

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Catedrático: Prof. Dr. SANTOS OVEJERO

MICROFLORA AEROBIA ESPOROGENA EN LA LECHE NATURAL*

Por Guillermo Suárez Fernández

I. OBJETO Y FINES

El objeto del presente trabajo no ha sido otro que el de realizar una contribución al estudio de la flora microbiana de morfología antracoide, aerobia y anaerobia facultativa, productora de catalasa y formadora de esporos termorresistentes, que normalmente se halla presente en la leche natural.

Las bacterias que reúnen estas características se incluyen en el género *BACILLUS*, COHN, 1872.

La investigación experimental ha sido planificada con un criterio y finalidad aplicativos y, en armonía con esta idea, se pretende que los resultados signifiquen una aportación directa al conocimiento científico de una actividad de tanto interés actual, para nuestra patria, como es la producción de leche esterilizada.

La precisa atención que se ha prestado en otros países al establecimiento de las bases científicas en que debe fundamentarse todo proceso industrial de esterilización de leche natural, mediante tratamiento térmico, contrasta con un olvido total del problema en el nuestro propio.

* Memoria presentada en la Escuela de Bromatología de la Universidad de Madrid para la obtención del título de Técnico Bromatólogo y dirigida por el Catedrático de Bromatología de dicha Universidad: don Bernabé Sanz Pérez.

Los análisis y pruebas realizadas, a fin de cumplimentar el objeto de nuestro estudio, han sido:

1. Recuento total de bacterias.
2. Recuento total de esporos.
3. Recuento de esporos termorresistentes.
4. Aislamiento, estudio e identificación de las bacterias esporógenas termorresistentes capaces de soportar relaciones de tiempo-temperatura de calentamiento del orden de 100°C durante 30 minutos.
5. Estudio especial, con determinación de valores de letalidad térmica, de los microorganismos esporulados capaces de resistir temperaturas superiores a los 135°C durante diez segundos, utilizando técnicas capilares.

Los resultados obtenidos por medio de estas técnicas nos van a permitir:

- a) Determinar el grado de correlación que existe entre el número total de bacterias, de esporos y esporos termorresistentes.
- b) Analizar las variaciones debidas a condiciones geográficas o estacionales.
- c) Disponer de curvas de destrucción térmica de algunas de las especies de microorganismos, pertenecientes al género *Bacillus*, de mayor termorresistencia entre las estudiadas como predominantes en la leche natural.
- d) Establecer combinaciones óptimas de tiempo y temperatura de calentamiento ajustadas al concepto de esterilización industrial que trata de armonizar la calidad del producto alimenticio (leche, en nuestro caso) con la inactividad microbiana del mismo, sin el uso de ninguna substancia inhibidora del crecimiento microbiano, estimuladora de la germinación de esporos o antiesporulante.

II. SITUACION BIBLIOGRAFICA

La literatura sobre el tema es abundante y ha sido revisada ampliamente por JAYNE WILLIAMS y FRANKLIN^{1, 2}, quienes reseñan 288 citas bibliográficas referentes al título *Bacilos esporulados en la leche*. Con posterioridad a esta revisión los trabajos más sobresalientes se deben a MARTIN *et al.*³, BERNHARD⁴, LABOTS y HUP^{5, 6}, LABOTS *et al.*⁷, LANGEVELD y MOL⁸, TRAWINSKA⁹, LANGEVELD y GALESLOT¹⁰ y FRANKLIN¹¹.

III. MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES

1. Muestras

Las muestras ensayadas fueron obtenidas de leche natural (fresca de vaca) admitida como normal por los servicios de recepción de determinada industria láctea de la región leonesa, dedicada en parte a la producción de leche esterilizada embotellada. En dicha industria se exigen, además de las características de composición e higiénicas que la legislación vigente señala para la leche natural, una prueba de estabilidad físico-química, mediante el uso de alcohol de 70° y el indicador alizarina, así como un grado de acidez máximo de 17,5 grados Dornic.

Las muestras se recogieron en la plataforma de recepción de la citada industria y de las partidas seleccionadas para la fabricación de leche estéril con arreglo a los preceptos citados, procedentes de distintas zonas de recogida de la provincia de León y limítrofes.

El muestreo se realizó periódicamente en los meses de febrero a noviembre, ambos inclusive, del año 1968, obteniendo un total de 76 muestras en dicho período, en la proporción de ocho muestras mensuales a excepción de los meses de febrero y noviembre, en que se recogieron cinco y siete muestras respectivamente.

Las muestras se tomaron, guardando las más rigurosas reglas de asepsia, en frascos estériles de 500 cc. de capacidad.

El análisis de las mismas se realizó inmediatamente de su recogida en las muestras matinales y previa conservación de ocho o doce horas a la temperatura de 0-4°C en las correspondientes al ordeño vespertino.

2. Recuento total de bacterias.

Se siguió fielmente la técnica expuesta en la Norma número 3 de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF).

3. Recuento total de esporos.

Una pequeña porción de cada muestra (7 cc.) se depositó en viales McCartney de 7 cc. de cabida, cerrándolos a continuación herméticamente por tapón roscado (fig. 1). Así dispuesta la leche se calentó a 80°C durante diez minutos. La numeración de esporos se realizó distri-

buyéndose en placas de agar distintas diluciones, utilizando las fórmulas que prescribe la ya citada Norma número 3 de la Federación Internacional de Lechería.

