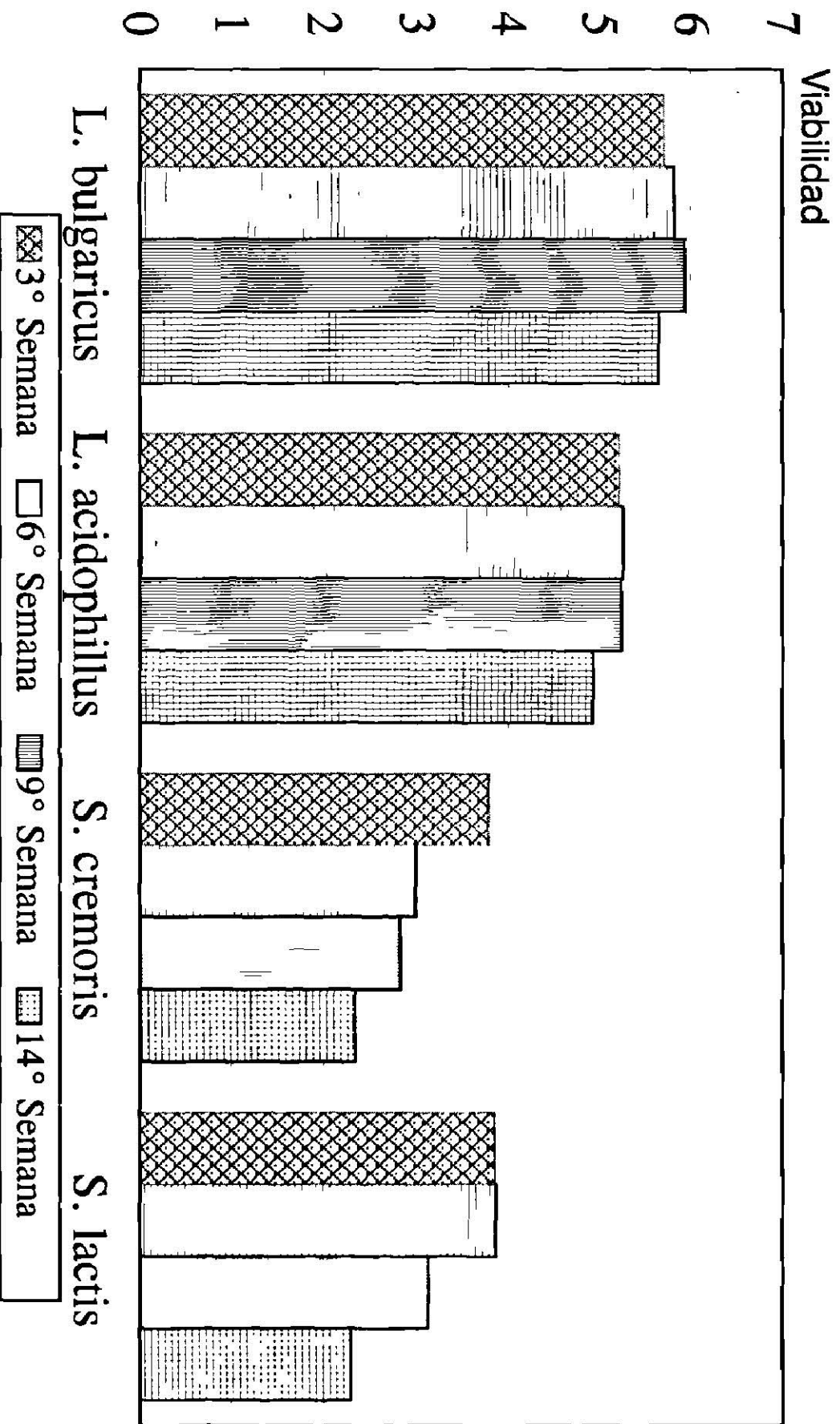
En la gráfica 2 se muestra el comportamiento de las cuatro bacterias acidolácticas, donde se observa que *Lactobacillus bulgaricus* y *acidophilus* se mantuvieron constantes durante los muestreos con buena viabilidad, siendo el más viable *L. bulgaricus*. Los *Streptococcus cremoris* y *lactis* no respondieron tan satisfactoriamente pues decrecieron su viabilidad a medida que el tiempo pasaba.

