

Un año más y continuando la línea investigadora que se lleva realizando entre los últimos años en La Anunciata Ikastetxea de Donostia nos hemos lanzado a la investigación. Durante el curso 2008-2009 el alumno de 2º bachillerato Endika Arquero se ha planteado realizar un proyecto de investigación sobre las bacterias del ácido láctico y su incidencia en los beneficios que se le atribuyen al yogur y al kéfir.

El primer paso de la investigación fue la recogida y posterior redacción de información acerca de este tipo de bacterias, así como búsqueda de información sobre los lácteos, el kéfir, diferentes procesos de fermentación,... etc.

Para realizar el trabajo experimental se decidió seleccionar una serie de yogures a los que se les realizaría un análisis microbiológico, así como una comparación de sus propiedades físicas con las exigidas por la ley. También se decidió realizar un estudio microbiológico y físico del kéfir, muy conocido pero con poca “publicidad” en nuestra sociedad. Hay que destacar en esta parte la ayuda de una alumna de 2º de bachillerato que se ofreció voluntariamente para ayudar en la realización de las pruebas.

Con todo el estudio realizado se rellenaron las fichas de campo y se empezó a comentar los diferentes resultados.

Finalmente se elaboraron una serie de conclusiones generales que se incluyeron en el trabajo redactado.

1. ESTUDIO DEL YOGUR.

Para realizar el estudio de los yogures *bifidus* y *L.casei* se empezó por la selección de yogures sobre los que se iba a realizar el consumo. Se decidió estudiar seis yogures diferentes, tres enriquecidos con bifidobacterias y tres enriquecidos con *L.casei*.

Cuando se hubieron seleccionado estos yogures se continuó elaborando diferentes disoluciones



FOTO 1. Yogures.

para realizar los cultivos en diferentes agares. Tras realizar algunas pruebas que no valdrían para los resultados finales se llegó a la conclusión que la disolución perfecta para el posterior recuento de unidades formadoras de colonias era la de 10gr/l o la de 10ml/l.

Para realizar esta disolución se pesaban 10 gramos de yogur en condiciones estériles o se medían 10 ml de yogur con pipetas anteriormente esterilizadas y se diluían en 100ml de agua destilada.

Luego se cogían 10ml de esta disolución y se diluían en otros 10 ml, para obtener la concentración deseada.

Se cultivaban 2µl de esta disolución de 10gr/l o 10ml/l y se dejaban cultivando en la incubadora a 37°C en tres diferentes medios de cultivo: MRS Agar, BSM Agar y

MSE Agar. 48 horas después se procedía al recuento de Ufc y la posterior anotación de estos datos en las fichas de laboratorio. También se realizó un estudio de la morfología y genero de los microorganismos del yogur mediante Tinción Gram.

Finalmente se realizaron unos cálculos con los que se hallaban las Ufc/gr

y las Ufc/ml de yogur según fuese sólido o líquido. Después se elaboraron unos gráficos con los que se realizarían los comentarios.



2. ESTUDIO DEL KEFIR.

Este estudio está dividido en dos partes. Primero se estudio el crecimiento de los gránulos del kéfir durante un mes y simultáneamente se realizaron cultivos en Agar TSA y MRS Agar de muestras de leche kefirada recogidas los diferentes días de estudio del kéfir.

Tradicionalmente el kéfir se consigue mediante el mano a mano, por lo que el primer paso era conseguir los gránulos del kéfir. Se busco en diferentes foros de internet para conseguir unos gránulos de esta especie, y frente a la negativa se busco en nuestra población. Se consiguieron los gránulos en



FOTO 4. Medición de los ml de leche kefirada.

la herboristería de al lado del colegio, que nos lo cedió sin necesidad de abonar nada, pero con la condición de devolverle la mitad cuando creciera lo suficiente, para que ella pudiera seguir con la cadena de préstamos y que mucha más gente pudiera gozar de los beneficios de este producto.

Se empezó con el estudio del crecimiento. Para ello se eligió una marca de leche entera con la que se “alimentarían” los gránulos de kéfir durante 30 días. Cada día se anotaría el peso de los gránulos, el volumen de leche kefirada producido y el de leche entera necesario para cubrir los gránulos, y posteriormente analizar el incremento de masa y volumen de leche kefirada producida durante este mes.