La incubación se realizó a la temperatura de 37 grados durante 48 horas.

4. Recuento de esporos termorresistentes.

Se realizó mediante la determinación de número más probable, de acuerdo con la técnica de FRANKLIN *et al.*¹², distribuyendo cuatro cantidades de 100 cc. en frascos de la misma capacidad, planos y de cierre hermético, cuatro de 10 cc. en viales McCartney, y cuatro de 1 cc. en viales que contenían 9 cc. de leche tornasolada estéril. Todas las porciones distribuidas en los frascos herméticamente se calentaron en el autoclave a vapor fluente (100°C) por espacio de treinta minutos, pasado este tiempo se enfriaron en agua y fueron incubados a 37°C durante catorce días, siendo examinados entonces y, considerados positivos los que aparecían cuajados o mostraron una variación en el pH.

El número más probable se determinó mediante las tablas de Hoskins.

5. Aislamiento e identificación de los bacilos esporulados termorresistentes.

El aislamiento se realizó en placas de agar a partir de la menor porción de leche examinada con resultado positivo, siguiendo los métodos convencionales.

El método seguido en la identificación fue el universalmente aceptado de SMITH *et al.*¹³, ligeramente modificado por GRINSTED y CLEGG¹⁴ y consistió en la investigación de las siguientes propiedades: morfología, características de crecimiento en agar-yema de huevo, producción de acetoína, hidrolisis de gelatina y almidón y crecimiento anaeróbico en agar-leche-almidón con uno por cien de dextrosa. La distinción entre el *Bacillus subtilis* y el *Bacillus licheniformis* se basó en el crecimiento del primero en caldo glucosado en régimen de anaerobiosis según BREED *et al.*¹⁵ y MARTIN *et al.*³.

La diferenciación de la variedad mycoide del *Bacillus cereus* se hizo en atención a la forma rizoide de las colonias en la citada variedad.

En la tabla 1 se resume el esquema seguido en la identificación.

6. Determinación de la letalidad térmica de algunos bacilos esporulados resistentes a temperaturas ultraelevadas.

Se sometieron a un calentamiento de 135°C durante diez segundos, siguiendo una técnica capilar, seis cepas de *B. licheniformis*, seis de *B. subtilis* y diez de *B. cereus* con arreglo a los métodos que pasamos a describir.

6.1 Preparación de las suspensiones de esporos.

A partir de cultivos en agar inclinado incubados a 37°C durante veinticuatro horas se inoculó un frasco de Rous que contenía el medio de GHARNEY *et al.*¹⁶, con manganeso. Después de cuatro días de incubación existió, en todos los casos examinados, un número de esporos de 9 : 1 como mínimo, con relación a las formas vegetativas. Este extremo se comprobó por examen microscópico previa coloración.

La superficie del agar se lavó con una solución Ringer al 1 : 4 con ayuda de perlas de vidrio estériles, se recogió la emulsión en un frasco plano con cierre hermético, agitándose los frascos en un agitador durante cuatro horas, junto con las perlas de vidrio y finalmente se lavaron los esporos con una solución Ringer al 1 : 4, centrifugando a 5.000 r. p. m. y una vez calentados a 80° durante diez minutos, se llevaron al refrigerador hasta el momento de su estudio.

6.2 Técnica capilar de calentamiento.

Se siguió la técnica descrita por STERN y PROCTOR¹⁷ utilizada por FRANKLIN *et al.*,¹⁸ entre otros.

Después de varios ensayos con capilares de vidrio de distintas dimensiones y diámetro (externo e interno) seleccionamos los capilares de 75 × 0,8 mm de Ø interior y bajo punto de fusión ya que se mostraron superiores a otros más finos pero más difíciles de cerrar a la llama y con mayor porcentaje de roturas ante el brusco calentamiento en el baño de aceite.

Los tubos capilares previamente esterilizados por calor seco, se llenaron con una microjeringa (Agla) provista de un dispositivo micrométrico y aguja fina de 7 cm con el fin de depositar en el interior de los capilares cantidades de 0,01 cc. (figs. 2 y 3).

Los capilares se cargaron con una suspensión de esporos en una concentración aproximada de 10⁹ por cc. utilizando leche esterilizada al

autoclave para hacer la dilución a partir de la suspensión original. Los extremos se cerraban a la llama y se disponían en una gradilla adecuada para ser sometidos a calentamiento en un baño de aceite especial con agitador, calefacción eléctrica y sensibilidad de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ (ultratermostato «Horizont» UT12).

Después del calentamiento los capilares se enfriaban en agua helada dispuesta junto al baño, luego se lavaban con agua, se secaban con un lienzo fino y sumergían en un tubo de ensayo con acetona. Posteriormente los tubos capilares sin grasa se introducían en solución de hidroclorito al 0,5 por cien permaneciendo varios minutos en ella y finalmente se enjuagaban varias veces con agua destilada estéril y 10 capilares eran transferidos a un frasco McCartney de 28,3 cc. de capacidad con perlas de vidrio y 10 cc. de solución Ringer 1:4. Los capilares se molían por agitación en un agitador excéntrico con lo que obteníamos una solución de 0,1 cc. de la suspensión calentada en 10 cc.

