

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A
PARTIR DE LECHE CRUDA Y QUESO PAIPA ELABORADO EN LOS
MUNICIPIOS DE PACHO (CUNDINAMARCA) Y BELEN (BOYACA).

JUAN CARLOS SUAREZ MURCIA

Director:

ESPERANZA NEIRA BERMUDEZ

Zootecnista.

Codirector:

JAVIER HERNANDEZ FERNANDEZ

Biólogo

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE ZOOTECNIA

BOGOTÁ D.C.

2008

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A
PARTIR DE LECHE CRUDA Y QUESO PAIPA ELABORADO EN LOS
MUNICIPIOS DE PACHO (CUNDINAMARCA) Y BELEN (BOYACA).

JUAN CARLOS SUAREZ MURCIA

Trabajo de grado presentado para optar al título de Zootecnista

Director:

ESPERANZA NEIRA BERMUDEZ

Zootecnista.

Codirector:

JAVIER HERNANDEZ FERNANDEZ

Biólogo

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE ZOOTECNIA

BOGOTÁ D.C.

2008

DIRECTIVAS

HERMANO CARLOS GABRIEL GÓMEZ RESTAREPO F.S.C.
RECTOR

HERMANO FABIO CORONADO PADILLA F.S.C.
VICERECTOR ACADEMICO

HERMANO CARLOS ALBERTO PABON MENESES F.S.C.
VICERECTOR DE PROMOCIÓN Y DESARROLLO HUMANO

DOCTOR MANUEL CANCELADO JIMENEZ F. S. C.
VICERECTOR DE INVESTIGACION Y TRANSFERENCIA

DOCTOR MAURICIO FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
VICERECTOR ADMINISTRATIVO

DOCTORA PATRICIA INES ORTIZ VALENCIA
SECRETARIA GENERAL

DOCTOR RAFAEL IGNACIO PAREJA MEJIA
DECANO

DOCTOR JOS JUAN CARLOS LECONTE
SECRETARIO ACADÉMICO

APROBACIÓN

DOCTOR RAFAEL IGNACIO PAREJA MEJIA
DECANO

DOCTOR JOS JUAN CARLOS LECONTE
SECRETARIO ACADEMICO

DOCTOR(A) ESPERANZA NEIRA
DIRECTORA TRABAJO DE GRADO

DOCTOR JAVIER HERNANDEZ
CODIRECTOR TRABAJO DE GRADO

DOCTOR(A)
JURADO

DOCTOR(A)
JURADO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de La Salle especialmente a La Facultad de Zootecnia por habernos permitido participar y desarrollar este proyecto de investigación.

A Nuestros Directores de Tesis, Dra. Esperanza Neira y al Dr. Javier Hernández, por su colaboración, paciencia y asesoría brindada para el desarrollo para este proyecto de investigación.

A los productores de queso Paipa de los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá) por su ayuda en la recolección de las muestras.

A Jhon Lara Director de La Umata del municipio de Pacho (Cundinamarca) por la información obtenida acerca de fabricas productoras de queso Paipa.

A Laionel Sánchez y Rosario Santos por su colaboración en el desarrollo de las pruebas realizadas.

A los muchachos del semillero por su colaboración en el laboratorio.

DEDICATORIA

Tengo que darle gracias a tantas persona que no se por donde empezar, pero indiscutiblemente empezare por esa divina inteligencia que es Dios . a mi padre HOMERO SUAREZ CUBIDES que debe estar orgulloso de sus tres hijos , y en especial a mi madre TERESA MURCIA ROBLES que con tanto sufrimiento y esfuerzo nos han sacado a delante, con ayuda de mis tías y toda la familia , que de una u otra forma estuvieron en la formación de nosotros , gracias a todas esas personas amigos y desconocidos , que me colaboraron , de todo corazón gracias , y al hermanito Nicolás de Tolentino que ha sido un faro de luz en estos últimos años.

¡Hombre , vaso de tierra con alma de dios ¡ ¿has pensado que tienes el poder de atraer las grandezas del infinito sobre tu vida terrestre ¿

RESUMEN

La fermentación de los alimentos por bacterias ácido lácticas es una de las formas más antiguas de conservación usadas por el hombre. Uno de los alimentos resultante de dichas fermentaciones es el queso Paipa, el cual es uno de los productos más representativos de nuestro país en cuanto a quesos semimadurados, desafortunadamente, este tipo de queso se produce en forma artesanal, haciéndolo riesgoso para la salud pública, debido a que la leche utilizada en este proceso no es sometida a tratamiento térmico.

En el presente trabajo, se realizaron análisis físico-químicos a la leche y al queso Paipa identificándolo como un queso semigraso y semiblando. Se aislaron e identificaron bacterias ácido lácticas (BAL) de queso Paipa elaborado semiindustrialmente y artesanal, a diferentes días de maduración (1, 5 y 10 días) y leche cruda. Las muestras fueron tomadas en el municipio de Belén (Boyacá) en LACTEOS IBEL y LÁCTEOS SAN ANTONIO y en Pacho (Cundinamarca) en las fincas BONANZA Y LA ENRAMADA. Se analizaron en total 16 muestras de las cuales 12 fueron de queso Paipa y 4 de leche cruda. El aislamiento de las BAL se realizó en dos fases. Primero, se utilizaron los medios de cultivo MRS, M17, ATP y EMB, cada uno de estos medios son selectivos para: *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Enterobacterias* respectivamente. Después, se realizó un repique en los mismos medios y se incubaron a una temperatura de 32°C a excepción del medio EMB, que se incubó a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se identificaron las BAL por medio de la reacción de catalasa, oxidasa y tinción de Gram, en donde presentaron una morfología de bacilos y cocos Gram positivos y catalasa y oxidasa negativos; las BAL positivas a catalasa y oxidasa (*Enterobacterias*) se tuvieron en cuenta para la identificación. Finalmente, las BAL aisladas se conservaron en glicerol al 30% en congelación a -36°C y después en nitrógeno líquido (-196°C) para luego ser identificadas molecularmente.

PALABRAS CLAVES: Bacterias ácido lácticas (BAL), queso paipa, aislamiento, identificación, físico-químicos, catalasa, oxidasa.

ABSTRACT

The fermentation of foods by acid lactic bacteria is one of the oldest forms of conservation used by the man. One of foods resulting of these fermentations is the Paipa cheese, which is one of representative products but of our country as far as semimatured cheeses, unfortunately, this type of cheese takes place in artisan form, making it risky for the public health, because the milk used in this process is not put under heat treatment.

In the present work, analyses were made physical-chemistries to milk and the Paipa cheese identifying it like a semigreasy and semisoft cheese. Acid lactic bacteria (BAL) of elaborated semiindustrially and artisan Paipa cheese isolated themselves and identified, to different days of maturation (1, 5 and 10 days) and crude milk. The samples were taken in the municipality from Bethlehem (Boyacá) in MILKY LACTEOS IBEL and SAN ANTONIO and in Pacho (Cundinamarca) in the property BONANZA and the ENRAMADA. 16 samples were analyzed altogether of which 12 were of Paipa cheese and 4 of crude milk. The isolation of the BAL was made in two phases. First, the culture means were used MRS, M17, ATP and EMB, each one of these means are selective stops: *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* and *Enterobacterias* respectively. Later, repique was made in such average and they were incubated to a temperature of 32°C with the exception of the average EMB that was incubated to a temperature of 37°C. Later, the BAL by means of the reaction of catalasa, oxidasa and tinción of Gram were identified, in where they presented/displayed a positive morphology of bacilli and negative Gram coconuts and catalasa and oxidasa; the positive BAL to catalasa and oxidasa (*Enterobacterias*) considered for the identification. Finally, the isolated BAL were conserved molecularly in glicerol to 30% in freezing to -36°C and later in liquid nitrogen (-196°C) soon to be identified.

KEY WORDS: Lactic bacteria acid (BAL), cheese paipa, isolation, identification, conservation, catalasa, oxidasa.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	3
1.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.1. OBJETIVOS ESPECIDFICOS	3
2. MARCO TEORICO	4
2.1. GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS	4
2.1.1 Clasificación de las bacterias	4
2.2. FERMENTOS LACTICOS	7
2.3. BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	7
2.4. LECHE CRUDA ENTERA	9
2.4.1. Generalidades	9
2.4.2. Características físico-químicas de la leche	9
2.4.3. Aptitud de la leche para la elaboración del queso	10
2.5. EL QUESO	10
2.5.1. Clasificación	11
2.6. GENERALIDADES DEL QUESO PAIPA	11
2.6.1. Agentes que participan en la maduración del queso.	12
2.6.1.1 Aireación	12
2.6.1.2 Humedad	13
2.6.1.3 pH	13

2.6.2. Los microorganismos y su relación con el pH	13
2.7. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS	14
2.7.1 Catalasa	15
2.7.2 Oxidasa	16
2.7.3 Tinción de Gram	16
2.8. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	17
2.8.1. Liofilización	17
2.8.2. Congelación en Nitrógeno Líquido (-196°C)	17
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. UBICACIÓN DEL PROYECTO	19
3.2. DEFINICIÓN DEL UNIVERSO Y MUESTRA	19
3.3. TECNICAS Y PROCEDIMIENTO	20
3.3.1 Selección de las muestras	20
3.3.2 Características físico-químicas de la leche y del queso Paipa	20
3.3.3 Aislamiento de las bacterias ácido lácticas	21
3.3.4 Identificación de bacterias ácido lácticas	21
3.3.5 Conservación de las bacterias ácido lácticas por congelación en nitrógeno líquido (-196 °C)	22
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DE LA LECHE CRUDA Y EL QUESO PAIPA	23
4.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	24
4.3. CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS POR CONGELACIÓN EN NITROGENO LÍQUIDO (-196 °C)	31
5. CONCLUSIONES	33
6. RECOMENDACIONES	35
7. BIBLIOGRAFIA	36

ANEXOS

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Principales Tipos de Formas Bacterianas.	5
Cuadro 2. Fundamentos de Diferencia de Gram + y Gram –.	6
Cuadro 3. Composición General de la Leche.	10
Cuadro 4. Características Físico-químicas del los Quesos Madurados.	11
Cuadro 5. Medios de Cultivo más Utilizados para Aislar Bacterias Lácticas.	15
Cuadro 6. Pruebas Físico-químicas del queso.	20
Cuadro 7. Pruebas Físico-químicas de la leche.	21
Cuadro 8. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento.	22
Cuadro 9. Resultados físico-químicos de la leche cruda y queso en Paipa en diferentes días de maduración de las diferentes empresas de los dos municipios.	23
Cuadro 10. Comparativo de promedios de los recuentos microbiológicos en leche y queso entre fábricas artesanales y semiindustriales.	24

Cuadro 11. Porcentaje de cocos y bacilos encontrados en cada uno de los medios de cultivo de los dos municipios.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Pared celular de la Bacteria	5

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estadística Descriptiva de los recuentos microbiológicos en leche y queso Paipa en fabricas artesanales y semiindustriales.	28
Tabla 2. Estadística Descriptiva de los recuentos microbiológicos en leche y queso Paipa en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá)	30

