

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE LAS LECHEs SOMETIDAS A LAS PRUEBAS DE LACTO FERMENTACION, LACTOCOAGULACION Y LACTOAGAR

I: LOS DILUENTES ¹

Por MARIO LOPEZ LOZANO ²

RESUMEN. — Es una contribución al estudio de la flora microbiana de las pruebas de lactofermentación, lactocoagulación y lactoagar. El objeto principal de esta primera parte, fue encontrar una solución salina capaz de disolver el producto en cualquiera de las tres fermentaciones indicadas. Se han ensayado varias soluciones salinas, e incluso el agua destilada estéril. El buffer de pH 7,2, preparado con soluciones de ácido cítrico 0,1 mol y fosfato disódico 0,2 mol, aportó los mejores resultados y es el que más se adapta a la técnica establecida, por cuyas razones la adoptamos en la continuación de este trabajo.

SUMMARY. — **Bacteriological study of milk submitted to the lactofermentation, lactocoagulation and lactoagar tests. I: The diluents, by MARIO LÓPEZ LOZANO.** — This is a contribution to the microbiological study of the lactofermentation, lactocoagulation and lactoagar tests in milk. In this first part, the main objective point was to find an able saline solution to dissolve any one of the three indicated tests. Various saline solutions were tried, the sterile distillate water included. The buffer 7,2 pH, prepared with citric acid 0,1 mol and bisodic phosphate 0,2 mol solutions, caused the best results and is the most adaptable to the established technique, the reasons why we adopt it in the following part of this work.

¹ Trabajo realizado en uso de la beca otorgada por la Facultad de Agronomía a Profesionales iniciados en la Investigación y Docencia, Ordenanza N° 6-Régimen de Becas de la Universidad Nacional de La Plata — y en los Laboratorios de la Cátedra de Industrias Agrícolas de Lechería de la misma facultad. Aceptado para su publicación el 16 de junio de 1971.

² Ingeniero agrónomo, del Cuerpo Docente de la Cátedra de Industrias Agrícolas de Lechería. El autor fue supervisado por el Profesor Titular de la citada Cátedra Ing. Agrón. Julio L. Mulvanj.

I. INTRODUCCION

La prueba de lactofermentación es muy usada para conocer la calidad de las leches destinadas a la fabricación de quesos. En algunas fábricas prefieren la prueba de lactocoagulación o bien la modificada que se conoce como prueba de Wisconsin. De acuerdo con las conclusiones de un trabajo anterior (10), recomendamos realizar simultáneamente las pruebas de lactocoagulación y lactoagar.

Estas pruebas constituyen un modo de visualizar la calidad bacteriana de las leches destinadas a la industria quesera, independientemente de su capacidad para coagular con cuajo (11). Desde aquel punto de vista nos ha parecido conveniente realizar el estudio bacteriológico de las pruebas de lactofermentación, lactocoagulación y lactoagar y su posible influencia en la técnica quesera.

Para encararlo, en primer lugar se debe encontrar un diluyente común, capaz de disolver, indistintamente, el producto final de las muestras ensayadas con las tres pruebas a la vez; proseguir luego con el recuento aproximado de algunos grupos microbianos presentes en las fermentaciones citadas y con posterioridad su reconocimiento específico.

II. MATERIAL Y METODO

A) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras a diluir, originadas en las pruebas de lactofermentación, lactocoagulación y lactoagar, fueron preparadas según la técnica utilizada en un trabajo anterior (10), en la que se han introducido las siguientes variantes: *a*) medir 10 ml de leche en lugar de 15 ml, a los efectos de llevar a diluciones mayores con aproximación y poder expresar los resultados en mililitros, y *b*) utilizar tubos de ensayo de 15 mm x 180 mm con capacidad útil de 25 ml, y sus respectivos tapones de goma. Los porcentajes de cuajo y agar agar a usar se mantienen iguales.

B) SOLUBILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. *Por medios mecánicos*

La dilución de las muestras por medios mecánicos (desmenuzador Atomix), como la utilizada por Robertson (12), o las formas similares de desmenuzamiento, adolecen de algunos defectos muy importantes, que para nosotros son dignos de tenerse en cuenta. En efecto, la excesiva separación de la materia grasa del resto de los componentes a causa del tratamiento, el hecho de manipular varias muestras a la vez, el tiempo transcurrido hasta la siembra definitiva y la de expresar los resultados por milímetros de muestra, fueron motivos suficientes y razonables para buscar otras formas de dilución.