6.3. Germinación y enumeración de los esporos ultratermorresistentes.

En el caso de selección de cepas resistentes a la temperatura de 135°C durante diez segundos se sembraron directamente diez placas de agar-almidón-leche, según GRINSTED y CLEGG¹⁴ con un centímetro cúbico de la dilución anterior, cada una, la última lavando el frasco con agar fundido.

Cuando fue positivo el resultado del cultivo se anotó este carácter sin hacer nuevo aislamiento, utilizando la suspensión inicial en las distintas pruebas de resistencia térmica realizadas.

En la determinación de valores de resistencia térmica a distintas temperaturas y tiempos variables se practicaron diluciones a partir de la suspensión calentada en capilares y contenida en 10 cc. sembrando dos placas de cada dilución y realizando el conteo de colonias sobre las placas con crecimiento más idóneo a tal fin. En los calentamientos a 130°C y 135°C se utilizó el total de la suspensión, como en el caso ya citado de la selección de cepas resistentes a la temperatura de 135°C, con el fin de asegurar los resultados.

6.4. Valores y gráficas de destrucción térmica.

Se determinó el número de esporos supervivientes para combinaciones de temperatura de 100°C y tiempos de 30, 60, 120 y 240 minu-

tos; 120°C y 1, 5, 10 y 15 minutos; 130°C y 30 segundos y 1, 5 y 10 minutos; 135°C y 15,30 segundos y 1 y 5 minutos. Con estos resultados se han realizado gráficas de destrucción térmica (figs. 5 a 8 inclusive), colocando sobre un sistema de coordenadas ortogonales los valores logarítmicos del número de esporos supervivientes a una temperatura (eje de ordenadas) y los tiempos de calentamiento a que corresponden dichos valores (eje de abscisas).

Las especies sometidas a estudio especial de termorresistencia han sido el *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. cereus*, aisladas con una mayor frecuencia de la leche fresca.

IV. RESULTADOS

1. Del recuento total de gérmenes, esporos y esporos termorresistentes mesófilos.

Los resultados se resumen y comparan en la tabla 2 y fig. 4.

En tres muestras de las 76 sometidas a examen, dos correspondientes al mes de julio y una al mes de agosto, no se encontraron esporos correspondientes a bacilos aerobios mesófilos.

2. Identificación de los bacilos esporulados termorresistentes.

Se sometieron a identificación 73 bacilos correspondientes a otras tantas muestras positivas, según la técnica de número más probable ya descrita. Aunque en diez muestras aparecieron dos tipos de colonia, al verificar el aislamiento por siembra en placas de agar, se seleccionó únicamente el tipo predominante siendo el número de colonias del segundo tipo muy escaso en las referidas muestras.

Los resultados obtenidos por mes y en total se expresan en la tabla 3. Se pudieron identificar, con arreglo a la técnica ya citada, 67 bacilos, resultando 6 indetectados.

3. Determinación de los valores térmicos letales de algunos bacilos esporulados especialmente termorresistentes.

Utilizando la técnica capilar descrita, de las seis cepas de *B. licheniformis*, seis de *B. subtilis* y diez de *B. cereus*, sometidas a un calentamiento de 135°C durante diez segundos, existieron supervivientes, pro-

duciendo colonias típicas de la especie sobre agar-almidón-leche, incubados a 37°C durante cuarenta y ocho horas, en dos muestras de *B. subtilis*, dos de *B. cereus* y en ninguna de *B. licheniformis*.

Los resultados de letalidad de los valores térmicos estudiados se expresan en las tablas 4, 5, 6 y 7; las curvas de destrucción térmica se reseñan en las figs. 5, 6, 7 y 8.

V. DISCUSIÓN

RIDGWAY,¹⁹ pudo demostrar que existe una correlación estrecha entre el contenido de esporos de leche natural y el grado o poder de conservación de la leche estéril. Posteriormente diversos autores (FRANKLIN *et al.*¹², BERNHARD,⁴ MARTIN *et al.*³, entre otros) han sustentado dicha opinión, pudiendo decirse que el desarrollo industrial de nuevas técnicas de esterilización mediante el empleo de temperaturas ultraelevadas, durante unos segundos solamente, ha incrementado la importancia real de la presencia de microorganismos esporógenos en los suministros de leche natural.

En armonía con lo expuesto se ha planeado un estudio de la microflora esporógena de leche natural con unos fines ya citados y que pasamos a analizar.

1. Enumeración de gérmenes, esporos y esporos termorresistentes.

El análisis de varianza y cálculo del valor *t* de Student mostró una significación positiva cuando se compararon las medias mensuales referentes a la enumeración de esporos y esporos termorresistentes y también gérmenes y esporos. En este último caso existió una correlación inversa, correspondiendo la mayor cifra de gérmenes, en el mes de julio, con el menor número de esporos por cc.

Mientras que la variación estacional del número de esporos por cc. confirma los estudios de FRANKLIN *et al.*¹² y BERNHARD,⁴ la correlación inversa que se observa entre el número de gérmenes y de esporos por cc. (tabla 2 y fig. 4) no está de acuerdo con los estudios de MARTIN *et al.*³, quienes no encontraron relación alguna entre dichos valores.

La explicación de un mayor número de esporos en invierno puede hallarse en el tipo de alimentación preferente de las vacas lecheras, a base de heno, que se sigue en la región durante esta época del año.