Gráfica 1: Comparación de 7 métodos de conservación de bacterias



1 = muy baja viabilidad, 7 = muy alta viabilidad

Gráfica 2: Comparación de 4 bacterias acidolácticas durante cuatro muestreos



1 = muy baja viabilidad, 7 muy alta viabilidad

4.2.4. Comparación de sies métodos de conservación para cuatro bacterias acidolacticas a las tres semanas de almacenamiento.

La grafica 3 muestra que a las tres semanas el mejor método de conservación para todas las bacterias fué desecación de cultivos siguiendole el método de liofilización para el caso de los *Lactobacillus*; mientras para los *Streptococcus* los metodos de congelado y refrigerado en medio líquido. En el caso de *L. acidophilus* no funcionó bajo el método de congelación en medio líquido, para los *Streptococcus* el método que no les favoreció fue el de conservación en aceite mineral; mientras que *L. bulgaricus* respondió bien a casi todos los métodos de conservación.

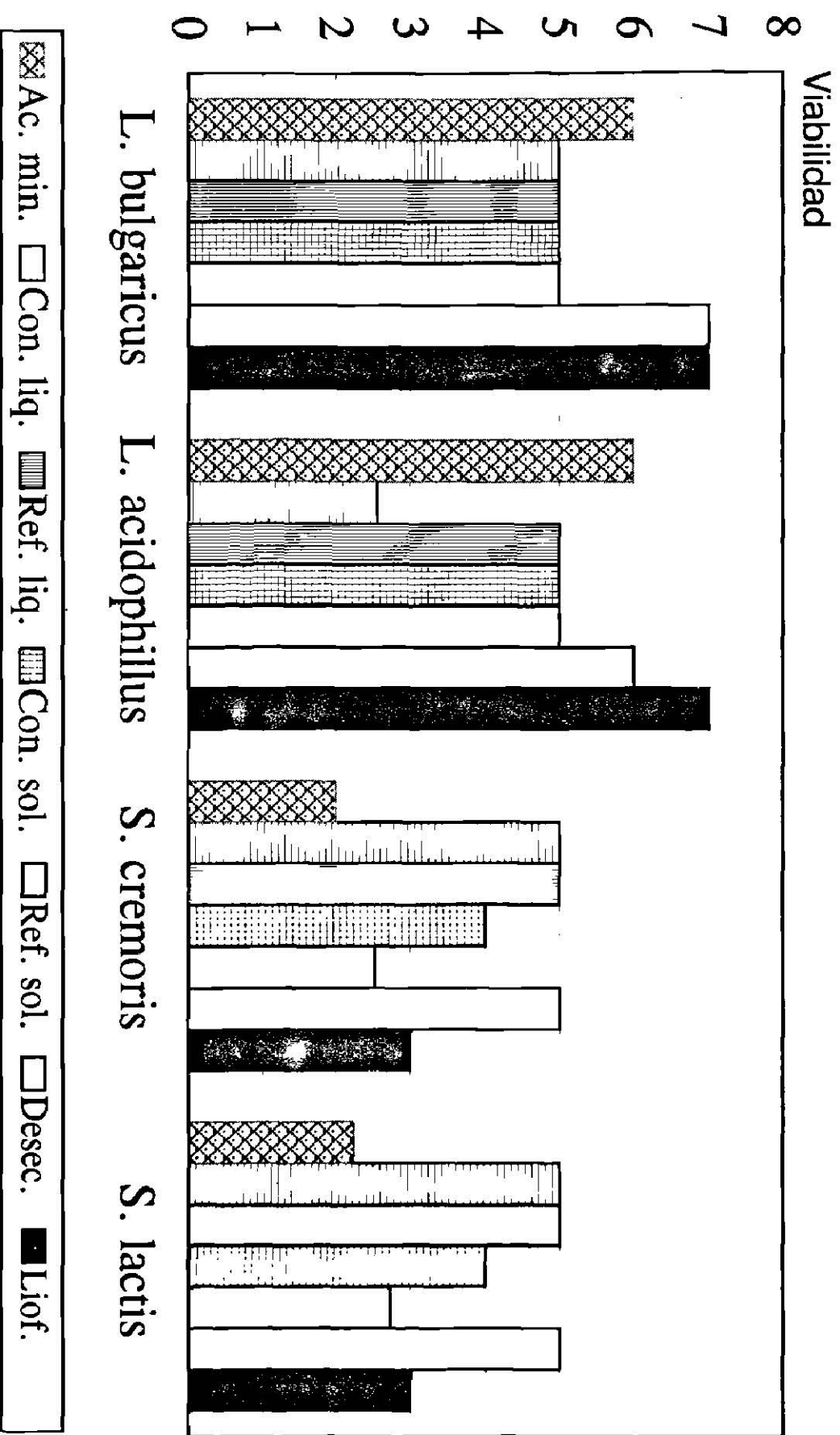
4.2.5. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolacticas a las seies semanas de almacenamiento.