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Comparación del crecimiento de bacterias en leche en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial	25
Gráfica 2. Comparación del crecimiento de bacterias en queso de 1 día en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial.	25
Gráfica 3. Comparación del crecimiento de bacterias en queso de 5 días en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial.	26
Gráfica 4. Comparación del crecimiento de bacterias en queso de 10 días en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial.	27
Gráfica 5. Crecimiento en promedio de bacterias en queso Paipa y leche cruda en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá).	29
Gráfica 6. Porcentaje de bacterias aisladas de cada agar o medio de cultivo de los dos municipios.	32

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. PRUEBA DE LA CATALASA	44
ANEXO B. PRUEBA DE LA OXIDASA	45
ANEXO C. TINCION DE GRAM	46
ANEXO D. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE ACUERDO A OXIDASA, CATALASA, TINCIÓN DE GRAM. Y FORMA DEL MUNICIPIO DE PACHO (CUNDINAMARCA)	47
ANEXO E. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE ACUERDO A OXIDASA, CATALASA, TINCIÓN DE GRAM. Y FORMA DEL MUNICIPIO DE BELÉN (BOYACÁ)	52
ANEXO F. MÉTODO DE VAN GULIK	56
ANEXO G. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	57
ANEXO H. MÉTODO DE GERBER	58
ANEXO I. BACTERIA GRAM POSITIVA	59
ANEXO J. BACTERIA GRAM NEGATIVA	60
ANEXO K. MRS	61
ANEXO L. M17	62
ANEXO M. APT	63
ANEXO N. EMB	64

INTRODUCCIÓN

Al igual que en los demás sectores de la economía nacional, la producción agropecuaria en Colombia entra en una etapa decisiva que en buena parte marcará el futuro socioeconómico del sector, que a su vez será fundamental para los objetivos del progreso. El país está en proceso de vinculación a los nuevos acuerdos de comercio internacional; en el caso del sector de derivados lácteos el estar dentro del tratado de libre comercio obliga a ser más eficientes en cuanto a la calidad de los productos, ya que las barreras arancelarias no serán un impedimento, las exigencias sanitarias serán de gran importancia, por lo cual es necesario cumplir con los estándares que exigen las organizaciones internacionales dedicadas a regularizar los alimentos y de esta manera satisfacer las necesidades de los consumidores.

La fermentación de los alimentos por bacterias ácido lácticas es una de las formas más antiguas de conservación usadas por el hombre. Quizás lo más significativo en estas fermentaciones es la conservación de los alimentos perecederos resultantes de la producción de ácido láctico y otros metabolitos tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas.

Uno de los alimentos resultante de dichas fermentaciones es el queso Paipa, el cual es uno de los productos más representativos de nuestro país en cuanto a quesos semimadurados, desafortunadamente, este tipo de queso se produce en forma artesanal, haciéndolo riesgoso para la salud pública, debido a que la leche utilizada en este proceso no es sometida a tratamiento térmico.

Al realizar el proceso de pasteurización de la leche las características organolépticas del queso Paipa cambiarían; lo que se desea buscar e aislar e identificar las bacterias ácido lácticas que se encuentran naturalmente en la leche cruda y en el queso Paipa y así poder someter la leche cruda a un tratamiento térmico, adicionando en el proceso las bacterias ácido lácteas aisladas con el fin de mantener las características organolépticas del queso elaborado tradicionalmente.

Es indudable que la pasterización de la leche es una etapa que se debe tener como un punto crítico de control, para asegurar que los microorganismos patógenos presentes sean destruidos. Para poder pasterizar la leche se debe contar con cultivos o fermentos lácticos, que puedan desarrollarse en forma rápida, para que por competencia puedan reducir los posibles microorganismos indeseables, además de darle las características propias del producto.

En el mercado no se cuenta con el cultivo específico para la elaboración del queso Paipa, ni se ha caracterizado la flora benéfica presente. Por esto es importante contar con un cultivo que produzca características similares al queso.

Al aislar y conservar las bacterias ácido lácticas (BAL) por medio de la liofilización o congelación se espera se empleen para fermentar o crear cultivos de alimentos. Su uso más corriente se ha aplicado en todo el mundo a los productos lácteos fermentados, como el yogurt, el queso, la mantequilla, la crema de leche, el kefir y el kumis.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las bacterias ácido lácticas a partir de la leche cruda y queso Paipa en los Municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá).

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar las características físico-químicas de la leche cruda (contenido graso y pH) y del queso Paipa (contenido graso, pH y porcentaje de humedad).

Aislar las bacterias ácido lácticas nativas a partir de leche cruda y queso Paipa, producido en los Municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá).

Identificar las bacterias ácido lácticas por morfología celular, actividad de catalasa y oxidasa.

Conservar y mantener las bacterias para identificación genética.

2. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS

Son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistos inferiores. Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores: son células procariotas (su núcleo está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear (Madigan et. al, 2000)).

Las bacterias juegan un papel fundamental en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en fisiología celular y en genética. Las bacterias tienen diferentes tipos de morfología (Cuadro 1) como: cocos (esféricos), bacilos (bastón), espirilos (espiras). (Madigan et. al, 2000).

Estos distintos tipos de morfologías celulares deben de haberse originado por mecanismos evolutivos, a saber, por selección y estabilización adaptativa frente a las distintas presiones ambientales presentes en diferentes nichos ecológicos. (Iañez, 1998)

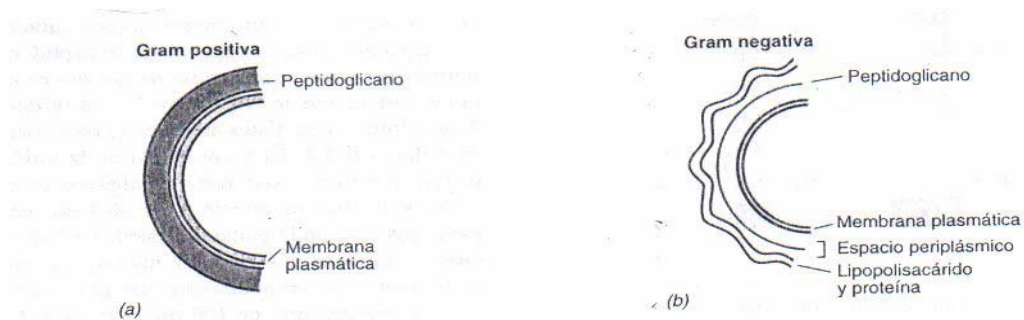
2.1.1. Clasificación de las bacterias Se basa en gran medida en características tales como forma, capacidad de formar esporas, métodos de producción de energía (glucólisis en las anaerobias, respiración celular en las aerobias) y reacción a la tinción de Gram. (Cuadro 2)(Figura 1). (Kimball, 1986).

Cuadro 1. Principales tipos de formas bacterianas.

FORMA	ASPECTO
1. Cocos	Células más o menos esféricas.
2. Bacilos	En forma de bastón, alargados, que a su vez pueden tener varios aspectos: <ul style="list-style-type: none"> • Cilíndricos • Fusiformes • en forma de maza, etc.
3. Espirilos	Atendiendo a los tipos de extremos, éstos pueden ser: <ul style="list-style-type: none"> • redondeados (lo más frecuente) • cuadrados • biselados • afilados
4. Vibrios	Forma de espiral, con una o más de una vuelta de hélice
5. Otros tipos de formas	Proyectada su imagen sobre el plano tienen forma de coma <ul style="list-style-type: none"> • filamentos, ramificados o no • anillos casi cerrados formas con prolongaciones

Fuente: lañez, 1998.

Figura 1. Pared celular de la Bacteria



(a y b) Diagramas de la estructura de paredes de células de Gram-positivas y Gram-negativas. Fuente: Madigan, 2000

Cuadro 2. Fundamentos de diferenciación de G+ y G-

G+	G-
<ul style="list-style-type: none"> ✓ El peptidoglucano representa el 90% de la pared, aunque pequeñas cantidades de <i>ácidos teicoicos</i> suelen también ser parte de la misma. ✓ La forma de la bacteria viene determinada por la longitud de las cadenas de peptidoglucano y el número y tipo de puentes intercatenarios que se establezcan. ✓ Algunos ácidos que contienen glicerol están unidos a los lípidos de la membrana denominados <i>ácidos lipoteicoicos</i>. ✓ La adición al medio de una concentración adecuada de un soluto que no es capaz de penetrar en la célula, como la sacarosa, establece un desequilibrio entre la concentración del soluto en el exterior y el interior de la célula. Cuando, en estas condiciones, se compensa la presión de turgencia, la lisozima todavía es capaz de digerir 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ El peptidoglucano constituye sólo alrededor del 10% de la pared, estando constituido el resto por una capa compleja. ✓ La forma de la bacteria viene determinada por la longitud de las cadenas de peptidoglucano y el número y tipo de puentes intercatenarios que se establezcan. ✓ Además del peptidoglucano, poseen una capa adicional en su pared que está compuesta de lipopolisacárido. Esta capa representa de hecho una segunda bicapa lipídica, si bien hay que decir que no consta solamente de fos-folípidos como la membrana plasmática, sino que contiene poli-sacáridos y proteínas. La presencia del lipopolisacárido justifica que la membrana externa se denomine generalmente capa de lipopolisacárido o simplemente LPS. ✓ Forman <i>esferoplastos</i> que a diferencia de los protoplastos habitualmente existen porciones de pared unidas a la

el peptidoglicano, pero no causa la lisis y se forma un <i>protoplasto</i> .	estructura que rodea a la membrana.
--	-------------------------------------

Fuente: Madigan, 2000

2.2 FERMENTOS LÁCTICOS

Los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca (Hassan y Frank, 2001). Estos productos acidificados ya se habían utilizado mucho tiempo antes como inóculo para producir queso, mantequilla y cultivos lácticos, pero las fermentaciones resultantes eran imprevisibles y de calidad desigual. La producción comercial de cultivos iniciadores y su uso crecieron rápidamente en la industria láctea debido a sus numerosas ventajas.

Actualmente, muchos productos lácteos se elaboran con cultivos lácticos iniciadores comerciales, que han sido aislados y seleccionados en función de la variedad, de las propiedades deseadas y de la velocidad de producción de ácido láctico. Entre las propiedades deseadas pueden incluirse la producción de sabores, aromas, resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, etc. (Morais, 2004)

2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Aunque las bacterias lácticas tienen características genéticas diversas, en general son microorganismos gram-positivos, no pigmentados, no forman esporas, y no reducen los nitratos, ni producen catalasa. Las bacterias lácticas son anaerobias pero aerotolerantes, y se caracterizan también por una producción de cantidades importantes de ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Eck, 1990, Stanley, 1998; Fox et al., 2000; Hassan y Frank, 2001). Las bacterias lácticas requieren aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de

crecimiento, y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Stanley, 1998; Hassan y Frank, 2001).

Según el criterio taxonómico genético hay 12 géneros de bacterias lácticas que comprende *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterián* y *Weissella* (Fox et al, 2000). De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácticos iniciadores; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Un quinto género, *Enterococcus*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos (Tzanetakis et al., 1989; Fox et al., 2000; Hassan y Frank, 2001).