De la misma manera se explica el mayor número de gérmenes en verano por una mayor temperatura ambiente que ha de influir acortando el tiempo de generación de las bacterias, aunque pudiera quizás existir un tercer factor de orden competitivo entre la microflora láctica y las especies del género *Bacillus*.

La principal consecuencia práctica que se deriva del estudio de los resultados de la tabla 2 sería la necesidad de someter a revisión la práctica común, que existe en las industrias de nuestro país, de elevar la temperatura de esterilización en verano y disminuirla en invierno, precisamente cuando la leche es portadora de un mayor número de esporulados.

2. Frecuencia de las distintas especies de gérmenes esporulados termorresistentes mesófilos en leche natural.

Del estudio de los resultados que se presentan en la tabla 3 no se deduce que exista una variación estacional clara en los tipos de esporos identificados.

Las tres especies predominantes con gran diferencia sobre el resto fueron el *B. licheniformis* (29 por cien), *B. subtilis* (21 por cien) y *B. cereus* (16 por cien). Es de destacar el elevado porcentaje de *B. cereus* ya que la gran variación que presenta esta especie en las diversas cepas (FRANKLIN¹²) frente a las elevadas temperaturas de calentamiento, hace pensar en la existencia de un mayor número de bacterias en este tipo en la leche natural, no resistentes a la combinación de tiempo-temperaturas utilizadas en la selección de cepas termorresistentes a los fines del presente estudio.

3. Determinación de los valores térmicos letales de algunos bacilos esporulados de elevada resistencia térmica.

Tres especies sometidas a una prueba especial de termorresistencia fueron las predominantes en la microflora estudiada y la combinación de tiempo y temperatura elegidos son equivalentes a los tratamientos propios de la leche UHT (temperatura de 135-150°C durante uno, dos o más segundos).

El porcentaje de cepas termorresistentes a temperaturas ultraelevadas fue más alto para el *B. subtilis* (33 por cien), siguiéndole el *B. cereus* (20 por cien), siendo nulo para el *B. licheniformis*, hecho que me-

rece ser destacado dado el estrecho parentesco bioquímico de esta especie y el *B. subtilis*.

De las dos cepas de *B. subtilis* estudiadas, una de ellas (Cepa 1) sucumbió a la temperatura de 135°C en cinco minutos, mientras que produjo supervivencia en idénticas condiciones de calentamiento, pero únicamente por espacio de un minuto.

La cepa 2 resistió en cambio el tratamiento a 135°C durante cinco minutos lo que tiene ya una significación clara en la tecnología de la producción de leche estéril.

Respecto a las dos cepas de *B. cereus* que se estudiaron muestran características ligeramente distintas en cuanto a sus curvas de letalidad térmica, caracterizándose la primera por la existencia de una pequeña cantidad de esporos muy resistentes dentro de la población total, mientras que este hecho no se acentúa tanto en la cepa 2.

No hemos podido observar claramente fenómeno alguno de activación térmica a altas temperaturas como anteriormente lo habíamos observado en otras cepas termorresistentes de la misma especie (SUAREZ²⁰), lo que producía en algunas ocasiones elevaciones en la curva de destrucción entre los cinco y quince minutos a temperaturas comprendidas entre los 120 y 135°C.

No obstante la interpretación de las curvas a 120 y 130°C en la fig. 6 y de 130 y 135°C en la fig. 7 no puede descartar una interferencia debida a una activación térmica de una pequeña parte de la población de esporos.

VI. CONCLUSIONES

1.^a Del estudio realizado se deduce que existe una correlación directa y estrecha entre el número de esporos mesófilos resistentes a la temperatura de 80°C durante 15 minutos y el de resistentes a 100°C durante treinta minutos, existiendo también una correlación inversa entre estos tipos y el número de colonias de bacterias mesófilas presentes en las muestras de leche natural seleccionadas.

2.^a La existencia de una variación estacional con un mayor número de esporos termorresistentes en invierno aconsejaría el incrementar las temperaturas de esterilización durante esta época, en lugar de reducirlas.

3.^a Las tres especies claramente predominantes en las muestras de leche natural analizadas fueron el *B. licheniformis*, el *B. subtilis* y el *B. cereus*.

4.^a Dos cepas de *B. cereus* de diez ensayadas y dos de *B. subtilis* de seis, sometidas a un calentamiento de 135°C durante diez segundos, resistieron a dicha combinación térmica, habiéndose realizado la determinación del efecto letal de distintas temperaturas sobre dichas cepas, que demuestra que estas especies pueden sobrevivir en determinadas condiciones los tratamientos térmicos más modernos entre los aplicados a la esterilización de la leche.

VII. RESUMEN

Con el objeto de realizar una contribución al estudio de la flora microbiana de morfología antracoide presente en la leche natural y una aportación directa al conocimiento científico del proceso de fabricación de la leche esterilizada, se han estudiado 76 muestras de leche natural a lo largo de un período aproximado a los nueve meses.

Los análisis y pruebas realizadas a fin de cumplimentar el objeto de nuestro estudio, han sido: Recuento total de bacterias, recuento total de esporos, recuento de esporos termorresistentes, aislamiento e identificación de las bacterias esporógenas termorresistentes y estudio de los valores de letalidad térmica de los microorganismos especialmente termorresistentes.

