

Morfología y Diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas

P. Ramírez-Baca^{*1}, B. García-Cansino², E. Moreno-Hernández², J. M. Ríos-Carmona², C. Rodríguez-Cisneros, J. Vásquez-Arroyo^{1,2}, R. Rodríguez-Martínez¹, S. Esparza-González², G. V. Nevárez-Morrillón³

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Periférico y Carr. Santa Fe, 27054, Torreón, Coah. México. Tel (871) 715-8810, Fax (871) 715-2964. E-mail: ramirezbp2000@hotmail.com (*Autor responsable). ²Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas. Av. Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. México. ³Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Apdo. Postal 1542-C, Chihuahua, Chih. México.

Abstract

Yogurt is a milky product fermented with lactic cultures that include *Streptococcus*, *thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* as mixed cultures. Probiotic bacteria, like *L. acidophilus*, are believed to have therapeutic properties, that is the reason why they may be added to yogurt in order to provide it with additional properties. Yogurt must contain, at least, 10^6 UFC ml⁻¹ of viable bacteria at the time of its consumption, this is why it is important to state the differentiation of this type of bacteria in fermented products. The aim of this work was to state the difference, with a combination of culture means, of the bacterial groups present in a sample of fermented milk inoculated with *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*. Six different means of culture were assayed: 1) agar with skimmed milk at 20%, 2) agar with skimmed milk at 10%, 3) MRS, 4) MRS with sorbitol at 5%, 5) MRS with sorbitol at 5%, and controlled pH at 5,4, 6) M17 with controlled pH at 7,2; and growth, and the differentiation in the morphology of each one of the three studied bacteria were evaluated. The means used for the differentiation of the colonies were MRS with sorbitol, and pH fit to 5,4 for the *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*, where a different morphology for each of these microorganisms is observed. *L. bulgaricus* colonies had, approximately, 1,0 mm in diameter, with a morphology with indefinite edges, flat, and with a translucent white, and opaque color. The colonies of *L. acidophilus* were convex, circular, punctiform and smaller than the previous ones. The *S. thermophilus* grew in the M17 Agar, and the observed colonies were round, white, smooth and shining; in this mean, growth of the lactobacillus was not observed. The use of MRS with sorbitol at 5% with a controlled pH of 5,4 and M17 is a recommended mean for the differentiation of the studied bacteria.

Key words: lactic bacteria, differentiation, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, yogurt

Resumen

El yogurt es un producto lácteo fermentado con cultivos lácticos que incluyen *Streptococcus*, *thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* como cultivos mixtos. A las bacterias probióticas como el *L. acidophilus* se les atribuyen propiedades terapéuticas, por lo que se pueden adicionar al yogurt con objeto de proporcionarle propiedades adicionales. El yogurt debe contener al menos 10^6 UFC ml⁻¹ de bacterias viables al momento de su consumo, por lo cual, se considera importante la diferenciación de este tipo de bacterias en productos fermentados. El objetivo de este trabajo fue diferenciar con una combinación de medios de cultivo, los grupos bacterianos presentes en una leche fermentada inoculada con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*. Se probaron seis diferentes medios de cultivo: 1) agar con leche descremada al 20 %, 2) agar con leche descremada al 10 %, 3) MRS, 4) MRS con sorbitol al 5 %, 5) MRS con sorbitol al 5 % y pH controlado a 5,4, 6) M17 con pH controlado a 7,2, y se evaluaron el crecimiento y la diferenciación en la morfología de cada una de las tres bacterias estudiadas. Los medios útiles para la diferenciación de las colonias fueron el MRS con sorbitol y pH ajustado a 5,4 para el *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, en donde se observa una morfología diferente de cada uno de estos microorganismos. Las colonias del *L. bulgaricus* tuvieron aproximadamente 1.0 mm de diámetro, una morfología con bordes indefinidos, planas, color blanco translúcido y opacas. Las colonias de *L. acidophilus*

fueron convexas, de forma circular, puntiformes y más pequeñas que las anteriores. El *S. thermophilus* se desarrolló en el Agar M17, y se observaron colonias redondas, blancas, lisas y brillantes; en este medio, no se observó crecimiento de los lactobacilos. Se recomienda la utilización de los medios MRS con sorbitol al 5 % y pH controlado a 5.4 y M17 para la diferenciación de las bacterias estudiadas.