Las bacterias lácticas pueden clasificarse también por un criterio taxonómico fenotípico que incluye la apariencia morfológica (bacilos o cocos) (Figura 2), fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativas o heterofermentativas), intervalo de temperatura de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes y no halotolerantes) (Eck, 1990; Axelsson, 1993, Mayra-Makmen et al., 1993; Fox et al. ,2000).

Las bacterias lácticas homofermentativas producen como mínimo 1,8 moles de ácido láctico por mol de glucosa fermentada, mientras que las bacterias lácticas heterofermentativas producen aproximadamente un mol de ácido láctico por mol de glucosa y cantidades «preciables de productos secundarios, principalmente gas carbónico, etanol y ácido acético» (Eck, 1990; Stanley, 1998).

Las bacterias lácticas empleadas en la industria láctea se pueden clasificar también según su temperatura óptima de crecimiento en mesófilas y termófilas. Las primeras crecen a una temperatura de 10°C a 40°C con un óptimo cercano a 30°C (Stanley, 1998). En la industria se utilizan principalmente las especies de los

géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Le. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*, *Le. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis* y *Leu. cremoris*.

El grupo de las termófilas presenta una temperatura óptima de crecimiento de 40-45°C y se emplean en yogures y quesos de pasta cocida. Las bacterias termófilas más importantes son *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), *Lb. helveticus* y *Lb. Delbrueckii* subsp. *lactis* (*Lb. lactis*) (Stanley, 1998).

2.4 LECHE CRUDA ENTERA

2.4.1 Generalidades. Teniendo en cuenta que la leche es una de las principales materias primas en la elaboración del queso Paipa, se ha tomado la definición del Decreto 2437 (Ministerio de Salud, 1983), donde se especifica como el producto de secreción normal de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, obtenido por uno o varios ordeños.

Cabe anotar que la leche utilizada para producción de lácteos debe cumplir con los requisitos que exige la legislación colombiana donde se determinan los parámetros físico-químicos y restricciones de la misma, también se especifica el uso de animales sanos libres de zoonosis, mastitis y demás enfermedades infecto contagiosas. (Benincore, 2004)

2.4.2 Características físico-químicas de la leche. La leche es un líquido blanco, opaco, dos veces más viscosa que el agua, de sabor azucarado y de olor poco acentuado. Sus principales características físico-químicas, de determinación inmediata, se presentan en Cuadro 3. (Veysseyre R., 2000)

Cuadro 3. Características físico-químicas de leche de vaca

Característica	Valor
Densidad a 15 °C	1.030 a 1.034 g/ml
Calor específico	0.93
Punto de congelación	-0.55°C
pH	6.5 a 6.6
Acidez °Dornic	16 a 18
Índice de refracción a 20°C	1.35

Fuente: Veysseyre R., 2000

2.4.3 Aptitud de la leche para la elaboración de queso. La aptitud de la leche para la elaboración de queso, depende de sus características organolépticas, físico-químicas y microbiológicas, por ello es importante realizar análisis físico-químicos en la leche, con el objetivo de obtener un queso estándar y de buena calidad. Las cuatro cualidades que debe tener la leche para su utilización en quesería son: coagular bien el cuajo, eliminar bien el suero, tener buen rendimiento quesero y presentar buena calidad microbiológica para obtener quesos de sabor y aroma característicos. (Madrid, 1993)

2.5 EL QUESO

El queso es un producto alimenticio o semisólido que se obtiene separando los componentes sólidos de la leche. Cuanto más suero se extrae, más compacto es el queso. El queso se elabora desde tiempos prehistóricos a partir de la leche de diferentes mamíferos, incluidos los camellos y los alces. Hoy en día, sin embargo, la mayoría de los quesos son de leche de vaca, a pesar del incremento que ha experimentado en los últimos años la producción de quesos de cabra y oveja. (ICTA – Banco Ganadero, 1994)

2.5.1 Clasificación. Según la legislación colombiana de los quesos deben cumplir con las características físico-químicas mencionadas en el Cuadro 4. (Ministerio de Salud decreto 002310 de 1986)

Cuadro 4. Características físico-químicas de los quesos semimadurados y madurados

Parámetro	Rico en grasa	Graso	Semigrasa	Magro
Materia grasa en extracto seco % m/m min.	60,0	45,0	20,0	5,0
Humedad % m/m máx.	Blando	Semiblando	Semiduro	Duro
	80,0	65,0	55,0	40,0

Fuente: Ministerio de Salud decreto 002310 de 1986.

2.6 GENERALIDADES DEL QUESO PAIPA

En Colombia, se inicio la manufactura del queso en varias zonas y su consumo se hacia en forma fresca, sin dejarlo madurar, presentándose variaciones, entre las distintas regiones, debidas principalmente a las condiciones climáticas. Así, en la costa atlántica se desarrollo el queso costeño, el cual tiene un alto contenido de sal para preservarlo y cuya fabricación se hacer con leche cruda; y en las áreas rurales de clima frío se desarrollo el queso campesino, queso fresco, y el quesito antioqueño; a partir del queso campesino se derivó un queso semimadurado, el Paipa. (Neira y Silvestri, 2005)

Tradicionalmente se elabora con leche cruda de vaca, en la cual las enzimas de las bacterias lácticas naturales y de otras bacterias del a leche se encargan del

proceso de maduración. Industrialmente se puede producir con leche pasteurizada y con cultivos lácticos especiales, controlando el proceso de maduración, evitando así posibles contaminaciones por bacterias no deseadas, que provocaron daños en sabor, aroma, textura y apariencia. (Neira y López, 2005)

El queso Paipa se considera de textura semidura, según la humedad en queso completo y en queso desengrasado (53,42 y 68,44 % respectivamente). El contenido de materia grasa (promedio 21,8%) está de acuerdo con los parámetros del ICTA, aunque la legislación nacional e internacional no hace referencia a este parámetro. De acuerdo al contenido de materia grasa en materia seca, el queso se clasifica como semigraso (47,34%) y esta dentro de los límites especificados por el Código Alimentarius y el MPS (45-60%). La proteína promedio fue de 25,25% y está de acuerdo a los reportes hechos por el ICTA (24,3%). El pH del queso Paipa fue en promedio de 5,17, correspondiente a los parámetros recomendados para quesos de pasta prensada (5,0-5,3). (Neira y Orozco, 2004)

El 60% del queso Paipa que se comercializa en Bogotá D. C., proviene del municipio de Pacho (Cundinamarca), de Belén el 25.70%, de Paipa el 14.19% y de Cerinza 1.17%. La comercialización del producto se realiza en mayor porcentaje en plazas de mercado mayoristas y minoristas (74%) y el resto en supermercados de cadena. Se utiliza mayormente en recetas culinarias y puede reemplazar en su uso al queso parmesano. (Neira y Orozco, 2004)

2.6.1. Agentes que participan en la maduración del queso.

2.6.1.1 Aireación. El oxígeno condiciona el desarrollo de la flora microbiana aerobia o anaerobia facultativa en el queso. La aireación asegurará las necesidades de oxígeno de la flora superficial de los quesos madurados.

2.6.1.2 Humedad. Además de favorecer el desarrollo microbiano participa en el proceso de maduración del queso, con alto contenido de humedad maduran rápidamente, mientras que con bajo contenido la maduración se prolonga considerablemente.

2.6.1.3 pH. No sólo condiciona el desarrollo microbiano, sino que a su vez resultado de éste. Los valores del pH del queso oscilan entre 4,7 a 5,5 en la mayoría de los quesos, y desde 4,9 hasta más de 7 en quesos madurados por hongos. Las primeras fases de fabricación determinan la velocidad de producción de acidez hasta la adición de cloruro de sódico, que junto a la pérdida de lactosa, determinan el pH más bajo del queso. Posteriormente, la actividad de bacterias y mohos determinan la degradación de los componentes de la cuajada a compuestos neutros o alcalinos que eleven el pH, cuyos niveles máximos se registran cuando la actividad proteolítica es muy fuerte, (FAO, 1985)

2.6.2 Los microorganismos y su relación con el pH. Las bacterias no formadoras de esporas tienen un papel importante entre los microorganismos asociados con la alteración de alimentos en toda la escala de pH. A pesar de las considerables diferencias en la composición de la pared celular de los microorganismos Gram. positivos y Gram. negativos, sus límites de tolerancia de pH son apenas ligeramente diferentes. Sin embargo, las bacterias responsables del deterioro de los alimentos ácidos (pH <4,5) son todas Gram. positivas. Las especies más frecuentemente implicadas pertenecen al género *Lactobacillus* y aparte de su importancia en la alteración, son las que se utilizan como agentes de la fermentación en productos lácteos y vegetales. Además, algunos *Lactobacillus* pueden producir ácidos débiles lipofílicos en cantidades suficientes para inhibir las *Enterobacterias*, (Castillo, 2000).

2.7 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS

Se dispone actualmente de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas (Cuadro 5) aunque sólo algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos (Stanley, 1998, Hassan y Frank, 2001). La capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas (catalasa, oxidasa y coloración de gram) y bioproductos (ácido acético, diacetilo, acetoina, gas carbónico, etc.) de las especies a aislar (Hassan y Frank, 2001).

Normalmente, los medios de cultivo más utilizados para aislar bacterias lácticas son: el M17 para *Lactococcus* spp. (Terzaghi y Sandine, 1975); MRS para *Lactobocillus* spp. (DeMAN et al., 1960); y el MSE para *Leuconostoc* spp. (Mayeux et. al, 1962). El agar APT resulto inadecuado debido a la presencia de colonias que no presentaban estas características bioquímicas. (Zamora, 2003)

Los medios más utilizados, para el aislamiento de enterobacterias enteropatógenas, de menos a más selectivos (inhibidores), son el agar eosina azul de metileno (EMB), el de Mac Conkey, el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), el de Hektoen, y el agar *Salmonella-Shigella* (SS). (Prats Y Mirelis, 1998).

Se ha observado que cambiando alguna condición del medio utilizado para aislar una especie en particular, éste sirve para otra; por ejemplo el M17 es utilizado a 37°C para el aislamiento de *S. thermophilus* y a 25°C para *Lactococcus* spp. Sin embargo, se ha comprobado también que muchos de éstos medios no son absolutamente selectivos, pudiendo ocasionar errores en la identificación de las especies (Pouillet et al., 1993; Centeno et al., 1996; Elortondo et al, 1998). Así, Centeno et al. (1996) al aislar las bacterias lácticas (BAL) presentes en leche de vaca, observaron que de las 106 cepas de BAL aisladas en agar M17, un 55% fueron lactococos y un 32% fueron enterococos; de las 118 cepas de BAL aisladas en agar MRS a pH 5.5, un 42% fueron lactobacilos y un 40% lactococos; y de las 78 cepas de BAL aisladas en agar MSE un 72% eran

leuconostoc. De acuerdo con los criterios de Coppola et al. (1988) estos resultados son muy bajos para medios de cultivos selectivos.