Del estudio realizado se deduce que existe una correlación directa y estrecha entre el número de esporos mesófilos resistentes a la temperatura de 80°C durante diez minutos y el de resistentes a 100°C durante treinta minutos, existiendo también una correlación inversa entre estos tipos y el número de colonias de bacterias mesófilas presentes en las muestras de leche natural seleccionadas.

Se ha podido comprobar la existencia de una variación estacional en cuanto al número de esporos termorresistentes, aumentando el número de estos de la leche durante el invierno, fenómeno que puede resultar significativo para el proceso de esterilización industrial del producto.

Las especies del género *Bacillus* halladas con mayor frecuencia en la leche natural fueron el *B. licheniformis*, el *B. subtilis* y el *B. cereus*.

Dos cepas de *B. cereus* de diez ensayadas y dos de *B. subtilis* de seis, sometidas a calentamiento de 135°C durante diez segundos, resistieron dicha combinación térmica. Realizada la determinación de los valores letales de distintas temperaturas sobre dichas cepas se demuestra que estas especies pueden sobrevivir, en determinadas condiciones, los tratamientos térmicos más modernos entre los aplicados a la esterilización industrial de la leche.

RESUME

On a étudié 76 échantillons de lait naturel pendant une période d'environ neuf mois, à fin de contribuer à l'étude de la flore microbienne de morphologie anthracoïde qui se trouve dans le lait naturel et de contribuer aussi directement à la connaissance scientifique du procédé de fabrication de lait stérilisé.

Les analyses et essais effectués à fin d'accomplir le but de notre étude sont: comptage total de bactéries, comptage total de spores, comptage total de spores thermorésistantes, isolement et identification des bactéries sporogènes thermorésistantes et étude des valeurs de la létalité thermique des microorganismes spécialement thermorésistants.

D'après l'étude effectuée, on déduit qu'il existe une grande corrélation directe entre le nombre de spores mésophyles résistants à la température de 80°C pendant 10 minutes et celui de spores mésophyles résistants à la température de 100°C pendant 30 minutes; il existe aussi une corrélation inverse entre ces types et le nombre de colonies de bactéries mésophyles trouvées dans les échantillons de lait naturel sélectionnés.

On a pu constater l'existence d'une variation saisonnière quant au nombre de spores thermorésistants; ce nombre augmente en hiver, ce qui peut être significatif pour le procédé de stérilisation industrielle du lait.

Les espèces du genre *Bacillus* trouvées le plus fréquemment dans le lait naturel furent les espèces *B. licheniformis*, *B. subtilis* et *B. cereus*.

Deux souches de *B. cereus* sur dix et deux souches de *B. subtilis* sur six, essayées et soumises à un échauffement de 135°C. pendant 10 secondes, résistèrent cette combinaison thermique. Après avoir fait la détermination des valeurs totales de diverses températures sur les sus-

dites souches, on démontre que ces espèces peuvent survivre, dans de certaines conditions, aux traitements thermiques les plus modernes parmi ceux que l'on applique à la stérilisation industrielle du lait.

SUMMARY

In order to contribute to the study of the raw milk microflora having an anthracoid morphology, and to help directly to the scientific knowledge of the manufacturing process of sterilized milk, we have studied 76 samples of raw milk for a period of about nine months.

The analysis and tests we have carried out to fulfill our purpose are: total count of bacteria, total count of spores, total count of thermoresistant spores and the study of thermal death times values in the specially thermoresistant micro-organisms.

According to the study carried out we may establish that there is a direct and close correlation between the number of mesophilic spores bearing a temperature of 80°C for 10 minutes and those resisting a temperature of 100°C for 30 minutes; there is also an inverse correlation between these types and the number of colonies of mesophilic bacteria in the samples of selected raw milk.

It has been shown that there is a seasonal variation concerning the number of thermoresistant spores; this number being greater in Winter, which may be significative for the industrial milk sterilization process.

The species of *Bacillus* genus most frequently found in natural milk were *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *B. cereus*.

Two strains of *B. cereus* out of ten and two strains of *B. subtilis* out of six tried, heated at 135°C for 10 seconds resisted said thermic combination. After having determined the thermal death times of various temperatures on these strains it has been shown that they can survive, under certain conditions, after applying the most modern thermic treatments among those applied to the industrial sterilization of milk.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1) JAYNE-WILLIAMS, D. J. y FRANKLIN, J. G.—*Dairy Sci. Abstr.* **22**: 215, 1960 a.
- 2) JAYNE-WILLIAMS, D. J. y FRANKLIN, J. G.—*Dairy Sci. Abstr.* **22**: 269, 1960 b.