Palabras clave: bacterias lácticas, diferenciación, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, yogurt

Introducción

El yogurt es un producto fermentado por la acción de los cultivos lácticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Djouzi *et al.*, 1997; DeNoni *et al.*, 2004) que en general refleja la composición de la leche de la cual fue elaborado. Es una buena fuente de proteína, riboflavina y vitamina B12, así como de P, Mn y Ca (Borchers *et al.*, 2002), apreciado particularmente por sus características benéficas sobre la salud, y por sus propiedades sensoriales (Corich *et al.*, 2004). En años recientes se ha vuelto una práctica común adicionar, además de las dos indispensables, algunas bacterias probióticas (*Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) (Vinderola *et al.*, 2000a; Vinderola *et al.*, 2000b; Chick *et al.*, 2001; Borchers *et al.*, 2002), principalmente a causa de los efectos benéficos que se les atribuyen (Dave y Shah, 1996; Dave y Shah, 1998; Davidson *et al.*, 2000). Aunque *S. thermophilus* es muy estable bajo condiciones normales de refrigeración por al menos 6 semanas, *L. bulgaricus* inicialmente incrementa su cuenta, pero después disminuye en el mismo período de tiempo, mientras que las especies de *L. acidophilus* y *B. bifidum* son aún menos estables cuando se adicionan al yogurt, y su número declina en algunos yogurt casos, especialmente en aquellos en que el pH disminuye rápidamente (Borchers *et al.*, 2002), aunque, por otra parte, su viabilidad se incrementa cuando la concentración de O disuelto es baja (Dave y Shah, 1998). La relación simbiótica entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, ha sido utilizada por muchos años en la elaboración del yogurt (Radke-Mitchell y Sandine, 1986; Nogueira *et al.*, 1998; Corich *et al.*, 2004). El número de bacterias vivas debe permanecer alto durante toda su vida de anaquel (Corich *et al.*, 2004) y el éxito de la fermentación descansa en la sinergia entre ambas bacterias (Courtin y Rul, 2003). El yogurt, generalmente, debe contener al menos 106 bacterias viables por gramo a la hora de su consumo, aunque estos límites no se observan en todos los países ya que en Francia y España, el mínimo requerido es de 5 x 108 UFC ml-1, mientras que en Suiza

se ha establecido como norma 106 UFC ml-1, en Japón 107 UFC g-1 y en Portugal 108 UFC g-1 (Birolo *et al.*, 2000; Corich *et al.*, 2004).

Considerando que ambas bacterias, tanto *S. thermophilus* como *L. bulgaricus* son capaces de crecer por sí mismas en leche, ésta interacción indirecta y positiva se llama proto-cooperación y, frecuentemente, tiene un efecto benéfico en el crecimiento bacteriano, en la producción de ácido láctico, y de compuestos aromáticos (Vinderola *et al.*, 2002). Se han identificado algunos de los efectos resultantes de las actividades metabólicas de los patrones de ambas bacterias, tales como la producción de ácido pirúvico, fórmico y CO₂ por *S. thermophilus*, que estimulan el crecimiento del *L. bulgaricus*, y la producción de péptidos y aminoácidos por *L. bulgaricus* que estimulan el crecimiento del *S. thermophilus* (Davis *et al.*, 1971; Courtin y Rul, 2003).

La actividad de los cultivos lácticos es de gran importancia en los procesos de producción de alimentos lácteos fermentados (Cachon *et al.*, 2002), por lo que debe tenerse un control sobre el tipo y número de bacterias viables en los productos que llegan al consumidor a fin de que contengan las características alimenticias y terapéuticas que se le atribuyen. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue describir la morfología y diferenciar las bacterias comerciales en una leche fermentada inoculada con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*.