En quesos artesanos los microorganismos lácticos más aislados en los primeros días de maduración son *Lactococcus* spp. (Cogan et al, 1997). La dominancia de *Lactococcus* spp. en los primeros días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda es bien conocida (Núñez et al., 1976; Núñez, 1978; Litopoulon-Tzanetaki et al., 1992; Tornadijo et al., 1995; Centeno et al., 1996; Zarate et al., 1997; Estepar et al., 1999), y se puede explicar por el elevado número de estas bacterias en la leche. En las etapas posteriores del madurado (30 a 45 días), la proporción entre *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. se invierte y pasan a dominar *Lactobacillus* spp. (Núñez et al., 1976; Núñez, 1978; Ordóñez et al., 1977; Litopoulon-Tzanetaki et al., 1992; Mas, 1992).

En lo que respecta a microorganismos patógenos, durante los primeros 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda todos ellos pierden viabilidad debido al efecto combinado de los bajos valores de pH, concentración de sal, actividad de agua, bacteriocinas, etc. en el interior del queso (Johnson et al., 1990a, b, c).

Cuadro 5. Medios de Cultivo más utilizados para aislar las Bacterias Lácticas

MICROORGANISMOS	AGAR
<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS (De Man Rogosa y Sharpe)
<i>Lactococcus</i> spp.	M17 (Broth)
<i>Leuconostoc</i> spp.	MSE (Mayeux, Sandine y Elliker)
<i>Echerichae coli</i>	EMB (Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose)
<i>Leuconostoc</i>	APT (American Public Health Association)

Fuente: Adaptado de Marth, 2001

2.7.1 Catalasa. Se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno. Entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos

frescos almacenados en aerobiosis en refrigeración. La metodología se presenta en el Anexo A (Fung, 1997)

2.7.2 Oxidasa. Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. La metodología se presenta en el Anexo B. (Cortes, 2002)

La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para

- Identificar todas las especies de *Neisseria* (+)
- Diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

2.7.3 Tinción de Gram. Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en gram positivas y gram negativas según la composición de su pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fuscina ó safranina, quedando de color rosado. La metodología se presenta en el Anexo C. (Merck, 2005)

2.8 CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Existen una gran variedad de métodos de mantenimiento y conservación de los microorganismos cuya utilización va a depender en parte del tiempo previsto. Los objetivos de las colecciones de los microorganismos son mantener los cultivos viables a lo largo del tiempo, mantener los cultivos puros, sin contaminaciones, mantener los cultivos sin cambios en sus características, es decir estables. (nostoc.usal.es/sefin/MI/tema04MI.html)

2.8.1 Liofilización Proceso que consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por el estado intermedio líquido. Consta de tres fases: sobré congelación, desecación primaria y desecación secundaria. El sistema requiere tres componentes: mecanismo de congelación, bomba de vacío y una trampa de agua. (INDUSTRIAS CONMER, (nostoc.usal.es/sefin/MI/tema04MI.html)

2.8.2 Conservación en nitrógeno líquido (-196°C)

La actividad metabólica de los microorganismos puede ser reducida considerablemente almacenándolos a temperaturas muy bajas (-196°C) lo cual se puede lograr utilizando la refrigeración con nitrógeno líquido. Según Stanbury *et al.* (1995) este es el método más adecuado para la mayoría de las células. Hongos, bacterias, virus, algas, levaduras y cultivos de tejidos de animales y plantas han sido preservados satisfactoriamente mediante este método.

La técnica consiste en obtener el crecimiento del cultivo hasta lograr la máxima densidad celular en fase estacionaria, resuspender las células en un agente crioprotector (como por ejemplo glicerol al 10% estéril o dimetil sulfóxido DMSO al 10%) y congelar la suspensión en viales cerrados herméticamente (-35°C) antes

de conservarlos en nitrógeno líquido. El cultivo puede sufrir pérdidas de viabilidad durante las etapas de congelación y descongelación pero no se han apreciado una reducción importante durante el periodo de almacenamiento. Mediante esta técnica se puede lograr mantener la viabilidad de cultivos durante un periodo de varios años.

Stanbury *et al.* (1995) propuso la congelación con nitrógeno líquido como la técnica idónea o alternativa para conservar por largos tiempos aquellas células que no sobreviven el proceso de liofilización. Sin embargo, el equipo es caro aunque el proceso en sí es económico. El mayor inconveniente es que el nitrógeno líquido se evapora y debe ser reemplazado regularmente. Además, si el equipo falla la consecuencia puede ser la pérdida de la colección.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO

El experimento se realizó en el laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de La Salle sede La Floresta con muestras traídas de queso y leche cruda de los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá).

El municipio de Belén se encuentra ubicado en la Cordillera Oriental al norte del Departamento de Boyacá. Hidrográficamente se encuentra entre las Subcuencas de los Ríos Chicamocha y Suárez; a la primera pertenece el sector Sur-Sureste del municipio y al segundo el sector Norte-Noroccidente; posee altitudes que van desde los 2.600 hasta los 4.000 metros sobre el nivel medio del mar y una temperatura de 14°C. (belen-boyaca.gov.co)

El municipio de Pacho se encuentra localizado al Noroccidente del Departamento de Cundinamarca, y es cabecera de la Provincia del Rionegro, de la cual hacen parte también los municipios de La Palma, Yacopí, Caparrapí, El Peñón, Paima, Topaipí, Villa gomez y San Cayetano. Posee una temperatura de 19°C y una altura promedio de 2.136 msnm. La precipitación media mensual es de 116.9 mm y anual es de 1670 mm. (pacho-cundinamarca.gov.co)

3.2 DEFINICION DEL UNIVERSO Y MUESTRA

En Belén (Boyacá) se localizaron 4 productores de queso Paipa, donde es uno semiindustrial y 3 artesanales; en Pacho (Cundinamarca) se localizaron también 4 productores de queso Paipa donde 2 son semiindustriales y 2 son artesanales. Las muestras fueron cuatro de leche, cuatro de queso fresco de 1 día, cuatro de

queso semimadurado de 5 días y cuatro de 10 días de maduración. Las muestras provenían de una fábrica artesanal y la otra de fábrica semiindustrial de cada uno de los municipios.

3.3 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Selección de las muestras. Para obtener las muestras de queso Paipa y leche cruda, se establecieron contactos formales con las personas encargadas de las respectivas fábricas artesanales y semiindustriales.

Las muestras fueron escogidas totalmente al azar y fueron empacadas en bolsas herméticas selladas y guardadas en una caja de icopor con geles. La leche fue tomada de una cantina al azar, empacada en un frasco estéril y guardada en caja de icopor y una vez en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de La Salle sede La Floresta se mantuvieron en refrigeración hasta los análisis. El tiempo transcurrido entre toma de muestra y análisis es de un día.

3.3.2 Características fisicoquímicas de la leche y del queso Paipa. En el laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de La Salle sede La Floresta, se realizaron las pruebas fisicoquímicas (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Pruebas fisicoquímicas del queso.

PRUEBA	METODO
Contenido graso	Método de Van Gulik
pH	pH metro
% de Humedad	Determinador de humedad

Cuadro 7. Pruebas fisicoquímicas de la leche.

PRUEBA	METODO
Contenido graso	Método de Gerber
pH	pH metro

3.3.3 Aislamiento de las bacterias ácido lácticas. Posteriormente para el aislamiento se tomaron 10g de queso desde su parte central hasta la corteza con un bisturí previamente flameado, también se tomó 10 ml de leche cruda y con 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1% (pH 7.2, Difco) se homogenizaron durante un minuto en una licuadora. Se hicieron diluciones decimales y por duplicado desde 10^{-1} hasta 10^{-4} empleando el mismo diluyente. Se inocularon 100 μ L de cada una de las diluciones y se extendieron con ayuda de un distribuidor de células sobre la superficie de cada uno de los medios. (Cuadro 8)

Posteriormente, las siembras fueron incubadas a tres temperaturas diferentes: 32°C (APT y M17), 42°C (MRS) y 37°C (EMB) en aerobiosis; y a 32°C (MRS) en una atmósfera de anaerobiosis (sistema Gas-pack plus, BBL) todas durante 48 horas. Debido al poco crecimiento en MRS a 42°C se dejó a 32°C en anaerobiosis por 48 horas. Después se aislaron las colonias que mostraban distinta morfología y se purificaron por resiembra.

3.3.4 Identificación de bacterias ácido lácticas. Las colonias seleccionadas para identificación fueron caracterizadas mediante las pruebas de catalasa, oxidasa, coloración de Gram. y forma (cocos y bacilos) para seleccionar las colonias de las bacterias.

Cuadro 8. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de diferentes microorganismos

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO
Lactobacillus	MRS (Man, Rogosa y Sharpe)
Streptococcus	M17 (Broth)
Leuconostoc	APT (American Public Health Association)
Enterobacterias	EMB (Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose)

3.3.5 Conservación de las bacterias ácido lácticas por congelación en nitrógeno líquido (-196°C). Después de seleccionar las colonias para aislamiento, se prosiguió a conservar en tubos Eppendorf de 2 mL con caldo TSC (caldo triptona soya) y glicerol al 30%, se congelaron -36°C, después se procedió a congelarlas en nitrógeno líquido (-196°C), para conservación mientras se realiza la identificación molecular.

Se marcaron los tubos Eppendorf con letras de la A hasta la L donde A, B, C, D, E, F, G, H son del municipio de Pacho y I, J, K y L son de Belén y con el nombre de los agares o medios de cultivo de donde se aislaron, el día de maduración, la dilución y a la temperatura de incubación. (Anexos D y E)

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados microbiológicos de los cuatro productores de queso Paipa de los dos municipios, se expresaron como logaritmos de los recuentos microbianos y se analizaron mediante estadística descriptiva comparando el crecimiento en las fábricas artesanal y semiindustrial y en los dos municipios. (Tabla 1 y 2)

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 CARATERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA LECHE CRUDA Y EL QUESO PAIPA

Los resultados de las pruebas físico-químicas que se le realizaron a la leche cruda y al queso Paipa en diferentes días de maduración se muestran en la Cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados físico-químicos de la leche cruda y queso en Paipa en diferentes días de maduración de las diferentes empresas de los dos municipios.

MUESTRA	ARTESANAL						SEMIINDUSTRIAL					
	PACHO			BELEN			PACHO			BELEN		
	LA ENRAMADA			LÁCTEOS SAN ANTONIO			BONANZA			LACTEOS IBEL		
	% H	% MG	pH	% H	% MG	pH	% H	% MG	pH	% H	% MG	pH
Leche		2,5	6,8		3,5	6,75		3	6,7		2,6	6,75
Queso Día 1	62,3	34,6	6	62,5	34	6,4	63,5	25	6,5	62,3	29	6,2
Queso Día 5	61,9	35,5	5,7	62	32	5,8	60,2	24	5,85	61,2	32	6,01
Queso Día 10	60,2	36	5,45	61,9	35	5,6	55,8	27	5,65	60,4	33	5,75

Según Veysseyre R. (2000), el pH de la leche esta dentro del rango establecido; el Decreto 2310 de 1986 afirma que de acuerdo a los resultados obtenidos en la materia grasa el queso se puede clasificar en semigraso; de acuerdo con la FAO (1985), la Humedad además de favorecer el desarrollo microbiano participa en el proceso de maduración del queso, con alto contenido de humedad maduran rápidamente, mientras que con bajo contenido la maduración se prolonga considerablemente.