- 3) MARTIN, J. H., STAHLY, D. P., HARPER, W. J. y GOULD, I. A. XVI International Dairy Congress. Section VIII: 1: 295, 1962.
- 4) BERNHARD, B.—XVI International Dairy Congress. Section VIII: 1: 337, 1962.
- 5) LABOTS, H. y HUP, G.—*Neth. Milk & Dairy J.* **18**: 112, 1964 a.
- 6) LABOTS, H. y HUP, G.—*Neth. Milk & Dairy J.* **18**: 167, 1964 b.
- 7) LABOTS, H., HUP, G. y GALESLOT, Th. E.—*Neth. Milk & Dairy J.* **19**: 191, 1965.
8. LANGEVELD, L. P. M. y MOLL, J. J.—*Off. Org. K. ned. Zuivelbond.* **58**: 561, 1966.
- 9) TRAWINSKA, J.—*Polskie Arcum vet.* **10**: 277, 1966.
- 10) LANGEVELD, L. P. M. y GALESLOT.—*Th. E. Neth. Milk & Dairy J.* **21**: 13, 1967.
- 11) FRANKLIN, J. G.—*Milk Ind.* **61**: 34, 1967.
- 12) FRANKLIN, J. G., WILLIAMS, D. J. y CLEGG, L. F. L.—*J. appl. Bact.* **19**: 46, 1956.
- 13) SMITH, N. R., GORDON, R. E. y CLARK, F. E.—*Aerobic Spore-Forming Bacteria. U. S. Dep. Agric. Monograph.* **16**: 1952.
- 14) GRINSTED, E. y CLEGG, L. F. L.—*J. Dairy Res.* **22**: 178, 1955.
- 15) BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. y SMITH, N. R.—*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* The Williams & Wilkins Co., 1957.
- 16) CHARNEY, J., FISHER, W. P. y HEGARTY, C. P.—*J. Bact.* **62**: 145, 1951.
- 17) STERN, J. A. y PROCTOR, B. E.—*Food Technol.* **8**: 139, 1954.
- 18) FRANKLIN, J. G., WILLIAMS, D. J. y CLEGG, L. F. L.—*J. appl. Bact.* **21**: 51, 1958.
- 19) RIDGWAY, J. D. J.—*appl. Bact.* **18**: 374, 1955.
- 20) SUAREZ, G.—Informe presentado al Departamento de Bacteriología del National Institute for Research in Dairying sobre los estudios realizados en aquel Centro bajo los auspicios del British Council, 1966.

TABLA 1

Esquema seguido para la identificación de las formas bacilares esporuladas mesofilas aisladas de leche natural.

ESPECIES	Lipolisis en yema de huevo	Acetoína	Hidrolisis gelatina	Hidrolisis almidón	Crecimiento en anaerobiosis	Tipo de esporo*
B. Cereus.....	+	+	+	+	+	I
B. Cereus Var. mycoides**.....	+	+	+	+	+	I
B. Licheniformis.....	-	+	+	+	+	I
B. Subtilis.....	-	+	+	+	-	I
B. Pumilus	±	+	+	-	-	I
B. Coagulans	-	+	-	+	±	I-II
B. Latersporus	-	-	±	-	+	II
B. Brevis.....	±	-	+	-	-	II
B. Sphaericus.....	-	-	-	-	-	II

* Tipo II: Esporo no más ancho que la forma vegetativa, de pared fina.

« II: Esporo más ancho que la forma vegetativa de pared gruesa.

** Tipo: Crecimiento rizoide sobre agar.

TABLA 2

Enumeración de gérmenes, esporos y esporos termorresistentes mesófilos.

MESES	LOGARITMO DEL NUMERO TOTAL*		
	De gérmenes por c. c.	De esporos por c. c.	De esporos termo resistentes por c. c.
Febrero	5,863	5,633	2,287
Marzo.....	5,991	5,334	1,886
Abril	6,113	4,000	1,785
Mayo	6,342	3,505	1,380
Junio	6,511	3,332	1,025
Julio	7,000	3,000	0,982
Agosto	6,348	3,217	1,008
Setiembre ...	5,999	3,491	1,456
Octubre	5,653	3,716	1,637
Noviembre ...	5,397	4,184	1,912

* Logaritmo de la media aritmética de las ocho determinaciones mensuales a excepción de febrero (cinco) y noviembre (siete).

TABLA 3

Frecuencia de las distintas especies de gérmenes esporulados mesófilos termorresistentes, aerobios, aislados de leche natural.

MESES	ESPECIES DEL GENERO BACILLUS									TOTAL
	Cereus	Cereus Var. mycoides	Licheni- formis	Subtilis	Pumilus	Cougalans	Lateros- porus	Brevis	Sphaericus	
Febrero	1	0	4	0	0	0	0	0	0	5
Marzo	1	0	2	3	0	1	1	0	0	8
Abril	0	0	4	3	0	1	0	0	0	8
Mayo	2	1	3	1	0	1	0	0	0	8
Junio	1	0	1	2	1	0	0	1	0	8
Julio	2	0	2	1	0	0	0	1	0	6
Agosto	3	0	1	0	0	0	0	0	2	7
Setiembre ...	1	0	3	1	0	2	0	0	0	8
Octubre	0	0	1	2	1	0	0	2	0	8
Noviembre...	1	0	1	2	1	1	0	1	0	7
TOTAL.....	12	1	22	15	3	6	1	5	2	73

TABLA 4

*Efecto letal de distintas temperaturas sobre la cepa 1 termorresistente de *B. subtilis*.*

Concentración inicial de esporos 10^9 por c.c.

Temperatur. °C.	Tiempos (minutos)									
	0,25	0,50	1	5	10	15	30	60	120	240
100	—	—	—	—	—	—	$2,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$	$7,3 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$
120	—	—	$2,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	—	—	—	—
130	—	$5,4 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$	$9,6 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	—	—	—	—	—
135	$1,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	cero						

TABLA 5

*Efecto letal de distintas temperaturas sobre la cepa 2 termorresistente de *B. subtilis*.*

Concentración inicial de esporos $2,2 \times 10^8$ por c.c.