La gráfica 4 muestra que los mejores métodos de conservación para todas las bacterias a las seis semanas fueron desecación de cultivos y liofilización. El método que no resultó bueno para los *Steptococcus* fue el de conservación con aceite mineral, mientras que para *L. acidophilus* lo siguió siendo el congelado en medio líquido. Al igual que en el resultado de las 3 semanas *L. bulgaricus* siguió respondiendo bien a los métodos de conservación a las seis semanas.

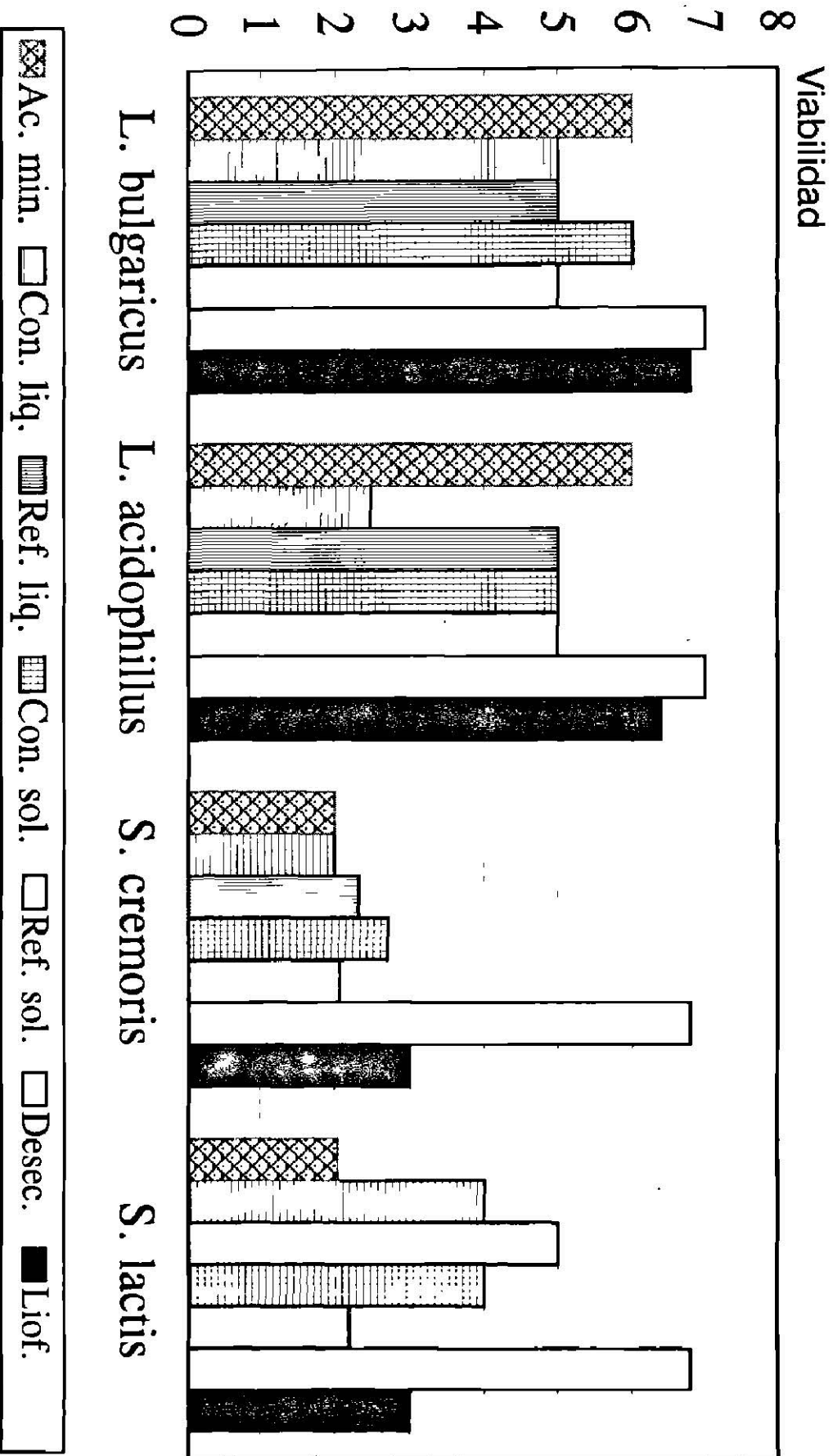
4.2.6. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolacticas a las nueve semanas de almacenamiento.