4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS

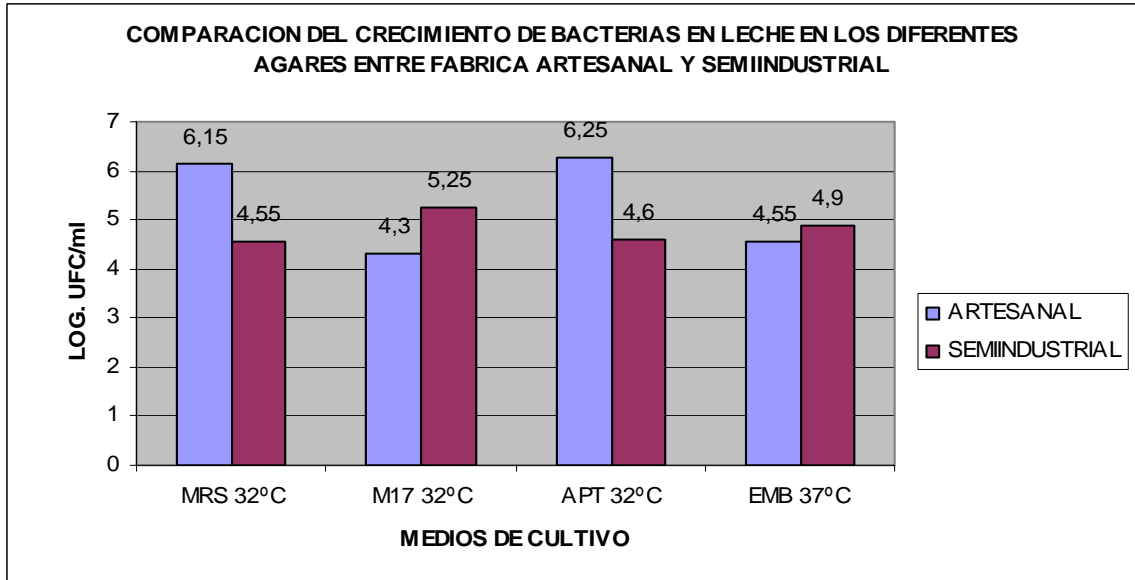
Los resultados de los procedimientos de las BAL aisladas de las diferentes empresas (artesanal y semiindustrial) y con diferentes medios de cultivo de los dos municipios se representan en la Cuadro 10 y en las Graficas 1, 2, 3 y 4.

Cuadro 10. Comparativo de promedios de los recuentos microbiológicos en leche y queso entre fábricas artesanales y semindustriales

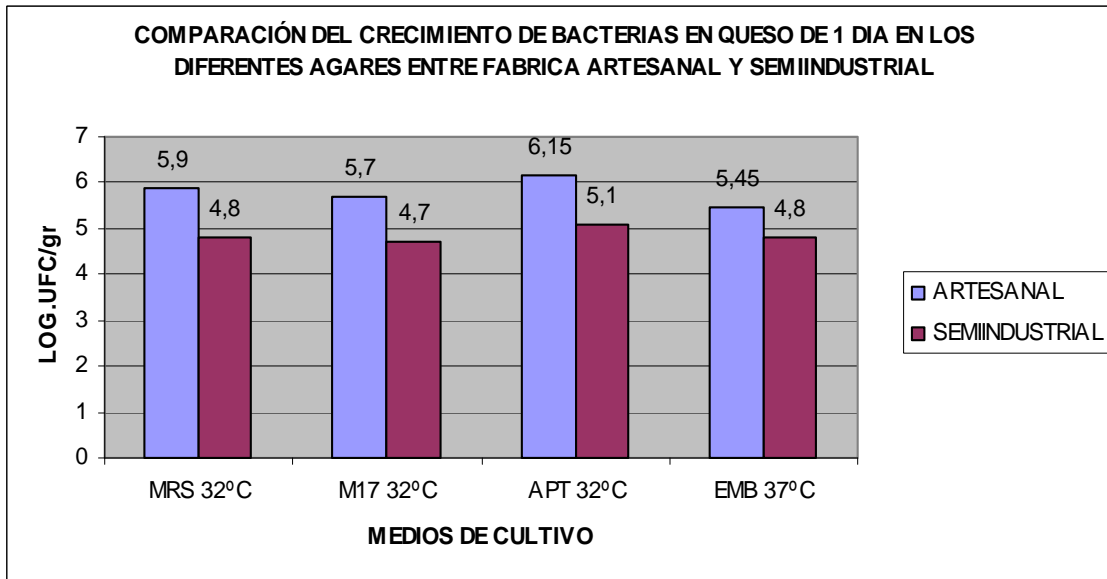
MEDIO	MUESTRA	DÍAS DE MADURACIÓN	PROMEDIO LOG.10 UFC/g	
			ARTESANAL	SEMIINDUSTRIAL
MRS 32°C	Leche	1	6,15	4,55
	Queso Día 1	1	5,9	4,8
	Queso Día 5	5	6,45	5,4
	Queso Día 10	10	5,7	5,55
M17 32°C	Leche	1	4,3	5,25
	Queso Día 1	1	5,7	4,7
	Queso Día 5	5	6	5,75
	Queso Día 10	10	5,7	5,45
APT 32°C	Leche	1	6,25	4,6
	Queso Día 1	1	6,15	5,1
	Queso Día 5	5	6,3	5,25
	Queso Día 10	10	3,9	5,45
EMB 37°C	Leche	1	4,55	4,9
	Queso Día 1	1	5,45	4,8
	Queso Día 5	5	4,75	5,05
	Queso Día 10	10	5,25	4,75

Según Centeno et al. (1996) al aislar las bacterias lácticas (BAL) presentes en leche de vaca, en agar MRS a pH 5.5, un 42% fueron lactobacilos y un 40% lactococos. Esto concuerda con los datos obtenidos para MRS (6,15 LOG UFC/g) en las fabricas artesanales; esto puede deberse a que el pH de la leche esta en 6,5; y APT (6,25), confirmando lo descrito para este medio Zamora (2003) resulta inadecuado para el aislamiento de bacterias ácido lácticas debido a la presencia de colonias que no presentaban estas características bioquímicas. (Grafica 1)

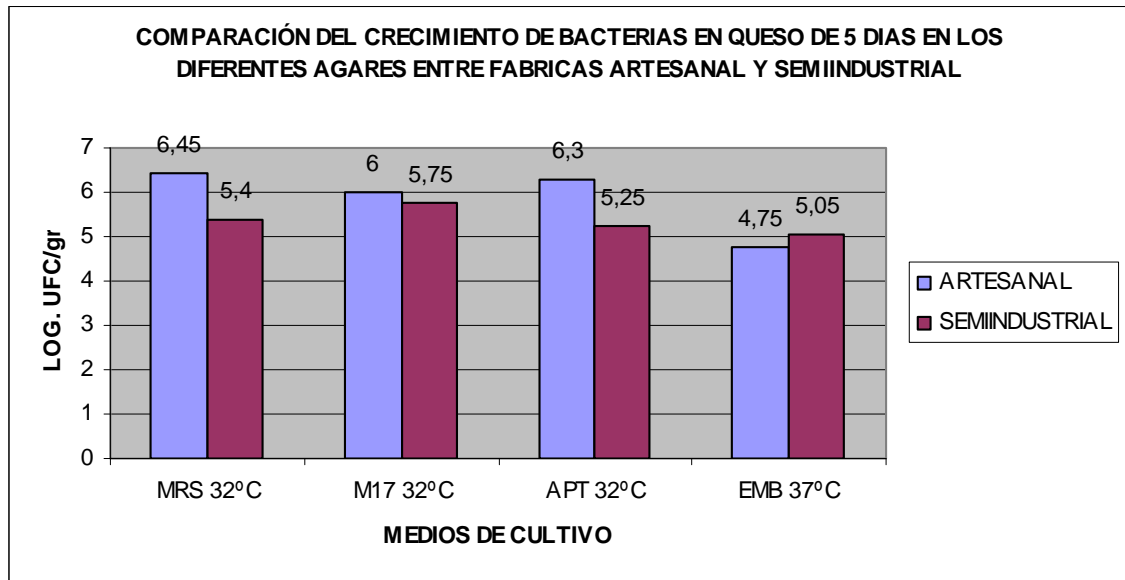
Grafica 1. Comparación del crecimiento de bacterias en leche en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial



Grafica 2. Comparación del crecimiento de bacterias en queso de 1 día en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial



Grafica 3. Comparación del crecimiento de bacterias en queso de 5 días en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial

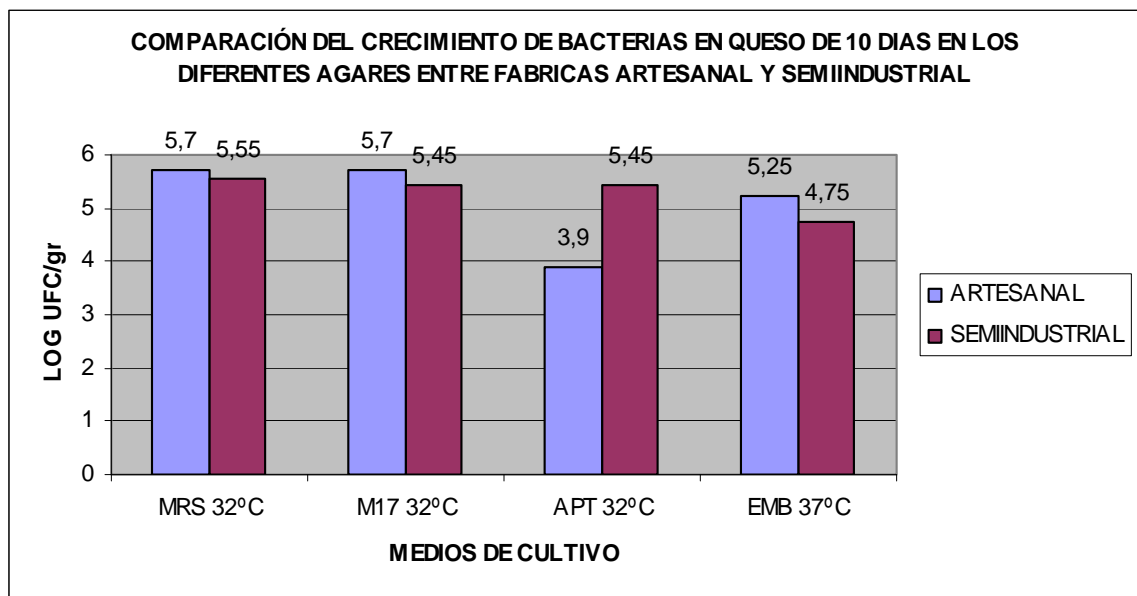


Según Cogan et al (1997) y Estepar et al. (1999) en quesos artesanos los microorganismos lácticos más aislados en los primeros días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda es bien conocida, y se puede explicar por el elevado número de estas bacterias en la leche son *Lactococcus* spp. En las fábricas artesanales la maduración tanto de un día como de cinco días presenta mayor crecimiento de bacterias en todos los agares o medios de cultivo utilizados para el aislamiento en comparación con las semiindustriales. Lo cual en general se observa un mayor crecimiento en todos los medios con excepción de las enterobacterias. (Graficas 2 y 3)

En las etapas posteriores del madurado, la proporción entre *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. se invierte y pasan a dominar *Lactobacillus* spp. dice Núñez et al. (1976); Núñez (1978); Ordóñez et al. (1977); Litopoulon-Tzanetaki et al. (1992) y Mas, M. y González-Crespo, J (1992). El crecimiento de bacterias en los dos tipo de fabricas (artesanal y semiindustrial) se mantienen casi iguales en todos los agares utilizados a pesar que los agares o medios de cultivo que deben tener el mayor recuento bacteriano son M17

y APT. En el medio EMB en las empresas artesanales el crecimiento elevado posiblemente puede ser por manejo en el proceso de maduración (Grafica 4)

Grafica 4. Comparación del crecimiento de bacterias en queso de 10 días en los diferentes agares entre fábricas artesanal y semiindustrial



Johnson et al. (1990a, b, c) dice que en lo que respecta a microorganismos patógenos, durante los primeros 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda todos ellos pierden viabilidad debido al efecto combinado de los bajos valores de pH, concentración de sal, actividad de agua, bacteriocinas, etc. en el interior del queso. Lo que comprueba la disminución de UFC/g en queso a los 10 días de maduración.