FOTO 5. Peso de la masa de kéfir.

Por otro lado se realizó el estudio microbiológico. En este caso también se optó por una disolución de 10gr/l. Tras la siembra en placa de 2 μ l de esta disolución y la posterior incubación de las placas a 37°C durante 24 horas, se procedió a la cuenta de Ufc y la obtención de Ufc/ml.

Para finalizar se recopilaron los datos en gráficos y se realizó el estudio de las conclusiones.

3. PRUEBAS REALIZADAS.

3.1. Medios de cultivo.

Para el posterior recuento de las Ufc se han utilizado diferentes medios de cultivo, unos más selectivos que otros. Algunos de estos medios de cultivo venían preparados pero otros tuvieron que ser preparados en el laboratorio.

Para ello se empezó por esterilizar completamente todo el material a utilizar, es decir, vaso de precipitados, reloj de vidrio, matraz aforado, embudo, agitador y placas de Petri.

Se inicia por pesar los gramos necesarios de preparado, y diluirlos en un litro de agua destilada, calentando y sin dejar de mover. Cuando la solución está completamente diluida



se introduce en un matraz aforado y se esteriliza en el autoclave a la temperatura y tiempo indicados en el envase del preparado. Para finalizar se saca del autoclave, y en condiciones estériles, es decir, al lado del mechero Bunsen, se va introduciendo la disolución en las placas de Petri. Finalmente se dejan enfriar en el laboratorio para que el agar solidifique.

3.1.1. Agar TSA.

TSA Agar es un medio muy rico en nutrientes para uso general en los laboratorios microbiológicos. Apoya el abundante crecimiento de organismos fastidiosos como *neumococos*, *estreptococos*, *Neisseriae*, etc. Contiene dos peptonas ricas como fuentes de nitrógeno, obtenido por hidrólisis enzimática de la caseína y las proteínas de soja. Este medio apoya el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluyendo aerobios y anaerobios fastidiosos.

La peptona de soja también contiene azúcares naturales que promuevan el crecimiento bacteriano.

El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el agar bacteriológico es el agente de solidificación.

Una breve lista de los microorganismos que crecen en este medio son los siguientes: *Streptococcus*, *Neisseria*, *Brucella*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Haemophilus vaginalis*, *Candida*, etc.

Ya que carece de hidratos de carbono es muy útil en el estudio de las reacciones hemolíticas y también en la preparación de agar chocolate.

Si lo desea, los antibióticos pueden ser fácilmente incorporadas, así como otros suplementos o inhibitoria agentes.

3.1.2. MRS Agar.

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de *lactobacilos* y otras bacterias ácido lácticas.

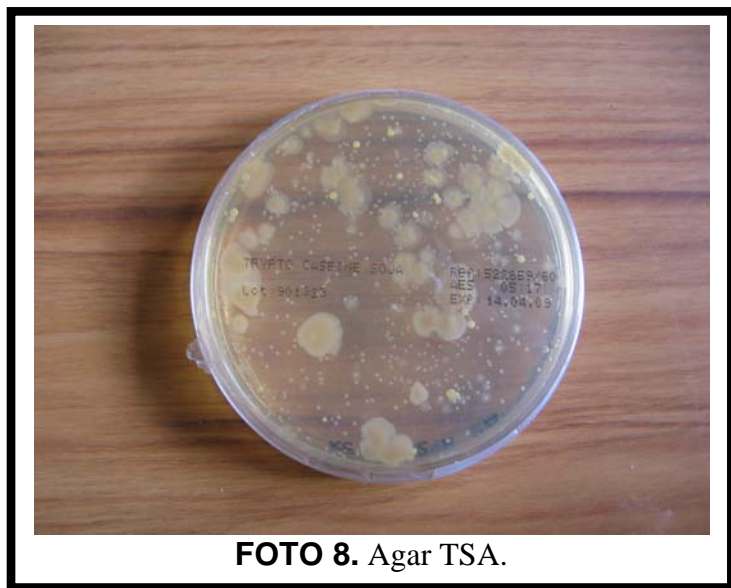


FOTO 8. Agar TSA.

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano.



FOTO 9. Agar MRS.

El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos.

El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias

Gram negativas.