2. *Con agua*

Dado que la máxima preocupación fue encontrar un diluyente común con propiedades generales y capacidad disolvente tal que actuara sobre las tres pruebas, nada mejor que comenzar con este elemento universal. Hammer (7) y Tanner (14), han recomendado agua destilada estéril como diluyente de 1 g de queso para su posterior estudio bacteriano. Se ha elegido dicho producto lácteo, como punto de referencia bibliográfica, por haber similitud con respecto a las primeras etapas referidas a la emulsificación y dilución del material obtenido por lactocoagulación, lactofermentación y, eventualmente, lactoagar. Halbinger (6), ha usado la técnica de dilución en agua, con resultados satisfactorios, en su trabajo sobre la microflora de maduración en queso tipo Cuartirolo. Contrariamente, usando el mismo elemento, obteníamos resultados cambiantes, pues las diluciones no pasaban de ser grumosas, dando sedimentos de poca solubilidad; además, presentaba el inconveniente de separarse la materia grasa, en particular en la prueba de lactocoagulación.

La diferencia observada probablemente tenga origen en el material, de sólo 24 horas de preparación, con menos elementos solubles en agua que los quesos madurados; además, la salazón contribuye a la solubilización de proteínas.

3. Con soluciones salinas

a) Solución fisiológica. — Esta solución fue preparada siguiendo las indicaciones de Girard (5), o sea: 9 g de cloruro de sodio diluido en 1000 ml de agua destilada. Utilizándolo como diluyente de las muestras, los resultados no fueron mejores que los citados más arriba.

b) Otras soluciones. — La diversidad de trabajos publicados, y el número elevado de éstos en relación con el tema que nos ocupa, hizo posible que se eligieran algunos otros diluyentes. Pero sólo trataremos los que hemos ensayado.

La solución de citrato de sodio al 2 % fue propuesta por Hammer (8), para diluir las muestras de quesos con el objeto de llevar a cabo su estudio bacteriológico. Más recientemente, Ducastelle y Lenoir (3) la utilizaron en un estudio sobre la microflora del queso tipo Saint-Paulin. Hemos utilizado esta solución, observando que en lactofermentación y lactocoagulación hay separación de materia grasa, siendo más pronunciado en esta última. En ambos casos aparecen sedimentaciones caseosas. En la prueba de lactoagar la emulsión se muestra uniforme y permanente.

Rossell y Dos Santos (13) recomiendan, entre otras, la solución de carbonato de sodio N/10. Los resultados que hemos obtenido con esta solución se aproximan a los propósitos perseguidos, sin llegar a ser la óptima. Después de reposo durante veinte minutos, en las condiciones que más adelante explicaremos, la dilución en lactofermentación y lactocoagulación presentó sedimentaciones, aun cuando la separación de la grasa era mínima. En lactoagar, las condiciones buscadas son constantes.

Otro de los diluyentes recomendados por los mismos autores, es una mezcla de citrato de sodio al 2 % y solución fisiológica. Sobre 1 g de muestra se agrega 1 ml de solución de citrato y 8 ml de la solución fisiológica. La recomienda con preferencia porque da lugar a una emulsión perfecta, pero destacan que se deben tomar precauciones, dado que es propensa a las contaminaciones.

Devoyod y Bret (2) han usado el citrato de sodio estéril en la proporción de 0,1 g para 1 g de queso y 9 ml de solución Ringer $\frac{1}{4}$. La solución de Ringer se prepara de la siguiente manera (1): cloruro de sodio 9 g, cloruro de potasio 0,42 g, cloruro de calcio 0,24 g, bicarbonato de sodio 0,20 g y agua destilada 1000 ml. Es de observar que, en estas técnicas, la solución fisiológica y la solución Ringer

son meros diluentes, estando representado el emulsionante por el citrato de sodio.

Las muestras en estudio sometidas a la acción de estas soluciones presentaban anomalías como las mencionadas más arriba, en mayor o menor grado, excepto en la prueba de lactoagar.

4. *Con solución Buffer*

Werner de García *et al.* (15), en un trabajo sobre microbiología de productos cárnicos y derivados, han utilizado como diluyente el fosfato buffer para emulsionar un sustrato de embutidos. Kordatzki (9) en su publicación sobre pH, ha establecido una escala de sus valores que van de 2,2 a 8,0 logrados en base a soluciones de ácido cítrico 0,1 mol y fosfato disódico 0,2 mol.

Preparadas las soluciones madre y mezcladas en proporciones progresivas una, y a la inversa la otra, se hallaron las siguientes mezclas buffer: 6,6, 6,8, 7,0 y 7,2 de pH, todas corregidas y controladas con un potenciómetro. Los valores menores y mayores a los consignados, posiblemente acarrear trastornos de orden físico-químico sobre los componentes naturales y bacteriológicos de las muestras preparadas (1). Las cantidades requeridas de soluciones madre para preparar la mezcla buffer, y las necesidades de uso en volúmenes mayores, motivaron que se eligiera la técnica recomendada por FAO (4).

