

UTILIZACION DEL MEDIO MRS-S EN EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS LACTICAS MESOFILAS EN LECHE DE CABRA

Aurora Peña Rueda*

Celia L. de Luces Fortes F.**

COMPENDIO

Con el fin de evaluar el MRS-S (Sorbato al 0.10%) en el aislamiento de bacterias lácticas se cultivaron muestras de leche de cabra cruda en MRS-S y PCA en profundidad y se incubaron en aerobiósia a 32°C durante 48 horas. Los cocos gram positivos, catalasa negativos que crecieron en MRS-S se aislaron y sometieron a caracterización preliminar a través del crecimiento en agar MRS-S, MRS-T (tetraciclina 0.20 µg/ml), N-L (bacterias aromáticas), reducción de la leche tornasolada a 40 y 21°C y crecimiento a 45 y 10°C. Las cepas seleccionadas se sometieron a caracterización fisiológica y Bioquímica. El medio MRS-S mostró ser efectivo con un porcentaje de inhibición de la flora indeseable del 86.56 %, y adecuado por el aislamiento de *Lactococcus*. De acuerdo con los perfiles taxonómicos se consiguió aislar de un total de 156 colonias dos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y un *Lactococcus lactis* biovar *diacetilactis*.

ABSTRACT

With the objective of evaluating the MRS-S (0.10% of sorbate) in the isolation of lactic bacteria samples of raw goat milk were cultivated in MRS-S and PCA in deep and incubated in aerobic conditions for 48 hours at 32°C. Gram positive coccus, negative catalase which grew in MRS-S were isolated and preliminarily characterized through the growing process in agar MRS-S, MRS-T (0.20µg/ml tetracycline), N-L (aromatic bacteria), litmus milk reduction at 40 and 21°C and growing at 45 and 10°C. Selected strains, were subject to the physiological and biochemical characterization. MRS-S media showed to be effective with an 86.56 % of inhibition for undesirable bacteria and adequate for *Lactococcus* isolation. Related to taxonomic profiles from 156 colonies were isolated two *lactococcus lactis* subsp. *lactis* and one *lactococcus lactis* biovar *diacetilactis*.

1. INTRODUCCION

Las bacterias lácticas poseen características metabólicas que se aprovechan para la elaboración de productos fermentados que presentan mejores características nutricionales y organolépticas, como en nuestro medio no se dispone de proveedores nacionales, se hace necesario la formación de bancos de cepas lácticas aisladas de tal forma que se logre disminuir la importación de dichos cultivos.

Para su aislamiento se han desarrollado variedad de medios de cultivo los cuales deben tener la capacidad de promover el máximo desarrollo de las bacterias deseadas y de inhibir

el mayor número de microorganismos extraños. Geraldine et al (1979) encontraron adecuado para el crecimiento de *Lactococcus* el medio MRS (De Man, Rogosa y Sharp) desarrollado para *Lactobacillus*. Antunes (1985) modificó el ATP (Evans y Niven) mediante la adición de 0.10% de sorbato de potasio como agente selectivo y furtato (1988) aisló bacterias lácticas en MRS-S (MRS-sorbato) con buenos resultados.

Frente a la anterior necesidad se evaluó el uso de MRS-S (MRS + sorbato de potasio al 0.10%) en el aislamiento de bacterias en leche de cabra con posibilidad de utilización en la composición de cultivos para la producción de derivados lácteos.

* Zoot., M.Sc. Profesor Asistente Dpto. de Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 237 Palmira

** Ph.D. Profesor Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Federal de Viçosa-MG. Brasil

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En el trabajo se utilizaron muestras de leche de cabra (*Capra hircus*) recolectadas en la planta piloto de la Universidad Federal de Viçosa-Brasil.