3.1.3. BSM Agar.

Medio selectivo para el aislamiento, la identificación y el recuento de bifidobacterias como *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium Infantis*. El medio se utiliza para el control de calidad en la fabricación de productos lácteos.

Bifidobacterium crecen muy bien en ella, mientras que las cepas *Lactobacillus* y *Streptococcus* son inhibidos.

Bifidobacterium las colonias crecen en 24-48 horas (a veces el crecimiento podría necesitar hasta tres días

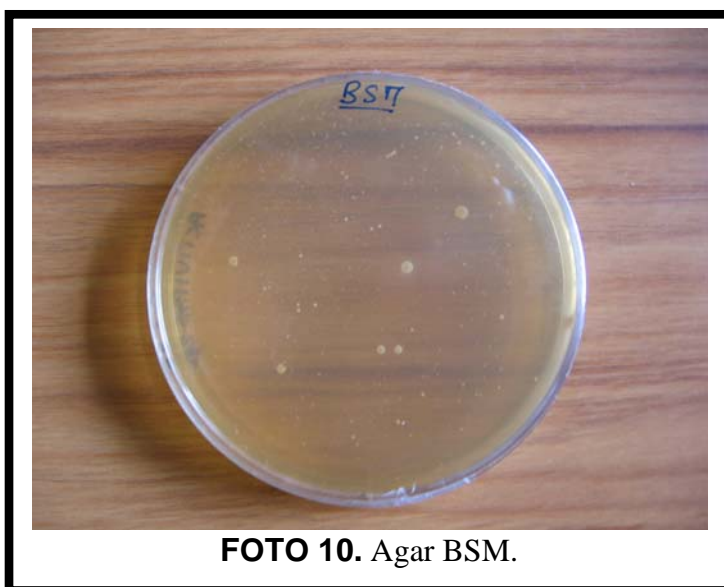


FOTO 10. Agar BSM.

debido a las grandes condiciones selectivas). Las colonias son violeta / marrón.

En el plano industrial de este medio permite un fácil y rápido el control de calidad de yogur con Bifidus y puede se utiliza para controlar el recuento de bacterias Bifidus. Debido a la amplia utilización de Bifidus, Fluka desarrolló el selectivo BSM como un estándar para el control de calidad.

3.1.4. MSE Agar.

El Agar M.S.E. que fue desarrollado por Mayeux, Sandine y Elliker es un medio selectivo especializado para el aislamiento de *leuconostoc* y *lactobacillus*.

Leuconostoc es un género de bacterias del ácido láctico Gram-positivas de la familia Leuconostocaceae. Las especies de *Leuconostoc* tienen generalmente forma de cocoide ovoide y a menudo forman cadenas. Son resistentes a la vancomicina y catalasa-negativos (lo cual los distingue de *Staphylococcus*).

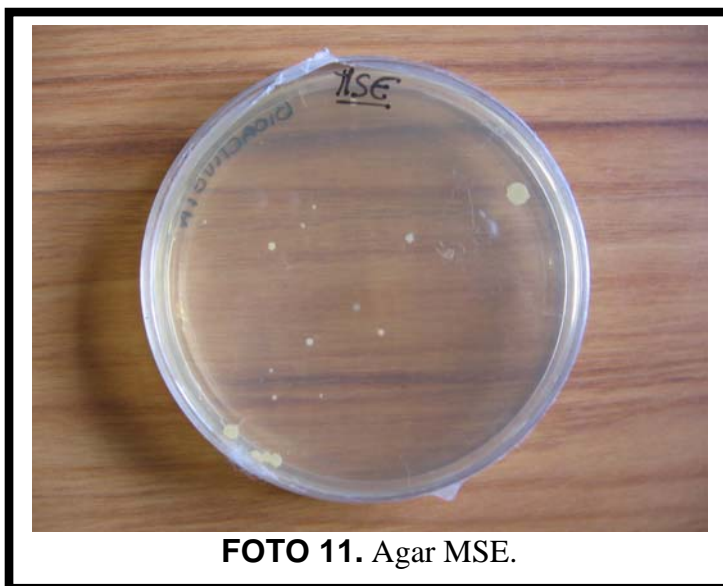


FOTO 11. Agar MSE.

Son heterofermentativos, capaces de producir dextrán a partir de la sacarosa.