Materiales y Métodos

Se trabajó con leche entera en polvo (Nido ® Nestlé de México, S.A. de C.V), reconstituida al 12 % m/v, y esterilizada a 121°C durante 15 minutos y con bacterias lácticas comerciales de *S. salivarius* spp *thermophilus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* y *L. acidophilus* (Rhodia Inc®, Dairy Business, Madison, WI 53701, USA). Todos los cultivos fueron pre-cultivados aeróbicamente, adicionando un 1.0% del cultivo a 15 ml de leche en polvo reconstituida y previamente esterilizada en un tubo de ensayo con rosca. Posteriormente, se prepararon 50 mL de leche, se esterilizaron bajo las mismas condiciones e inocularon para cada uno de los tratamientos al 0.8% (v/v) a partir del inóculo inicial. Se prepararon muestras de leches fermentadas, elaboradas con cultivos puros y con asociaciones de microorganismos *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*. Cuando el tratamiento involucró combinaciones, los microorganismos se sembraron en forma equivalente de manera que el contenido total fuera de 0.8%.

Se preparó la muestra acorde con la NOM-110-SSA1-

1994, preparando una dilución primaria en solución peptonada (1.0 g peptona, 8.5 g cloruro de sodio, agua 1.0 l, pH 7.0± 0.1) (Diario Oficial de la Federación 1995). Posteriormente, se hicieron diluciones decimales seriadas para cada una de las bacterias para su siembra en placa. Se prepararon diferentes medios de cultivo: 1) Agar con Leche descremada al 20 %. 2) Agar con Leche descremada al 10 %, 3) Agar Mann-Rogosa y Sharpe (MRS), 4) MRS con sorbitol al 0.5 %, 5) MRS con sorbitol al 5% y pH controlado a 5.4, 6) Agar M17 con pH controlado a 7.2. Todos los medios de cultivo usados fueron DIFCO® (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD 21152 USA). El medio de cultivo MRS-sorbitol se preparó adicionando una solución al 5 % de sorbitol estéril filtrándolo a través de una membrana Millipore de 0.45 μm al agar MRS estéril, justo antes de vaciarse. Los medios se inocularon de cada una de las diluciones por extensión en superficie, y se incubaron a 37 °C por 72 h en una atmósfera de CO₂ para los medios de leche descremada y MRS. El Agar M17 se incubó en forma aeróbica a 37 °C por 72 h (International IDF Standard 117 1983, International IDF Standard 117A 1988, Marshall 1992).

En cada uno de los medios de cultivo, se evaluó la morfología de las colonias de cada uno de los microorganismos, y de sus combinaciones, así como la posibilidad de diferenciarlos por su crecimiento o morfología en los diferentes medios.

Resultados y Discusión

Debido a la importancia que tiene el conocer el tipo y número de bacterias viables en productos fermentados al momento de su consumo, se evaluaron diferentes medios de cultivo para diferenciar tres tipos de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*) a partir de cultivos mixtos.

Agar con leche descremada

El medio de cultivo Leche descremada al 20 % coaguló al momento de esterilizarlo, lo cual no permitió la realización de las pruebas. En las pruebas en las que se utilizó el Agar leche descremada al 10 % se sembraron las bacterias puras, sin embargo, su morfología y diferenciación fue difícil, dado que el medio de cultivo es blanco, y las bacterias crecieron de ese mismo color, planas, opacas, además de que todas crecieron con la misma forma por lo que no fue posible diferenciarlas. Estos resultados muestran que no es posible diferenciar ni cuantificar ninguna de las bacterias analizadas, aunque Birollo *et al.* (2000) lo reporta como un excelente medio de diferenciación de colonias de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, también en cultivos comerciales, observando que las colonias del *S. thermophilus* son blancas, circulares y con bordes bien definidos, mientras que las del *L. bulgaricus*, fueron irregulares, planas y translúcidas.