Se muestra en la gráfica 5 que a las nueve semanas los métodos de desecación de cultivos y liofilización siguen siendo los mejores y que los demás

Gráfica 3: Comparación de 7 métodos de conservación para 4 bacterias acidolácticas a las tres semanas de almacenamiento

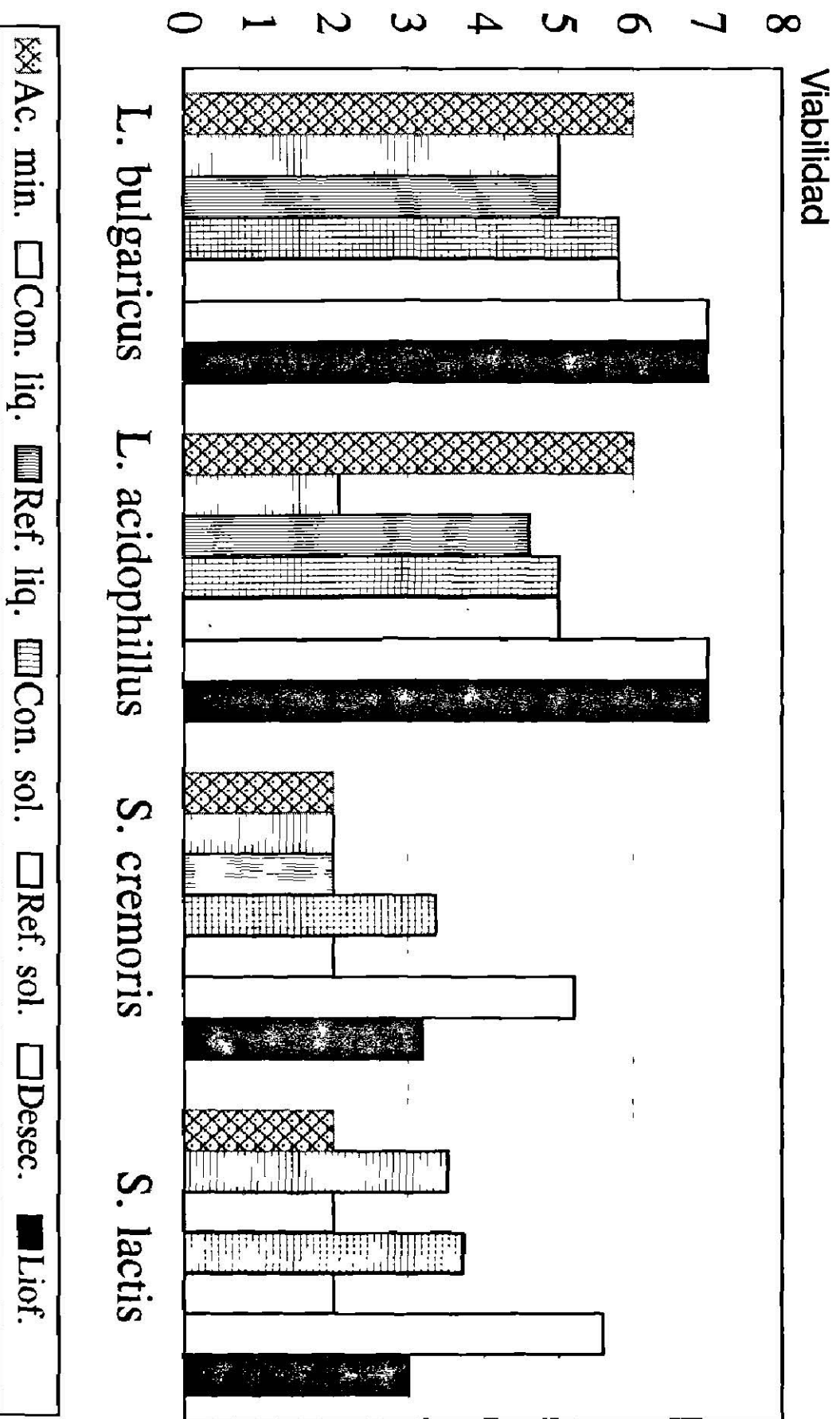


Gráfica 4: Comparación de 7 métodos de conservación para 4 bacterias acidolácticas a las seis semanas de almacenamiento



1 = muy baja viabilidad, 7 muy alta viabilidad

Gráfica 5: Comparación de 7 métodos de conservación para 4 bacterias acidolácticas a las nueve semanas de almacenamiento



1 = muy baja viabilidad, 7 muy alta viabilidad

métodos permanecieron casi constantes para el caso de los *Lactobacillus*; mientras para los *Streptococcus* siguen disminuyendo su viabilidad.