Las cepas de bacterias se aislaron por el método de dilución en placa utilizando el medio agar MRS-S (MRS + sorbato de potasio al 0.10%) y simultáneamente las muestras se sembraron en profundidad en PCA (Plata Count Agar) con la finalidad de verificar el efecto selectivo del sorbato. Se seleccionaron las placas en MRS-S con recuentos próximos a 30 colonias; todas estas se estriaron en agar MRS-S e incubaron a 21°C entre 24 y 48 horas, obteniéndose 79 cocos gram positivos, catalasa negativos los cuales se sometieron a una caracterización inicial (Cuadro 1). A través del crecimiento en agar MRS-S, MRS-T (MRS adicionado de tetraciclina 0.20 μ g/ml) y N-L (Pack *et al.*, 1968), reducción de la leche tornasolada a 40 y 21°C, crecimiento a 45 y 10°C (Sharpe y Friyer, 1981) y el test de creatina (Collins, 1962). Paralelamente al aislamiento en leche de cabra se realizó el aislamiento de las bacterias de un cultivo mixto BD (contiene cepas seleccionadas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *cremoris* y biovar *diacetilactis* como también *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*). Los microorganismos que pasaron esta primera fase, fueron sometidos a caracterización fisiológica y bioquímica de acuerdo con los criterios de: Abdel and Gibson (1948); Manual Bergey's (Buchanan and Gibbon, 1974) y Savoy de Biori *et al.* (1986).

Las cepas de bacterias lácticas aisladas se almacenaron en tubos de ensayo con leche en polvo reconstituida (LPR) al 10% y esterilizada e inoculada con alicuotas de 1% y congeladas inmediatamente (Foster, 1962) y mantenidas así hasta su utilización posterior.

Los resultados para determinar el efecto inhibidor del sorbato se analizaron en términos de media geométrica, desviación estándar y

porcentaje. Las demás observaciones se evaluaron en forma cuantitativa y cualitativa de acuerdo con la metodología propuesta y con los criterios establecidos para identificación de bacterias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando que el recuento total en PCA expresa el número de microorganismos en las muestras de leche cruda la utilización del medio MRS-S (Cuadro 2) mostró ser eficaz en la eliminación de la flora indeseable, con un porcentaje de inhibición del 86.56% y un coeficiente de variación del 3%.

De cinco muestreos realizados a través del tiempo se aislaron 156 colonias (Cuadro 3) con predominancia de cocos gram positivos, 95.5%, bacilos, 2.56%, y levaduras, 1.28%; corroborando los resultados de Emmard y Vaugh (1952) que indican el efecto negativo de los sorbatos sobre los lactobacilos. Cerca del 50% (79 colonias) fueron catalasa negativos, ofreciendo el método de la probabilidad de aislar bacterias lácticas con características de coco positivos, catalasa negativos.

Solo seis de las 79 colonias sometidas al test inicial pasaron a la fase de caracterización fisiológica y bioquímica (Cuadros 4 y 5) obteniéndose dos cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y una de *Lactococcus lactis* biovar *diacetilactis* y denominadas 4C7, 5C7 y 6C2. En virtud del crecimiento atípico en pH 9.6 y a la termorresistencia a 63°C/30 minutos los aislados 5C3, 6C1 y 6C3 se identificaron como *Lactococcus* sp.

Aunque en el presente trabajo no se aislaron bacterias lácticas caracterizadas como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, la ausencia de estas especies en las muestras analizadas, pudo deberse al hecho de encontrarse en proporción menores lo cual hizo difícil su aislamiento, debido principalmente a las diluciones practicadas para obtener recuentos próximos a 30 colonias según la metodología

Cuadro 1

Clave para la caracterización inicial de los cocos lácticos*

	<u>Lact. lactis</u> subsp. <u>lactis</u>	<u>Lact. lactis</u> subsp. <u>cremoris</u>	<u>Lact. lactis</u> biovar <u>diacetilactis</u>	<u>Leuconostoc</u> <u>mesenteroides</u> subsp. <u>cremoris</u>
Crecimiento en Agar:				
MRS-S	+	+	+	+
MRS-T	-	-	-	-
N-L	-	-	+	+
Crecimiento a:				
45°C	-	-	-	-
10°C	+	+	+	+
Reducción o cuagulación de la leche tornasolada a:				
21°C	+	+	+	+
40°C	+	-	-	-
Test de la creatina	-	-	+	+

* Propuesta por los autores

a: Adicionado de ácido

Cuadro 2

Recuento total en PCA y MRS-S de muestras de leche de cabra cruda e porcentaje de inhibición

Muestra	UFC/ml en PCA	UFC/ml en MRS-S	% inhibición
01	3.5×10^4	3.4×10^3	90.29
02	5.9×10^4	7.9×10^3	88.61
03	2.8×10^4	4.0×10^3	85.71
04	1.8×10^4	2.6×10^3	83.33
05	1.7×10^4	2.6×10^3	84.75
Media	3.1×10^4	4.2×10^3	86.56
Desviación Standar	$\pm 1.7 \times 10^4$	$\pm 2.1 \times 10^3$	± 2.86