MRS, MRS con sorbitol, y MRS con sorbitol y pH controlado

Los medios MRS y el MRS con sorbitol permitieron el crecimiento de todos los microorganismos y con morfología similar, lo que no favoreció su cuantificación por separado y lo único que se obtuvo con estos medios fue tener una cuenta total de las bacterias lácticas (Cuadro 1). Cuando el medio MRS con sorbitol al 5% se preparó controlando el pH final a un valor de 5.4, se observó crecimiento de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* y sus colonias fueron diferentes lo cual hace posible su diferenciación y cuantificación. Las colonias del *L. bulgaricus* crecieron con un tamaño de aproximadamente 1.0 mm de diámetro, planas, con bordes indefinidos, color blanco translúcido y opacas. Las colonias de *L. acidophilus* fueron convexas, de forma circular, puntiformes, y más pequeñas que las anteriores (Cuadro 1). En este medio no se logró crecimiento de bacterias *S. thermophilus*, aunque Birollo *et al.* (2000), reporta que se pueden distinguir con alguna dificultad bajo condiciones anaeróbicas colonias de *S.*

Cuadro 1. Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo y descripción del tipo de colonias presentes.

Medio de cultivo	Especie bacteriana			Descripción de las colonias
	<i>S. t.</i>	<i>L. b.</i>	<i>L. a.</i>	
Leche descremada 20 %	-	-	-	Medio no apto para crecimiento
Leche descremada 10 %	+	+	+	Blancas, planas y opacas en todos los casos.
MRS	+	+	+	Blancas, brillantes, redondas en todos los casos
MRS + sorbitol	+	+	+	Blancas, brillantes, redondas en todos los casos
MRS + sorbitol + pH 5.4	-	+	+	<i>L. bulgaricus</i> : Planas, bordes indefinidos, blancas translúcidas y opacas <i>L. acidophilus</i> : Convexas, circulares, puntiformes
M17	+	-	-	Redondas, blancas, lisas y brillantes,

S.t. = *S. thermophilus*; *L.b.* = *L. bulgaricus*; *L.a.* = *L. acidophilus*

thermophilus y de *L. bulgaricus*. Un estudio sobre la calidad microbiológica de yogurts portugueses, cuantifica las bacterias del *L. bulgaricus* con este mismo medio y bajo las mismas condiciones (Nogueira *et al.*, 1998).

Por otra parte, en este mismo medio aunque con el pH ajustado a 4.58, en condiciones anaeróbicas y a 45 °C por 72 h se reportan colonias del mismo tamaño, blancas, irregulares y esponjosas para el *L. bulgaricus* y colonias opacas, pequeñas (0.1 a 0.5 mm) y parduscas para el *S. thermophilus* a 37 °C por 72 h (Tharmaraj y Shah, 2003).

M17

Este medio resultó excelente con un pH controlado a 7.2 y bajo condiciones anaeróbicas para la reproducción de *S. thermophilus*, siendo el único microorganismo capaz de crecer en este medio. Las colonias de *S. thermophilus* fueron redondas, blancas, lisas y brillantes, por lo que este medio se utilizó para diferenciar las bacterias cuando crecen puras o en cualquiera de las asociaciones. Los datos obtenidos (Cuadro 1) concuerdan con los reportados por Birollo *et al.* (2000), aunque en su caso, obtuvo colonias blancas opalescentes, circulares y con bordes bien definidos, mientras que Tharmaraj y Shah (2003), reportan colonias redondas y amarillentas en condiciones aeróbicas a 37 °C por 24 h. Otros estudios han demostrado la especificidad de este medio para la cuantificación y diferenciación del *S. thermophilus* (Shah, 2000).

Dave and Shah (1996), reportan que para la diferenciación del *S. thermophilus*, el Agar *Streptococcus thermophilus* muestra mejores resultados con presencia de colonias bien desarrolladas y amarillas y que el *L. bulgaricus*, o bien no crece, o forma colonias delgadas, blancas, y esponjosas.