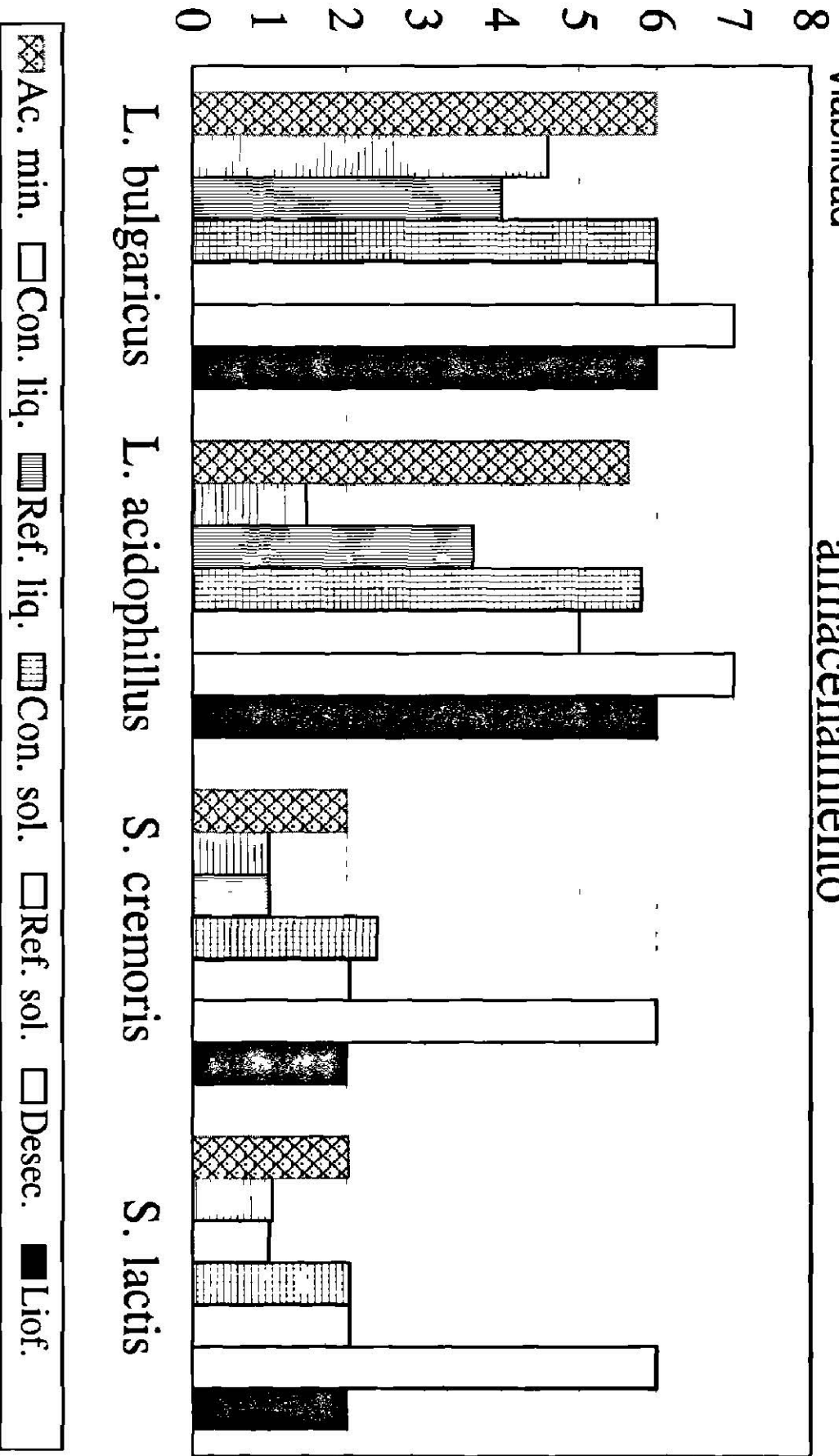
4.2.7. Comparación de siete métodos de conservación para cuatro bacterias acidolácticas a las catorce semanas de almacenamiento.

En la última gráfica se observaba que para estas bacterias las catorce semanas (gráfica 6) el mejor método de conservación sigue siendo la desecación de cultivos, seguido del liofilizado y para lo cual hay información que así lo acredita. (COLLINS, 1989)

Los *Streptococcus* resultaron ser los que no tan fácil se adaptaban a los métodos de conservación y se comprobó con lo publicado por algunos autores. (CARPENTER, 1989)

El método que tuvo menor aceptación fué el de congelación en medio líquido, ya que la cristalización del agua por congelación perturba el estado coloidal de la célula y congelar y descongelar varias veces termina por destruir la célula, por lo cual cabe mencionar que se obtuvo información al respecto que comprobaba lo antes mencionado. (WEISER, 1962)

Gráfica 6: Comparación de 7 métodos de conservación para 4 bacterias acidolácticas a las catorce semanas de almacenamiento



1 = muy baja viabilidad, 7 muy alta viabilidad

V. CONCLUSIONES

El método de conservación que resultó mejor para todas las bacterias durante los cuatro muestreos fue la desecación de cultivos seguida de la liofilización.

Con respecto a los demás métodos cabe mencionar que hay variación en los resultados para cada una de las bacterias.

Los métodos que resultaron no ser tan buenos fueron congelación y refrigeración en medio líquido.

Los *Lactobacillus* resultaron funcionar mejor para estos métodos de conservación que los *Streptococcus*; siendo *L. bulgaricus* el que mejor se conservó.

VI. OBSERVACIONES

Es importante mencionar que algunos de los métodos presentaron desventajas que no los hacen tan recomendables como es en el caso del método de refrigeración en medio sólido que después de las tres semanas se comenzaba a secar la superficie del cultivo haciendo difícil sacar muestra al momento de reactivar.

El método de aceite mineral presentó problemas de coloración en el cultivo al igual que algunas muestras de refrigeración en medio sólido que se obscurecieron.