III. RESULTADOS DE LA DILUCION

Los resultados que se han obtenido, al usar como emulsionante el sistema buffer, se consideran altamente satisfactorios principalmente con el pH 7,2. Con ello se observa que la emulsión es óptima, no hay separación de la materia grasa en ninguna de las muestras tratadas ni aparecen sedimentaciones después de los veinte minutos de reposo; la mezcla buffer-muestra, en partes iguales, se mantenía entre los límites de pH 6,4 y 6,9, que consideramos adecuados para trabajos de bacteriología lechera. Por estas razones, la adoptamos como diluyente común de las tres pruebas en estudio y es el que más se adapta a la técnica siguiente: introduciendo una varilla de vidrio estéril, en el tubo donde se han realizado las respectivas fermentaciones, se tritura el contenido realizando movimientos circulares, presionando a la vez contra la pared y que con el agregado del emulsionante se logra un desmenuzamiento parcial.

En un primer paso se deben agregar 5 ml del diluyente estéril, medidos con pipeta también estéril. Logrado el desmenuzamiento parcial se deben agregar los 5 ml restantes, tratando de hacer escurrir por sobre la varilla que se ha de retirar. La muestra más el emulsionante harán un total de aproximadamente 20 ml. Colocado su respectivo tapón de goma, se somete el contenido del tubo a periódicas agitaciones hasta observar una completa emulsión en un tiempo no mayor de 10 minutos.

De esta manera se trabaja muy cerca de la llama del mechero, disminuyendo así los inconvenientes que se presentan si se utilizara un mortero para triturar las muestras.

IV. CONCLUSIONES

1ª La mayoría de los diluentes ensayados en muestras con lactoagar no presentan dificultades licuescentes. El agar-agar agregado a la leche favorecería la acción de aquellos actuando como estabilizante de naturaleza orgánica.

2ª La insolubilidad de las muestras de leche en la prueba de lactofermentación es manifiesta en agua y solución fisiológica, disminuyendo sensiblemente el inconveniente en citratos y carbonatos.

3ª Debido a la compleja composición químico-física de las muestras en estado de fosfoparacaseinato de calcio en la prueba de lacto-coagulación, los inconvenientes de solubilidad y dispersibilidad fueron muy acentuados con la mayoría de las sustancias salinas ensayadas. No obstante, el sistema fosfato-citrato de pH 7,2 satisface plenamente nuestros propósitos, a la vez que encuadra a la mezcla final entre los límites de pH 6,4 a 6,9 considerados satisfactorios por la naturaleza del trabajo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. DAVIS, J. C. (1955). *A Dictionary of Dairying*. 2º Ed. Leonard Hill Limited, London.
2. DEVOYOD, J. J. et G. BRET. (1966). *Evolution de la Flore Microbienne au cours de la Fabrication et de l'affinage du Fromage de Roquefort*. XVII Int. Dairy Congress, Sect. D : 2, p. 585-594.
3. DUCASTELLE, A. et J. LENOIR. (1965). *Contribution à l'Étude de la Flore Microbienne e du Fromage de Tipe Saint-Paulin*. Le Lait, 45 : 371.
4. FAO. (1962). *Specification for Identity and Purity of Food Additives*. Vol. I. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma.

5. GIRARD, H. et R. ROUGIEUX. (1958). *Techniques de Microbiologie Agricole*. Ed. Dunod. Paris.
6. HALBINGER, R. (1956). *Determinación de los Agentes Maduradores de los Quesos de Pasta Blanda (Tipo Quartirolo)*. Rev. Asoc. Argentina de Dietología, 14, n° 53-56.
7. HAMMER, B. W. (1938). *Dairy Bacteriology*. 2° Ed. John Welly Sons, New York.
8. — (1948). *Dairy Bacteriology*. 3° Ed. John Welly Sons, New York.
9. KORDATZKI, W. (1956). *Manual para la Medida Práctica del pH*. 2° Ed. Manuel Marín y Cía, Barcelona.
10. LÓPEZ LOZANO, M. (1967). *Lactofermentación, Lactocoagulación y Lactoagar como Medio para Identificar la Aptitud Quesera de la Leche*. Rev. Fac. Agronomía (3° ép.) 43 : 125-135, La Plata.
11. MOCQUOT, G., C. ALAIS et R. CHEVALIER. (1954). *Étude sur les Défauts de Coagulation du Lait par la Présure*. Ann. Tech. Agri. 3 (1), 1-49.
12. ROBERTSON, P. S. (1960). *Methods for Investigating the Bacteria in Young Cheddar Cheese*. J. Dairy Res. 27 : 1-17.
13. ROSELL, J. e I. DOS SANTOS. (1952). *Métodos Analíticos de Laboratorio Lactológico*. Ed. Labor, Barcelona.
14. TANNER, F. W. (1944). *The Microbiology of Foods*. 2° Ed. Garrard Press, Champaign, Illinois.
15. WERNER DE GARCÍA, B., J. MENDEZ DE RIVERO, N. H. ROSELLÓ y E. L. TEIRA. (1967). *Microbiología de las Carnes y Derivados. I: Estudio Microbiológico de Productos Cárnicos Manufacturados*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. Vol. 9, 2-4. p. 43-104, México.