Aunque estos resultados aclaran el papel de los medios de cultivo para la caracterización e identificación de las bacterias lácticas en leche fermentada, es preciso evaluar la viabilidad de estas bacterias en productos fermentados comerciales, con la finalidad de determinar si los productos fermentados cumplen con las normas internacionales sobre el número y viabilidad de colonias bacterianas.

Conclusiones

El desarrollo de productos lácteos conteniendo bacterias probióticas es un tema de consecuencias industriales y comerciales importantes para la industria alimentaria. La incorporación de estas bacterias a los productos hace difícil su identificación y cuantificación.

Cuando crecen en cultivos mixtos *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, el M17 es el medio de cultivo indicado para cuantificar y diferenciar *S. thermophilus*

de los lactobacilos, presentando colonias redondas, blancas, lisas y brillantes. El medio MRS con sorbitol y pH de 5.4, permite diferenciar las colonias de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* puesto que *L. bulgaricus* crecen en colonias de aproximadamente 1.0 mm de diámetro, planas, con bordes indefinidos, de color blanco translúcido y opacas, mientras que las colonias de *L. acidophilus* son convexas, de forma circular, puntiformes y mas pequeñas que las anteriores.

Estos datos aportan evidencia sobre los tipos de medios recomendados para la cuantificación y caracterización de las bacterias *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, utilizadas como cultivos mixtos en leches fermentadas.

Literatura Citada

- Birollo, G. A., J. A. Reinheimer y C. G. Vinderola. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Res. Int.* 33: 799-805.
- Borchers, A. T., C. L. Keen y M. E. Gershwin. 2002. The influence of yogurt/*Lactobacillus* on the innate and acquired immune response. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.* 22: 207-230.
- Cachon, R., S. Jeanson, M. Aldarf y C. Divies. 2002. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait.* 82: 281-288.
- Chick, H., H. S. Shin y Z. Ustunol. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J. Food Sci.* 66: 478-481.
- Corich, V., A. Mattiazzi, E. Soldati, A. Carraro y A. Giacomini. 2004. Relationship between chemical and microbiological composition of commercial plain yogurts. *Ital. J. Food Sci.* 16: 221-233.
- Courtin, P. y F. Rul. 2003. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait.* 84: 125-134.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* 79: 1529-1536.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.* 81: 2804-2816.
- Davidson, R. H., S. E. Duncan, C. R. Hackney, W. N. Eigel y J. W. Boling. 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J. Dairy Sci.* 83: 666-673.

- Davis, J. G., T. R. Ashton y M. McCaskill. 1971. Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts. *Dairy Ind.* 36: 569-573.
- DeNoni, I., L. Pellegrino y F. Masotti. 2004. Survey of selected chemical and microbiological characteristics of (plain or sweetened) natural yoghurts from the Italian market. *Lait.* 84: 421-433.
- Diario Oficial de la Federación. 1995. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
- Djouzi, Z., C. Andrieux, M. Degovry, C. Bouley y O. Szylit. 1997. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2260-2266.
- International IDF Standard 117. 1983. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117.
- International IDF Standard 117A. 1988. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117A.
- Marshall, R. T. 1992. Standard Methods for the examination of Dairy Products. Washington, D. C., American Public Health Association.
- Nogueira, C., H. Albano, P. Gibbs y P. Teixeira. 1998. Microbiological quality of portuguese yogurts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 19-21.
- Radke-Mitchell, L. C. y W. E. Sandine. 1986. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 69: 2558-2568.
- Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83: 894-907.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.* 86: 2288-2296.
- Vinderola, C. G., N. Bailo y J. A. Reinheimer. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res. Int.* 33: 97-102.
- Vinderola, C. G., P. Mocchiutti y J. A. Reinheimer. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* 85: 721-729.
- Vinderola, C. G., W. Rosello, D. Ghilberto y J. A. Reinheimer. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 1905-1911.