Cuadro 3

Número de colonias aisladas en MRS-S y algunas de sus características

Aislamiento	Colonias Aisladas	Gram/Morfología					
		Catalasa		Cocos		Bacilos	Levaduras
		(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
01	39	28	6	32	0	2	0
02	32	32	0	32	0	0	0
03	32	02	30	30	0	0	0
04	30	11	19	27	1	2	0
05	28	06	22	28	0	0	0
Total	156	79.0	77.0	149	1	4	0
%	100	50.6	49.3	95.5	0.64	2.56	1.28

Cuadro 4

Caracterización de cultivos del Género Lactococcus y Leuconostoc

Especies <u>Lactococcus</u> y <u>Leuconostoc</u>	Origen	Crecimiento en							
		NaCl				pH		Resistencia	
		4 %		6.5 %		1	2	1	2
		1	2	1	2				
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>lactis</u> 4C ₇	L. de Cabra	+	(c)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lactococcus</u> sp 5C ₃	L. de Cabra	+		+		+		+	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>Lactis</u> 5C ₇	L. de Cabra	+	(c)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lactococcus</u> sp. 6C ₁	L. de Cabra	+		+		+		+	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> biovar <u>diacetilactis</u> 6C ₂	L. de Cabra	+	(+)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lactococcus</u> sp. 6C ₃	L. de Cabra	+		+		+		+	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>lactis</u> 2BD2	BD Comercial	+	(+)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp <u>lactis</u> 2BD4	BD Comercial	+	-	-		-		-	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>cremoris</u> 3BD1	BD Comercial	-	(c)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>cremoris</u> 3BD3	BD Comercial	-	(c)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>lactis</u> V1	Comercial	-	(c)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp. <u>lactis</u> V2	Comercial	+	(+)	-	(c)	-	(c)	-	(a)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> biovar <u>diacetil</u> V3	Comercial	+	(+)	-	(b)	-	(b)	-	(a)
<u>Leuc.</u> <u>mesenteroides</u> subsp. <u>cremoris</u> 2BD ₂₅	BD Comercial	-	(c)	-	(b)	-	(b)	-	(a)

1: Resultado obtenido

2: Citado en la literatura para la especie

+: Crecimiento o reacción positiva

-: Sin crecimiento o reacción negativa

a: Abd-el and Gibson (1948)

b: Buchanan and Gibbons (1974)

c: Savoy de Biori et al (1986)

Cuadro 5

Caracterización de cultivos del Género Lactococcus y Leuconostoc

Especies de	Hidrolisis	Fermentación									
		de la Arginina		Maltosa		Sorbitol		Manitol		Trealosa	
		Origen	1	2	1	2	1	2	1	2	1
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>lactis</u> 4C ₇	L. de Cabra	+	(b)	+	(f)	f	(e)	+	(d)	+	(d)
<u>Lactococcus</u> sp											
5C ₃	L. de Cabra	+		+		f		+		+	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>Lactis</u> 5C ₇	L. de Cabra	+	(b)	+	(+)	f	(e)	+	(d)	+	(d)
<u>Lactococcus</u> sp.											
6C ₁	L. de Cabra	+	+	+		f		+		+	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> biovar											
<u>diacetilactis</u> 6C ₂	L. de Cabra	+	(e)	+	(f)	f	(e)	f	(f)	+	(d)
<u>Lactococcus</u> sp.											
6C ₃	L. de Cabra	+		+		f		+		+	
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>lactis</u> 2BD2	BD Comercial	+	(e)	+	(b)	f	(e)	-	(d)	-	(d)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>lactis</u> 2BD4	BD Comercial	+	(b)	+	(b)	f		-	(d)	-	(d)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>cremoris</u> 3BD1	BD Comercial	-	(b)	+	(+)	-	(e)	-	(w)	-	(d)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>cremoris</u> 3BD3	BD Comercial	-	(b)	d	(e)	-	(e)	-	(w)	w	(d)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>lactis</u> V1	Comercial	-	(b)	d	(e)	-	(e)	-	(w)	-	(d)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> subsp.											
<u>lactis</u> V2	Comercial	+	(b)	-	(e)	-	(e)	+	(d)	+	(d)
<u>Lact.</u> <u>lactis</u> biovar											
<u>diacetil</u> V3	Comercial	+	(f)	-	(f)	-	(e)	-	(d)	+	(d)
<u>Leuc.</u> <u>mesenteroides</u>											
subsp. <u>cremoris</u>											
2BD ₂₅	BD Comercial	-	(e)	+	(b)	-	(e)	-	(b)	-	(b)