Según la estadística descriptiva empleada para el análisis de los resultados del recuento bacteriano el coeficiente de correlación es (-0,10); el cual indica que la relación es muy débil entre los dos tipos de fábricas, por lo tanto hay diferencias en el recuento microbiano de los diferentes agares utilizados a diferentes tiempos de maduración; esto puede llegar a ser por la diferencia en la tecnología implementada en los dos tipos de fábricas. Si el coeficiente de correlación hubiera sido cercano o

igual a (-1.00) esto indicaría que hay una relación fuerte entre los dos tipos de fábricas y por lo tanto no habría diferencias entre ellas.

Los resultados de la estadística descriptiva entre las fábricas artesanales y semiindustriales se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Estadística Descriptiva de los recuentos microbiológicos en leche y queso Paipa en fábricas artesanales y semiindustriales

<i>ARTESANAL</i>		<i>SEMIINDUSTRIAL</i>	
Media	5,53125	Media	5,084375
Error típico	0,193588642	Error típico	0,09261465
Mediana	5,7	Mediana	5,075
Moda	5,7	Moda	4,8
Desviación estándar	0,77435457	Desviación estándar	0,37045861
Varianza de la muestra	0,599625	Varianza de la muestra	0,13723958
Curtosis	-0,279352477	Curtosis	-1,19275961
Coeficiente de asimetría	-0,887595329	Coeficiente de asimetría	0,18197719
Rango	2,55	Rango	1,2
Mínimo	3,9	Mínimo	4,55
Máximo	6,45	Máximo	5,75
Suma	88,5	Suma	81,35
Cuenta	16	Cuenta	16
Mayor (1)	6,45	Mayor (1)	5,75
Menor(1)	3,9	Menor(1)	4,55
Nivel de confianza(95,0%)	0,412624422	Nivel de confianza(95,0%)	0,19740346

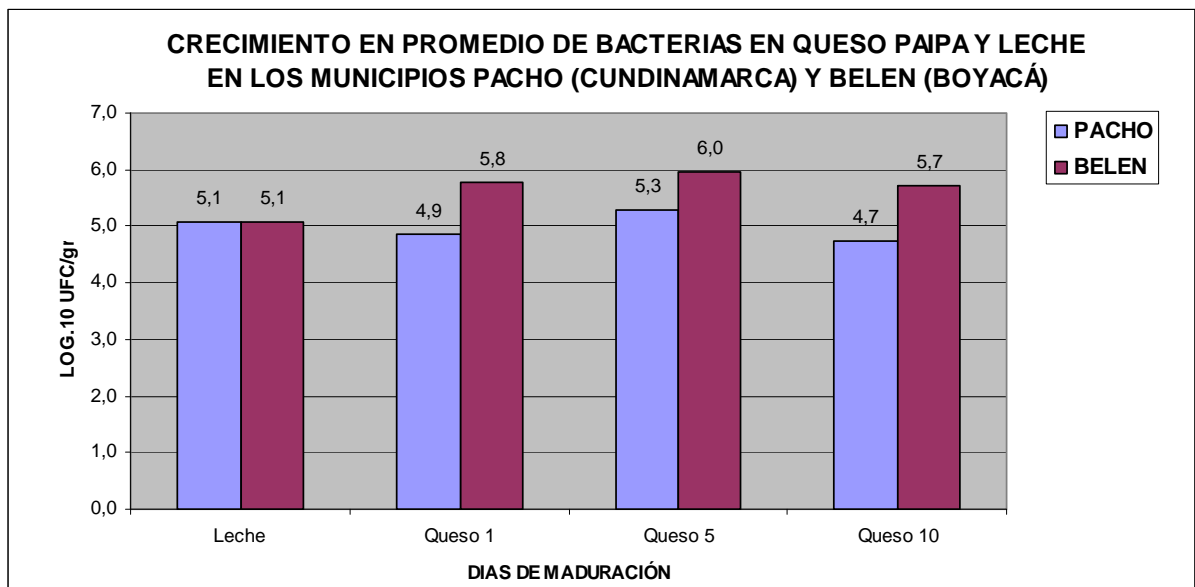
	<i>ARTESANAL</i>	<i>SEMIINDUSTRIAL</i>
<i>ARTESANAL</i>	1	
<i>SEMIINDUSTRIAL</i>	R2 -0,10334372262425	1

El promedio, la moda y la mediana son mayores posiblemente debido a que en las primeras fases de producción son en las que se encuentran las condiciones ideales para el crecimiento de bacterias (FAO, 1985) y en las fabricas artesanales estos procesos son más lentos que en las semiindustriales.

La desviación estándar es mayor en las fabricas artesanales ya que el promedio es mayor (5.53) y la desviación es también mayor (0.77) por lo tanto da un rango mayor mientras que en las fabricas semiindustriales el promedio, la desviación son menores (5.08 y 0.37, respectivamente) por lo cual da un rango menor. Todos los datos se trabajaron bajo un nivel de confianza del 95%.

En Grafica 5 se encuentra el comparativo del promedio entre los dos municipios Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá).

Grafica 5. Crecimiento en promedio de bacterias en queso Paipa y leche cruda en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá)



Con respecto a la leche cruda se puede observar su crecimiento fue similar tanto en los dos municipios como en los agares o medios de cultivo utilizados para tal fin. El municipio de Belén (Boyacá) tuvo mayor recuento bacteriano en queso Paipa, en los diferentes tiempos de maduración en todos los agares o medios de cultivo utilizados para el aislamiento; posiblemente esto se puede deber a que las condiciones de las fábricas artesanales en este municipio son menos tecnificadas que en las semiindustriales.

Según la estadística descriptiva empleada para el análisis de los resultados del recuento bacteriano el coeficiente de correlación es (-0.05); el cual indica que hay una relación muy débil entre los dos municipios; esto posiblemente es debido a que en el municipio de Belén (Boyacá) se encuentran poco tecnificado en cuanto el proceso de elaboración y maduración de los quesos. (Tabla 2)

Tabla 2. Estadística Descriptiva de los recuentos microbiológicos en leche y queso Paipa en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá)

<i>PACHO</i>		<i>BELEN</i>	
Media	4,9875	Media	5,487152778
Error típico	0,121513888	Error típico	0,329206404
Mediana	4,96875	Mediana	5,74375
Moda	#N/A	Moda	#N/A
Desviación estándar	0,243027776	Desviación estándar	0,658412809
Varianza de la muestra	0,0590625	Varianza de la muestra	0,433507427
Curtosis	-1,03968254	Curtosis	3,579054739
Coficiente de asimetría	0,367388928	Coficiente de asimetría	-1,857768065
Rango	0,5625	Rango	1,438888889
Mínimo	4,725	Mínimo	4,511111111
Máximo	5,2875	Máximo	5,95
Suma	19,95	Suma	21,94861111
Cuenta	4	Cuenta	4
Mayor (1)	5,2875	Mayor (1)	5,95
Menor(1)	4,725	Menor(1)	4,511111111
Nivel de confianza(95,0%)	0,386711424	Nivel de confianza(95,0%)	1,047681705

	<i>PACHO</i>	<i>BELEN</i>
PACHO	1	
BELEN	R2 -0,0539237046543376	1

Según Eck (1990); Axelsson (1993), Mayra-Makmen et al. (1993) y Fox et. al. (2000), las bacterias lácticas pueden clasificarse también por un criterio taxonómico fenotípico que incluye la apariencia morfológica (bacilos o cocos); intervalo de temperatura de crecimiento (mesófilas o termófilas); catalasa y oxidasa negativa con excepción de las *Enterobacterias* que son catalasa y oxidasa

positiva. En el Cuadro 11 se observa el porcentaje de cocos y bacilos encontrados en cada uno de los medios de cultivo de los dos municipios.

Cuadro 11. Porcentaje de cocos y bacilos encontrados en cada uno de los medios de cultivo de los dos municipios.

MEDIO	PACHO		BELEN	
	COCOS (%)	BACILOS (%)	COCOS (%)	BACILOS (%)
MRS	13%	8%	9%	5%
M17	13%	4%	16%	2%
APT	11%	5%	12%	0%
EMB	13%	18%	13%	18%

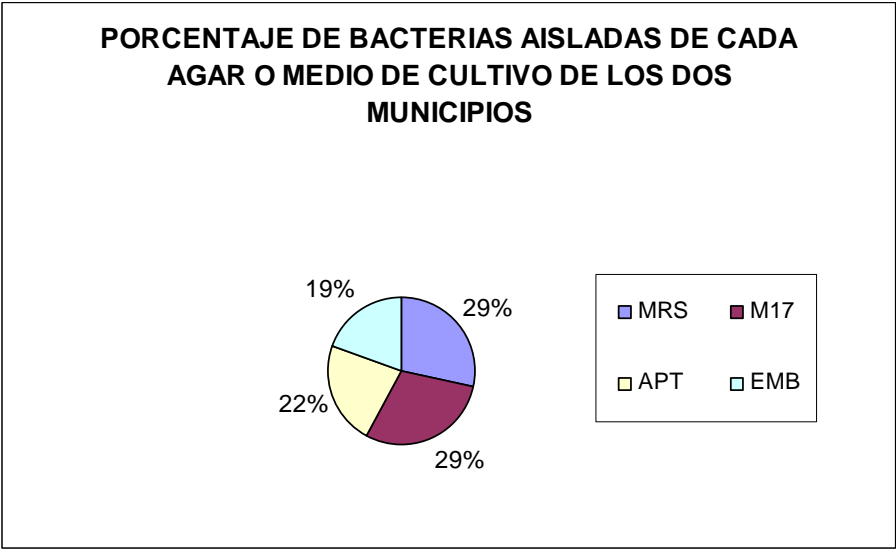
Se encontraron mayor cantidad de cocos tanto en el municipio de Pacho (Cundinamarca) como en Belén (Boyacá); en cuanto a los bacilos en municipio de Pacho (Cundinamarca).