El método de congelación en medio líquido resultó no ser muy bueno debido a que al descongelar y congelar de cada muestreo disminuía la viabilidad de las bacterias, ya que las dos repeticiones que se mantuvieron sin descongelar hasta el último muestreo, mostraron más viabilidad para el caso de los *Lactobacillus*

VII. RESUMEN

Las bacterias acidolácticas son, probablemente, el grupo de bacterias de máxima importancia para la industria de la leche, así como de una gran variedad de productos. Es entonces por esto que se le ha tratado de buscar el mejor método para su conservación.

En esta investigación se evaluó la conservación de bacterias lácticas en base a siete métodos que corresponden a: conservación cubriendo los cultivos con aceite mineral, refrigeración en medio líquido, refrigeración en medio sólido, congelación en medio líquido, congelación en medio sólido, desecación de cultivos y liofilización.

Se utilizaron cuatro tipos de bacterias acidolácticas (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *S. cremoris* y *S. lactis*); de las cuales se tenían siete repeticiones de cada una para cada uno de los métodos de conservación. De las siete repeticiones se reactivaron cinco de ellas a las 3 semanas, 6 semanas, 9 semanas y a las 14 semanas se reactivaron las siete repeticiones (donde 2 de las repeticiones sirvieron de control desde su incubación hasta el final).

El método que funcionó mejor fue la desecación de cultivos, luego le siguió la liofilización que también tuvo buena aceptación. Las bacterias que resultaron conservarse mejor fueron los *Lactobacillus* en especial *L. bulgaricus*. El método que tuvo menor aceptación fue el de congelación en medio líquido.

VII. BIBLIOGRAFIA

Alais Charles. 1970. Ciencia de la Leche. Ed. Continental, S.A., de C.V., México. Pag 280,281, 288, 289.

Bottazzi Victoriano, Carla Zacconi e Pier, Giacomo Sarra. 1984 Probiotica con Bacteri Lattici. Instituti di Microbiología.

Brock D.Thomas. 1973. Biología de los Microorganismos. Ed. Omega S.A., Barcelona. Pag. 202.

Carpenter Philip L. 1969. Microbiología, segunda edición. Ed. Nueva editorial Internacional, S.A., de C.V., México. Pag. 222.

Collis C. H., Patricia M. Lyne. 1989. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España. Pag. 109.

Delbecco, Davis, Eisen, Ginsberg Wooo, Harper & Row. 1968. Principles of Microbiology and inmunology. New York, Evanston y London. Pag. 40.

Demeter Karl J. 1969. Lactobacteriología. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pag. 99.

Demeter Kar J. Y H. Elbertzhagen. 1971. Elementos de Microbiología Lactológica, sexta edición. Ed. Acribia, Zaragoza, España. Pag. 80-82, 88, 91,92.

Foster M., E. D. Win, F. Eugene Nelson, Marvin L. Speack, Raymond N. Doefsch, Joseph C. Olson, Jr. 1957. Microbiología de la Leche, primera edición. Ed. Herrero, S.A., México, D.F. Pag. 9,12 y 13.

Friend Norton Cynthia. 1981. Microbiology. Ed. Addison Wesley Publishing Company. Pag. 193.

Jay. James M. 1978. Microbiología Moderna de los Alimentos, segunda edición. Ed. Acribia, España. Pag. 262.

Morris B. Jacobs, Maurice J. Gerstein. 1960. Handbook of Microbiology Ed. Published by Van Nostrand Reinhold Company. New York. Pag. 69, 70, 134-137.

Pelczar Michael J., Jr., Roger D. Reid. 1978. Microbiología, segunda edición. Ed. Libros Mξ Graw-Hill de México, S.A., de C.V., Pag. 116-118.

Schlegel Hans. G. 1979. Microbiología General. segunda edición. Ed. Omega S. A., Barcelona. Pag. 61.

**Weiser Harry H. 1962. Practical Food Microbiology and Technology. Ed.
The Avi Publishing Company, Inc. London, England. Pag. 85, 86.**

ANEXO

IX ANEXO

Tabla 1. Medias de los métodos de conservación durante los cuatro muestreos.