Temperatur. °C.	Tiempos (minutos)									
	0,25	0,50	1	5	10	15	30	60	120	240
100	—	—	—	—	—	—	$1,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,3 \times 10^7$
120	—	—	$4,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	—	—	—	—
130	—	$4,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	—	—	—	—	—
135	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	—	—	—	—	—	—

TABLA 6

*Efecto letal de distintas temperaturas sobre la cepa 1 termorresistente de *B. cereus*.*

Concentración inicial de esporos $3,1 \times 10^9$ por c.c.

Temperatur. °C.	Tiempos (minutos)									
	0,25	0,50	1	5	10	15	30	60	120	240
100	—	—	—	—	—	—	$2,3 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$
120	—	—	$3,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	—	—	—	—
130	—	$9,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	5×10^2	—	—	—	—	—
135	$8,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	10^2	—	—	—	—	—	—

TABLA 7

*Efecto letal de distintas temperaturas sobre la cepa 2 termorresistente, de *B. cereus*.*

Concentración inicial de esporos $5,3 \times 10^9$ por c.c.

Temperatur. °C.	Tiempos (minutos)									
	0,25	0,50	1	5	10	15	30	60	120	240
100	—	—	—	—	—	—	$7,8 \times 10^8$	$3,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10^1$	$9,3 \times 10^3$
120	—	—	$4,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	—	—	—	—
130	—	$5,3 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	—	—	—	—	—
135	$1,3 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10$	—	—	—	—	—	—



Fig. 1: Botellines y viales Mc Cartney utilizados en las técnicas capilares para la determinación de termorresistencia

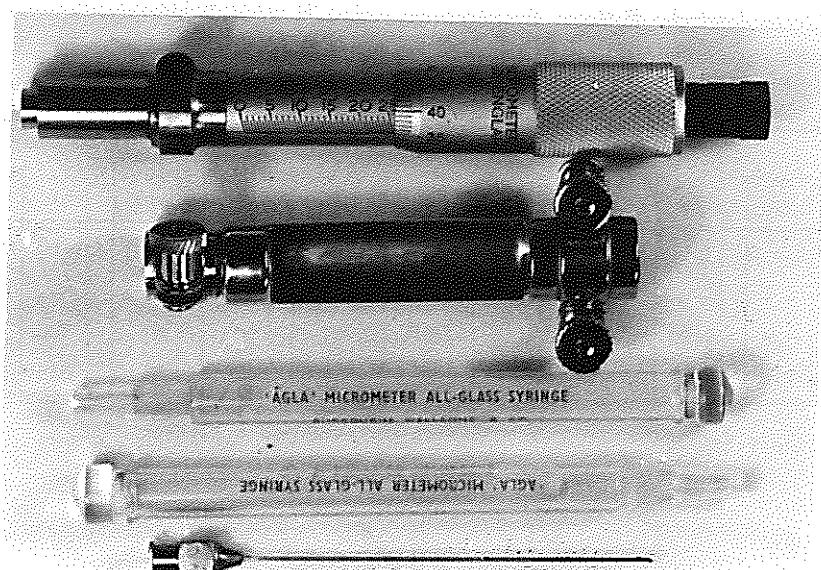


Fig. 2: Microjeringa AGLA empleada en el llenado de capilares de vidrio.

— 40 —

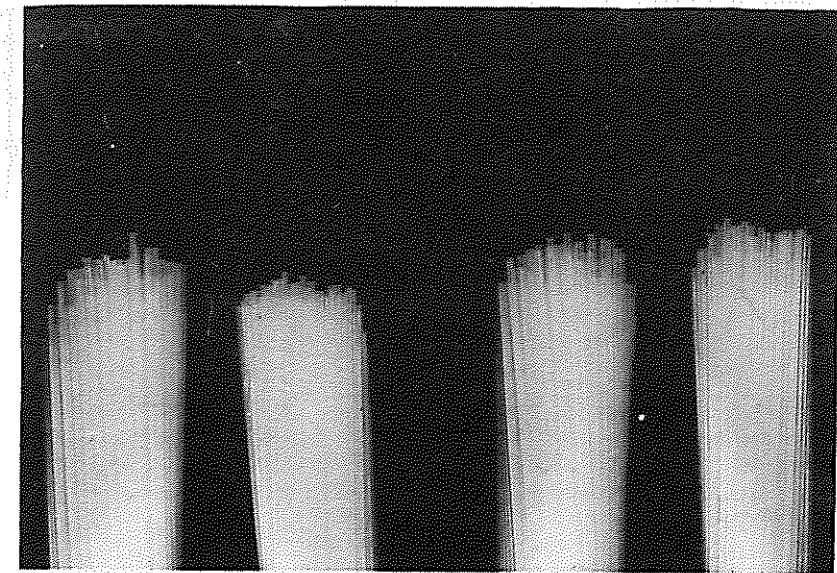
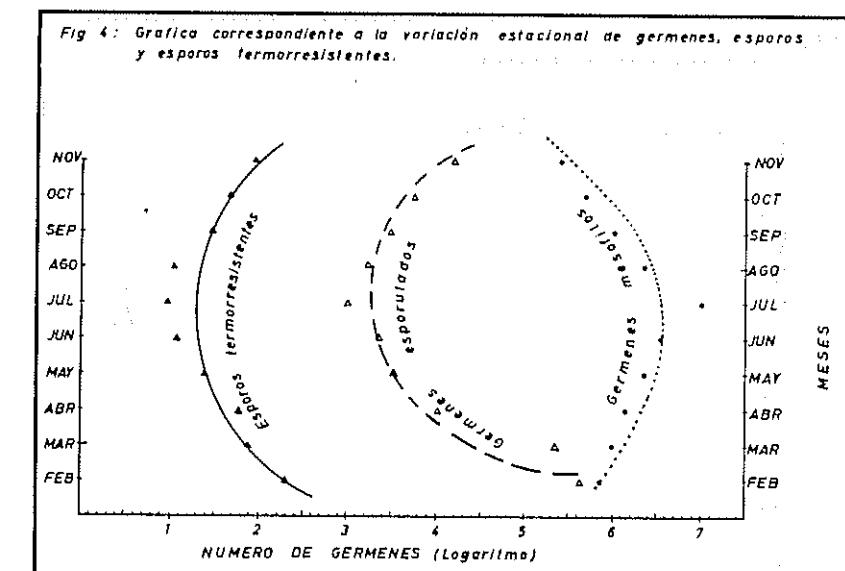