Algunas especies son también capaces de producir infecciones a los seres humanos. Debido a que estas enfermedades son raras, los kits de indentificación comerciales estándar a menudo no identifican estos organismos.

Lactobacillus o bacteria del ácido láctico es un género de bacterias Gram positivas anaerobias, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico. Normalmente son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales.

Algunas especies de *lactobacillus* son usadas industrialmente para la producción de yogur y otros alimentos fermentados. Algunas bebidas de yogur contienen *Lactobacillus* como suplemento dietético.

3.2. Tinción Gram.

La tinción de Gram o coloración Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

3.2.1. Protocolo.

- Recoger muestras.
- Hacer el extendido en espiral.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado 3 veces aprox.).

- Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 min. Este tinte (al final del procedimiento) dejará de color morado solo a las bacterias Gram positivas.



- Enjuagar con agua.
- Agregar lugol y esperar 60 segundos.
- Enjuagar con agua.
- Agregar alcohol acetona y esperar 15s.
- Enjuagar con agua.
- Agregar safranina y esperar 1 min Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

3.2.2. Explicación.

El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas).

El lugol está formado por I_2 (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio), el cual está presente para solubilizar el yodo. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I_2 /cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules.

La safranina puede o no utilizarse, no es crucial para la técnica. Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias Gram negativas. Al término del protocolo, las Gram positivas se verán azul-violáceas y las Gram negativas, se verán rosas (si no se hizo la tinción de contraste) o rojas (si se usó, por ejemplo, safranina).

Esta importante coloración diferencial fue descubierta por Hans Christian Gram en 1884. En este método de tinción, la extensión bacteriana se cubre con solución de uno de los colorantes de violeta de metilo, que se deja actuar durante un lapso determinado. Se escurre luego el exceso de violeta de metilo y se añade luego una solución de yodo, que se deja durante el mismo tiempo que la anterior; después se lava el portaobjetos con alcohol hasta que éste no arrastre más colorante. Sigue a tal tratamiento una coloración de contraste, como safranina, fucsina fenicada diluida, pardo Bismarck, pironin B o hasta inclusive verde de malaquita.

Algunos microorganismos retienen el colorante violeta, aún después de tratarlos con un decolorante, y el color no se modifica al añadir éste; otros pierden con facilidad el primer tinte, y toman el segundo.

Los que fijan el violeta, se califican de gram positivos, y los que pierden la primera coloración y retienen la segunda, de gram negativos. Basándonos pues, en la reacción Gram, podemos clasificar a los microorganismos en uno de los dos grupos.



FOTO 13. Tinción con safranina.

Los colorantes de p-rosanilina son los que mejores resultados dan en la coloración Gram. Los representantes más usados de este grupo son violeta de metilo y violeta cristal o de genciana. En realidad, violeta de metilo es el nombre atribuido al compuesto tetrametil-p-rosanilina.

El matiz de color de la p-rosanilina se intensifica al aumentar el número de grupos metilo en la molécula; por consiguiente, de los tres grupos, el tono más oscuro es la hexametil-p-rosanilina (violeta cristal), y el tinte más ligero, la tetrametil-p-rosanilina (violeta de metilo). Los nombres violeta de metilo 3R, 2R, R, B, 2B, 3B, etc., se refieren al número de grupos metilo contenidos. La letra R indica matices rojos, y la letra B, tonos azules. El violeta de cristal contiene seis grupos metilo, y se considera como el mejor colorante primario para teñir por el método de Gram.

La facultad de las células para tomar la coloración Gram no es propia de toda sustancia viviente, sino que se limita casi en absoluto a hongos y bacterias. Así vemos que las células de plantas y animales superiores no conservan la primera coloración; los mohos se tiñen con cierta irregularidad; los gránulos de micelios propenden retener el colorante. La reacción de Gram no es infalible ni constante; puede variar con el tiempo del cultivo y el pH del medio, y quizá por otras causas.



FOTO 14. Visualización de microorganismos.

superiores no conservan la primera coloración; los mohos se tiñen con cierta irregularidad; los gránulos de micelios propenden retener el colorante. La reacción de Gram no es infalible ni constante; puede variar con el tiempo del cultivo y el pH del medio, y quizá por otras causas.