1: Resultado obtenido

2: Citado en la literatura para la especie

+: Crecimiento o reacción positiva

-: Sin crecimiento o reacción negativa

w: Reacción débil o lenta

d: Variable (+ para una faja entre 11 y 69%)

p: débil

a: Abd-el and Gibson (1948)

b: Buchanan and Gibbons (1974)

c: Savoy de Biori et al (1986)

adoptada.

Las dificultades encontradas en el aislamiento de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* son registradas en la literatura por King and kaburger (1970), quienes con previo enriquecimiento de la leche tornasolada lograron aislar mayor proporción de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* que de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en muestras de diversos orígenes. De la misma forma Savoy de Biori *et al* (1986), obtuvieron similares resultados utilizando leche cruda y suerofermento.

La mejor definición del comportamiento del medio MRS-S en el aislamiento de bacterias lácticas puede conseguirse a través del estudio en el tiempo con mayor número de muestras y diferentes materias primas.

Teniendo en cuenta que las cepas aisladas correspondieron a un ambiente particular, se recomienda estudiar su comportamiento para determinar sus posibilidades tecnológicas en la composición de cultivos lácteos mesófilos.

4. CONCLUSIONES

- 4.1. El medio MRS-S inhibió la fibra indeseable en 86.56%, siendo adecuado para el aislamiento de *Lactococcus*.
- 4.2. Se encontró predominancia de cocos gram positivos.
- 4.3. El método ofrece una probabilidad del 50% de aislar bacterias con características de coco gram positivo, catalasa negativo.

5. BIBLIOGRAFIA

1. ABD-EL MALEK and GIBSON, G. Studies in the bacteriology of milk. The streptococci milk. J. Dairy Res. 15: 223-48, 1948.
2. ANTUNES, L. A. Características da flora láctica do leite cru. São Paulo, Campinas, UNICAMP, 1985. 113 p. (Tese D.S.).
3. BUCHANAN, R. E. and GIBBON, N. E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1974. s.n.p.
4. COLLINS, E. B. Culture identity and selection. Symposium of lactic starters cultures. J. Dairy Sci. 45 (10): 1261-6, 1962.
5. EMARD, L. O. and VAUGH, H. R. Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic bacteria and clostridia. J. Bacteriol. 63: 487-94. 1952.
6. FOSTER, E. M. Culture preservation. Symposium on lactic starter cultures. J. Dairy Sci, 45(10): 1290-4, 1962.
7. FURTADO, M. M. Isolamento de *Leuconostoc* *cremoris* de leite de vaca "in natura". In: Congreso Nacional de Lacticinios, 10, Belo Horizonte, 1988. Resumos s.n.p.
8. GERALDINI, A. M. *et al*. Caracterização de bacterias lácticas em alimentos. I. Avaliação de meios sólidos para contagem de culturas puras. Bol. ITAL, Campinas, 16(1): 53-64, Jan/Mar. 1979.
9. KING, S. N. and KOBURGER, A. J. Characterization of some group N streptococci. J. Dairy Sci. 53(4): 403-409. 1970.
10. MARSHALL V. M. Fermented milk and their future trend I. Microbiological Aspect. J. Dairy Res. 54: 559-574. 1987.
11. PACK, Y. M. *et al*. Effect of temperature on growth and diacetyl production by aroma bacteria in single - and mixed strain lactic culture. J. Dairy Sci., 69(1): 32-7, 1986.
12. SAVOY DE BIORI, G. *et al*. Aislamiento de bacterias lácticas a partir de leche y suerofermento utilizados en elaboración de queso Tafí. Rev. Lat-amer. Microbiol. 28:325-9. 1986.
13. SHARPE, M. E. and FRIYER, T. F. Identification of the lactic acid bacteria. In: GIBB, B. M. and SKINNER, F. A. Identification methods for microbiologist. London, Academic Press, 1981. Part. A. 166 p.