4.3 CONSERVACION DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS POR CONGELACION EN NITRÓGENO LIQUIDO (-196°C)

Los resultados de las cepas que se conservaron en congelación por Nitrógeno líquido (-196°C) se observan en la Grafica 6.

Se conservaron 129 cepas de bacterias purificadas donde un 29% son de MRS (*Lactobacillus*), 29% son de M17 (*Streptococcus*), 22% son de APT (*Leuconostoc*) y 19% son de EMB (*Enterobacterias*); estos porcentajes son de los dos municipios. (Grafica 6)

Grafica 6. Porcentaje de bacterias aisladas de cada agar o medio de cultivo de los dos municipios.



5. CONCLUSIONES

- El queso Paipa producido en los municipios de Belén (Boyacá) y Pacho (Cundinamarca) es un queso semigraso y semiblando en 1, 5, 10 días de maduración.
- Los agares que tuvieron un mayor crecimiento microbiano proporcionando una gran cantidad de colonias a aislar en los diferentes días de maduración en las fábricas artesanales fueron MRS y APT con excepción del décimo día de maduración que fueron MRS y M17.
- La no pasteurización de la leche para la elaboración del queso Paipa tiene una incidencia directa en el recuento de enterobacterias en la leche y queso Paipa en las fábricas artesanales y semiindustriales.
- Las variaciones en el crecimiento en las fábricas semiindustriales no es significativo en los 1, 5, 10 días de maduración posiblemente por la utilización de una buena tecnología e implementación de BMP en la elaboración del queso.
- El agar MRS es efectivo a una temperatura de 32° en una atmósfera de anaerobiosis. Por lo tanto las colonias aisladas en este son de tipo mesófilas y posiblemente podrían estar entre los géneros: *Lactococcus* y *Leuconostoc*: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Le. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Le. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis* y *Leu. cremoris*.

- La tecnología implementada en cada una de los dos tipos de fábricas influyó en el crecimiento microbiano en todos los agares utilizados a 1, 5, 10 días de maduración.
- Las colonias obtenidas del agar EMB aunque fueron positivas a catalasa y oxidasa fueron aisladas y conservadas debido a que son las encargadas de darle el sabor, aroma y textura al queso Paipa.
- Es viable la conservación de las cepas por congelación en nitrógeno líquido (-196°C) por ser un método adecuado para la mayoría de las células que no sobreviven el proceso de liofilización y son preservadas satisfactoriamente por largos periodos de tiempo.

6. RECOMENDACIONES

- Se debería implementar campañas BMM y BMP en el ordeño, almacenaje; transporte de la leche, proceso de elaboración del queso y maduración.
- Las bacterias aisladas e identificadas se deben caracterizar molecularmente para conocer la microflora del queso y poderlas utilizar en el proceso tecnificado de elaboración del queso Paipa.
- Realizar estudios con diferentes proporciones de cada una de estas bacterias aisladas e identificadas, para determinar la proporción adecuada a inocular en la elaboración del queso Paipa.

7. BIBLIOGRAFIA

AMIOT, J. Ciencia y Tecnología de la Leche: Principios y Aplicación. Zaragoza. Acribia S.A. 1991

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S, von Wright A; Lactic acid bacteria. Ed. Marcel Dekker, New York, EEUU. 1993

BENINCORE R. Diana S., Caracterización y Estandarización del Proceso de Producción del Queso Paipa elaborado en Paipa, Boyacá. 2004

CASTILLO, T. Lactobacilos. 2000. Recuperado de <http://www.monografias.com/trabajos15/lactobasilos/lactobasilos/lactobasilos.shtm>

CENTENO, J.A., CEPEDA, A. y RODRIGUEZ-OTERO, J.L. Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cows' milk cheese. *Internacional Dairy Journal*, 6, 65-78. 1996

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/OMS). Leche y Productos Lácteos. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Segunda edición. Volumen 12. 2000

COGAN, T.M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P.S., FERNANDEZ, I., GÓMEZ, R., KALANTZOPOULOS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M.C., y RODRÍGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 54 (3), 409 – 421 1997

COPOLLA, S., PARTENE, E., DUMONTET, S., y LA PECCERELLA, A., The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. 1988. *Lait*, 68, 295-310.

CORTES, J.A. Prueba de la Oxidasa. 21 de Septiembre de 2002. Tomado de <http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/oxidasa.htm>

DeMAN, J., ROGOSA, M. y ELIZABEHT, M. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130. 1960

ECK, A. *El Queso*. Ed. Omega, Barcelona, España.

ELORTONDO, F.J.P., ECHOBARRIA, P.A., ALBISU, M. y BARCINA, Y. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewe's milk cheese. *Internacional Dairy Journal*, 8, 725-732. 1998

ESTEPAR, J., DeL MAR SÁNCHEZ, M., ALONSO, L. y MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: análisis of its indigenous lactic bacteria. *International Dairy journal* 9, 737-746. 1999

FAO-ERFCL. 1985. *Manual de elaboración de quesos*. Santiago, Chile.

FAO, 2004, En www.agrocadenas.gov.co

FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M. y MCSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of cheese science*, An Aspen Publication, USA. 2000

FUNG, D.Y.C. Overview of Rapid Methods of Microbiological Analisis. En: *Food Microbiological Analisis New Techcologies*. (eds.: Tortorello, M.L. y Gendel, S.M.). Ed.: Marcel Dekker, Inc., New York. pp: 1-25. 1997

HASSAN, A.N. y FRANK, J.F. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU. 2001

IAÑEZ, E. La Célula Procariota. 17 de agosto de 1998. Tomado de: www.fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-lanez-102-micro.htm.

ICTA – BANCO GANADERO. Guía para Producir Quesos Colombianos. Primera edición. Santa Fé de Bogotá. 1994.

INDUSTRIAS CONMER. En: www.creatublog.aquiguatemala.com/?p=70

JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. y JOHNSON, M. Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part I. Executive summary, introduce and history. Journal of Food Protection, 53, 441-452. 1990a

JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. y JOHNSON, M. Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part II. Microbiology. Journal of Food Protection, 53, 519-540. 1990b

JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. y JOHNSON, M. Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part III. Technology, discussion, recommendations, bibliography. Journal of Food Protection, 53, 610-623. 1990c

KIMBALL. Jhon W. Biología. Cuarta edición. Adisson-ewslwy iberoamericana. 1986. P. 638-649.

LITOPOULOU-TZANETAKI, E. y TZANETAKIS, N. Microbiology study of white-brined cheese made from raw goat milk. Food Microbiology, 9, 13-19. 1992

MADRID, A. Nuevo Manual de Tecnología Quesera. España: Mundiprensa. 1994.

MARTH, HE y STEELE, L. Applied dairy microbiology. Second edition. Ed. Marcel Dekker, INC. New York, EEUU. 2001.

McGRAW-HILL, I. Estadística para Administración y Economía. Tercera Edición. México. 2001

MERCK, COLOMBIA. En:

www.merck.com.co/mcsa/site/wmsp.nsf/vstRefConPorTit/ColorGram%20-%20Coloracion%20de%20Gram?opendocument

MINISTERIO DE SALUD. Disposiciones Sanitarias sobre Leche y sus Derivados. Decreto 2437 de 1983. Bogotá: Ministerio de Salud. 1983. p 9 – 11.

MINISTERIO DE SALUD. Resolución Número 002310 de 1986. Bogotá – Colombia.

MADIGAN, Michael T, MARTINKO, Jhon M, PARKER, Jack. Biology of Microorganisms. Southern Illinois University Carbondale. Ninth Edition. 2000. p 50 – 72

MAS, M. y GONZÁLEZ-CRESPO, J. Bacterias lácticas en el queso de los Inoes. Alimentaria, 28, 41-43. 1992

MAYEUX, J.V, SANDINE, W.E y ELLIKER, P.R. A selective médium for detecting leuconostoc organisms in mixed strain cultures. Journal Dairy Science. 45, 1962. p 655-656.

MAYRA-MAKINEN, A. y BIGRET, M. Industrial use and production of lactic bacteria. En: S. Salminen y A. von Wright; lactic acid bacteria. Ed. Marcel Decker, New York. EEUU. 1993.

NEIRA, E. y LOPEZ, J. Guía Técnica para la Elaboración de Productos Lácteos. Editorial Enzas Ltda.. Segunda edición. Bogotá, Colombia. 2001.

NEIRA, E. y OROZCO, V. Evaluación del queso Paipa: Calidad, comercialización y producción. 2004.

NEIRA, E. y SILVESTRI, J.A. Análisis de la calidad higiénica en la producción del queso paipa desde el ordeño hasta la maduración, en el municipio de Paipa, Boyacá. 2005.

NÚÑEZ, M. Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. Journal Dairy Research, 45, 501-508. 1978

NÚÑEZ, M. y MARTINEZ-MORENO, J.L., Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanos. Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, 4, 11-31, Madrid, España. 1976

ORDÓÑEZ, J.A. y BURGOS, J. Étude de la variété de fromage 'Ulloa'. I. Evolution de flore microbienne et des composants au tours de la maturation. Latit, 57, 150-163. 1977

POULLET, BY BLANCA, HUERTAS, M., SANCHEZ, A., CÁCERES, P. Y LARRIBA, G. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of César de Cáceres cheese. Journal of Dairy Research, vol. 60. 1993. p 123-127.

PRAST, G. y MIRELIS, B. Género *Shigella*: aspectos prácticos para el laboratorio de microbiología. Servei de Microbiologia. Hospital de Sant Pau, Barcelona. 1998 en: www.seimc.org/control/revi_Bacte/Rshigella.htm

ROBINSON, R.C. WILBEY, R.A. Fabricación de Queso. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza- España. 2002.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A. y HALL, S.J. Principles of Fermentation Technology. Elsevier/Pergamon publicatios. BPC Wheatons Ltd, Exeter. 1995. 357 pp.

STANLEY, G. Microbiología de los productos lácteos fermentados. En: R. Early; Tecnología de los productos lácteos. Segunda edición. Editorial Acribia Zaragoza-España. 1998.

TERZAGHI, E. y SANDINE W. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology. 1975. P 29, 807.

TORNADIJO, M.E., FRESNO, J.M., BERNARDO, A., MARTÍN.SARMIENTO, R. y CARBALLO, J. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's rwa milk cheese (Armada variety). Lait 75, 551-570. 1995

TZANETAKIS, N. y LITOPLOULOU-TZANETAKI, E. Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. Microbiology Aliments Nutrition. 1989. p 73-80.

VEISSEYRE, R. Lactologia Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche, Editorial Acribia. Zaragoza (España), 2000 p 2 – 3

ZAMORA, R. Lucero M. Aislamiento, Identificación y Conservación de Cultivos de Bacterias Lácticas Antagonistas de Microbiota Contaminante de Sangre de Matadero. 2003. p 44

ZÁRATE, V., BELDA, F., PÉREZ, C. y CARDELL, E. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. International Dairy Journal, 7, 635-641. 1997

belen-boyaca.gov.co

pacho-cundinamarca.gov.co

ANEXOS

ANEXO A

PRUEBA DE LA CATALASA

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo dos técnicas:

1. **Método del portaobjetos (recomendado):**

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
- Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

2. **Método del tubo de ensayo:**

- Agregar 1ml de H₂O₂ al 3% directamente a un cultivo puro de agar en slant densamente inoculado.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

ANEXO B

PRUEBA DE LA OXIDASA

Método en placa directa

- Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.
- Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos, mientras que con el de Gordon y McLeod es dentro de los 10-30 minutos.