Método	3 Semanas	6 Semanas	9 Semanas	14 Semanas
M1	4.06	4.01	4	3.92
M2	4.39	3.37	3.15	2.03
M3	5	4.33	3.40	2.41
M4	4.50	4.43	4.47	4.06
M5	3.81	3.57	3.70	3.77
M6	5.75	6.90	6.20	6.50
M7	5	4.80	5.05	4

Nota: **M1**-Aceite mineral, **M2**-Congelación en medio líquido, **M3**-Refrigeración en medio líquido, **M4**-Congelación en medio sólido, **M5**-Refrigeración en medio sólido, **M6**-Deshidratación, **M7**-Liofilización.

Tabla 2. Medias de las bacterias durante los cuatro muestreos.

Bacteria	3 Semanas	6 Semanas	9 Semanas	14 Semanas
<i>L. bulgaricus</i>	5.71	5.82	5.94	5.65
<i>L. acidophilus</i>	5.22	5.26	5.24	4.93
<i>S. cremoris</i>	3.78	2.98	2.82	2.34
<i>S. lactis</i>	3.85	3.86	3.12	2.30

IX ANEXO

Tabla 1. Medias de los métodos de conservación durante los cuatro muestreos.

Método	3 Semanas	6 Semanas	9 Semanas	14 Semanas
M1	4.06	4.01	4	3.92
M2	4.39	3.37	3.15	2.03
M3	5	4.33	3.40	2.41
M4	4.50	4.43	4.47	4.06
M5	3.81	3.57	3.70	3.77
M6	5.75	6.90	6.20	6.50
M7	5	4.80	5.05	4

Nota: **M1**-Aceite mineral, **M2**-Congelación en medio líquido, **M3**-Refrigeración en medio líquido, **M4**-Congelación en medio sólido, **M5**-Refrigeración en medio sólido, **M6**-Deshidratación, **M7**-Liofilización.

Tabla 2. Medias de las bacterias durante los cuatro muestreos.

Bacteria	3 Semanas	6 Semanas	9 Semanas	14 Semanas
<i>L. bulgaricus</i>	5.71	5.82	5.94	5.65
<i>L. acidophilus</i>	5.22	5.26	5.24	4.93
<i>S. cremoris</i>	3.78	2.98	2.82	2.34
<i>S. lactis</i>	3.85	3.86	3.12	2.30

Tabla 3. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 3 semanas de almacenamiento.

Bacteria	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<i>L. bulgaricus</i>	6	5	5	5	5	7	7
<i>L. acidophilus</i>	6	2.56	5	5	5	6	7
<i>S. cremoris</i>	2	5	5	4	2.25	5	3
<i>S. lactis</i>	2.24	5	5	4	2.72	5	3

Tabla 4. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 6 semanas de almacenamiento.

Bacteria	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<i>L. bulgaricus</i>	6	5	5	6	5	7	6.80
<i>L. acidophilus</i>	6	2.48	5	5	5	7	6.40
<i>S. cremoris</i>	2	2	2.32	2.72	2.08	6.80	3
<i>S. lactis</i>	2.04	4	5	4	2.20	6.80	3

Tabla 5. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 9 semanas de almacenamiento.

Bacteria	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<i>L. bulgaricus</i>	6	5	5	5.80	5.80	7	7
<i>L. acidophilus</i>	6	2.08	4.60	5	5	7	7
<i>S. cremoris</i>	2	2	2	3.36	2	5.20	3.20
<i>S. lactis</i>	2	3.52	2	3.72	2	5.60	3

Tabla 6. Medias de las bacterias en cada uno de los métodos de conservación a las 14 semanas de almacenamiento.

Bacteria	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<i>L.bulgaricus</i>	6	4.60	4	6	6	7	6
<i>L. acidophilus</i>	5.64	1.48	3.64	5.80	5	7	6
<i>S. cremoris</i>	2	1	1	2.40	2.04	6	2
<i>S. lactis</i>	2.04	1.04	1	2.04	2.04	6	2

1921
1922