Fig. 3: Capilares de vidrio de diverso calibre y punto de fusión.



— 41 —

Fig 5: Gráfica correspondiente al efecto letal térmico sobre la cepa 1 termorresistente de *B. subtilis*.

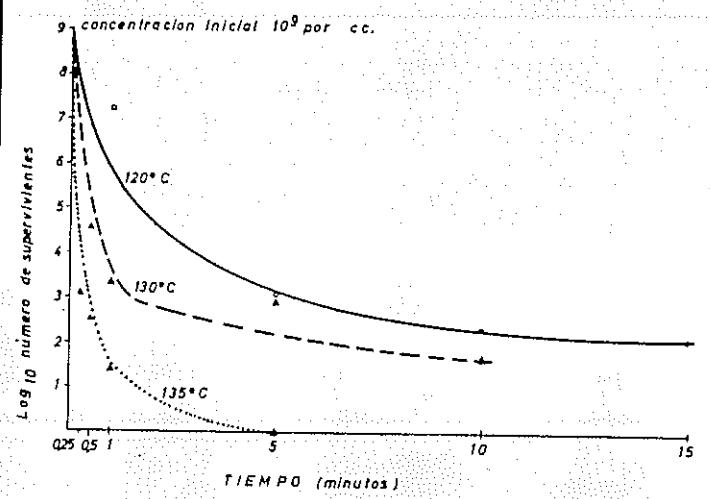


Fig 7: Gráfica correspondiente al efecto letal térmico sobre la cepa 1 termorresistente de *B. cereus*.

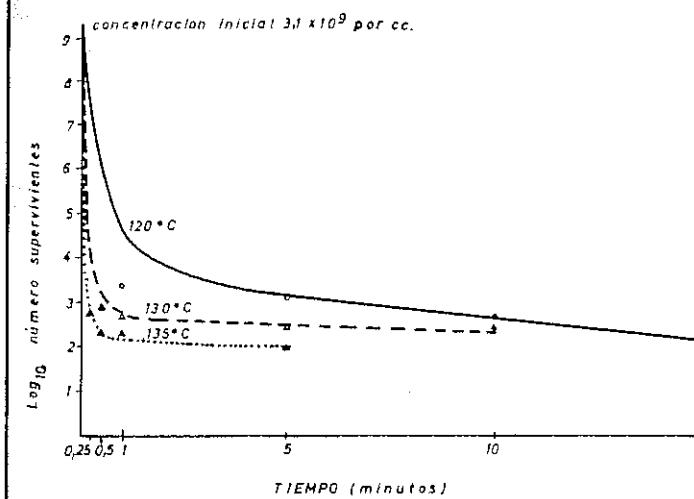


Fig 6: Gráfica correspondiente al efecto letal térmico sobre la cepa 2 termorresistente de *B. subtilis*.

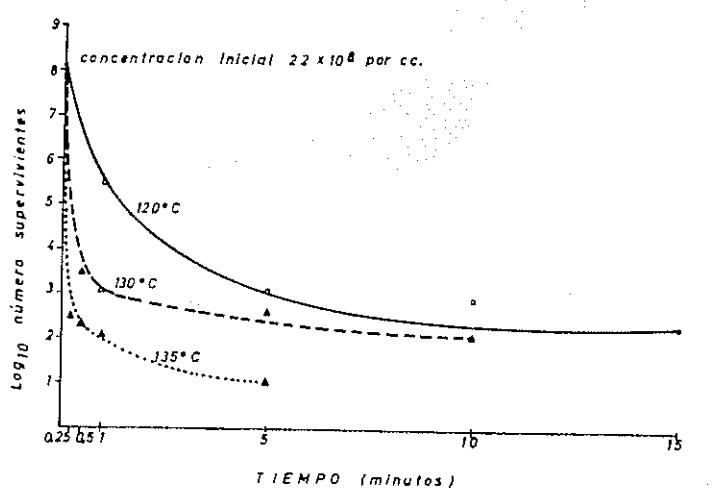


Fig 8: Gráfica correspondiente al efecto letal térmico sobre la cepa 2 termorresistente de *B. cereus*.