ANEXO C

TINCION DE GRAM

Protocolo

- Recoger muestra estéril
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flamenado 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua.
- Agregar lugol y esperar 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Agregar alcohol y acetona y esperar 15 segundos.
- Enjuagar con agua.
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.

ANEXO D
CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE ACUERDO A OXIDASA,
CATALASA, TINCIÓN DE GRAM. Y FORMA DEL MUNICIPIO DE PACHO
(CUNDINAMARCA)

PACHO								
Muestra	Replica	No.	Tº	Pruebas	MRS			
					10 (-1)	10 (-2)	10 (-3)	10 (-4)
DÍA 1	D	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	D	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos
	C	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
DÍA 5	B	1	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		cocos		
	B	2	32	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
	B	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	B	3	32	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
	B	3	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		cocos		
	B	2	32	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
	A	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos
DÍA 10	A	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos
	A	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	

				Gram y forma			bacilos	
	C	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos
	D	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	G	2	42	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
LECHE	A	2	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	A	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	A	3	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	A	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
	A	1	42	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
	A	2	42	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
	A	3	42	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
							M17	
DÍA 5	A	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	B	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	B	3	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	B	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos y cocos	

	B	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
	B	1	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		bacilos		
	B	2	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		cocos		
	A	3	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	A	4	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	A	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	A	2	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		cocos		
	A	3	32	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
DÍA 10	A	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	B	2	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
LECHE	B	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	A	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	A	2	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	B	2	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
								APT
DÍA 1	A	2	32	Catalasa			-	

				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
	A	1	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		bacilos		
	A	2	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma		bacilos		
	D	2	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
DÍA 5	B	1	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma			cocos	
	B	2	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma			cocos	
	B	2	32	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
	B	3	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma			bacilos	
	C	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	D	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
DÍA 10	B	5	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	C	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	D	2	32	Catalasa		-		
				Oxidasa		-		
				Gram y forma			cocos	
	D	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
LECHE	B	3	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos

	C	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
					EMB			
DÍA 1	D	2	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
DÍA 5	B	1	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	B	2	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	B	2	37	Catalasa	-			
				Oxidasa	-			
				Gram y forma	cocos			
DÍA 10	A	1	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	C	1	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	D	2	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
LECHE	C	2	37	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos

ANEXO E
CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE ACUERDO A OXIDASA,
CATALASA, TINCIÓN DE GRAM. Y FORMA DEL MUNICIPIO DE BELÉN
(BOYACÁ)

BELEN								
Muestra	Replica	No.	Tº	Pruebas	MRS			
					10 (-1)	10 (-2)	10 (-3)	10 (-4)
DÍA 1	J	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	I	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
DÍA 5	I	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	J	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	I	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	K	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
DÍA 10	L	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			bacilos	
LECHE	I	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	J	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	

				Gram y forma			cocos	
	L	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	L	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos
								M17
DÍA 1	I	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	I	2	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
DÍA 5	I	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	J	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	L	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	L	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
DÍA 10	I	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	J	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	J	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos

	I	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	J	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	L	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
LECHE	J	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	I	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				bacilos
	L	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				bacilos
							APT	
DÍA 1	I	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	J	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	I	2	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma			cocos	
	J	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
DÍA 5	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	K	2	32	Catalasa			-	

				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	L	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
DÍA 10	J	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
LECHE	I	1	32	Catalasa			-	
				Oxidasa			-	
				Gram y forma				cocos
	I	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
	K	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				cocos
							EMB	
DÍA 10	J	1	32	Catalasa				-
				Oxidasa				-
				Gram y forma				bacilos

ANEXO F

MÉTODO DE VAN GULIK

Se introduce ácido sulfúrico densidad 1.825 g/ml ó 90-91% pureza hasta la mitad del butirómetro tapando completamente la muestra de 3 g de queso rallado y macerado previamente en un mortero con un poco de agua destilada se pasa a la artesita del butirómetro.

Calentar a baño Maria a 65°C invirtiéndolo, hasta la completa digestión del queso. En este momento, el líquido ha adquirido un color pardo violeta oscuro. Agregar 1 ml de alcohol amílico, agitar para que el alcohol se reparta uniformemente por todo el líquido y pueda incorporarse a la grasa. Introducir agua caliente por la abertura menor del butirómetro hasta que quede en el trazo 40. Cerrar la abertura menor con el tapón y agitar.

Colocar el butirómetro, con la tapa hacia abajo, en el baño Maria por lo menos 3 minutos y no más de 10. Centrifugar el butirómetro por 5 minutos. Retirar el butirómetro de la centrifuga, ajustando la tapa si es necesario, para llevar la columna de la grasa a la escala. Llevarlo a baño Maria por lo menos 3 minutos. Mantener el nivel de agua superior a la columna de grasa del butirómetro. Retirar el butirómetro del baño Maria, leer porcentaje de grasa directamente en la escala del butirómetro. (NEIRA Y LOPEZ, 2005)

ANEXO G

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Mezclar bien el producto después de molido finamente, pesar 2 g de queso, agregar 1 ml de agua a 60 a 80°C, distribuir el queso con varilla de vidrio en el crisol, de tal forma que quede bien esparcido sobre el fondo, lavar la varilla con 1 ml de agua caliente y colocar el crisol al calor a temperatura de 135°C hasta que el queso tome un color tabaco claro, enfriar en desecador durante 10 minutos y pesar. (NEIRA Y LOPEZ, 2005)

$\% \text{ humedad} = \text{pérdida de peso} / \text{peso muestra} \times 100$

ANEXO H

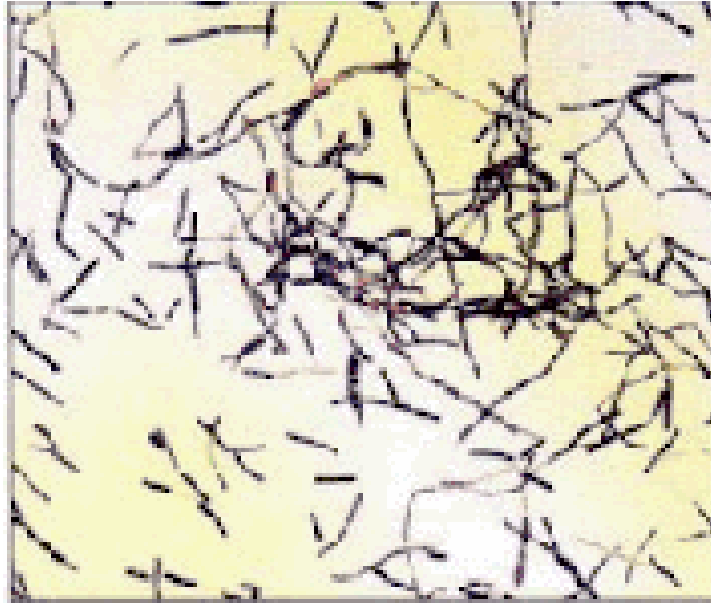
MÉTODO DE GERBER

Ajustar la temperatura de la muestra de leche de 20 a 30°C usando un baño María si es necesario. Mezclar la leche agitando la muestra varias veces, para asegurar una distribución homogénea de la grasa, sin provocar formación indebida de espuma.

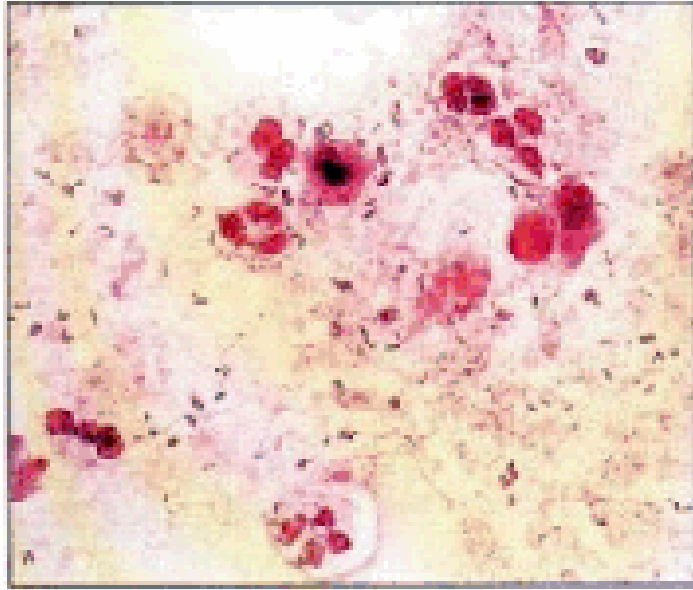
Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico 92% (densidad 1.825 g/ml) en el butirómetro, luego pipetear 11 ml de la leche al butirómetro, suavemente por las paredes apoyando la pipeta en el interior de cuello del butirómetro, cuidando de no mojar en cuello con la leche. Adicionar 1 ml de alcohol amílico y tapar el butirómetro sin remover el contenido.

Agitar suavemente el butirómetro, protegido con una bayetilla, hasta que el contenido este completamente mezclado y no se observen partículas blancas. Invertir una o dos veces durante el proceso. Centrifugar el butirómetro inmediatamente después de la agitación colocándolo con el bulbo hacia el exterior, por 5 minutos. Sacar el butirómetro de la centrifuga sin voltearlo y llevarlo a baño María a 65°C, por 5 minutos, manteniendo el nivel del agua sobre el nivel más alto de la columna de grasa en el butirómetro y realizar la lectura. (NEIRA Y LOPEZ, 2005)

ANEXO I
BACTERIA GRAM POSITIVA



ANEXO J
BACTERIA GRAM NEGATIVA

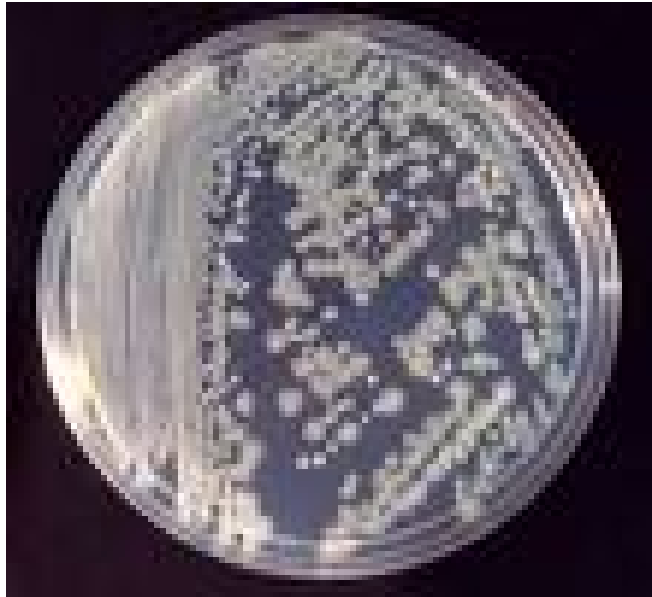


ANEXO K
MRS



ANEXO L

M17



ANEXO M
APT



ANEXO N
EMB

