Grasas y Aceites
Vol. 49. Fasc. 1 (1998), 38-41

Presencia de *Lactobacillus* spp. y *Bacillus licheniformis* en margarina con yogur

Por **Elisa González, R. Jordano, M.ª C. López, M.ª G. Córdoba y L. M. Medina***

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Campus Universitario Rabanales. Edificio C-1. Anexo.
Ctra. NIV Km. 396.A E-14071 - Córdoba (Spain) E-mail allmecal@uco.es

RESUMEN

Presencia de *Lactobacillus spp. y Bacillus licheniformis* en margarina con yogur.

Se ha realizado el análisis de treinta muestras de margarina con yogur. Tras el control inicial, los restantes análisis se efectuaron a los 0,26, 56, 88, 116 y 157 días de almacenamiento en refrigeración. No se detectó la biota constitutiva del yogur. Sí se demostró la presencia, en el 100% de las muestras, de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum,* siendo el primero ligeramente más numeroso, así como de *Bacillus licheniformis,* cuyos recuentos han sido en su mayoría comprendidos en el rango 10^3-10^4ufc/g, y sólo en el 10% de los casos fueron inferiores a 10^3ufc/g. Las muestras no mostraban signos de deterioro.

El trabajo llama la atención sobre la conveniencia de desarrollar una normativa específica que aclare las dudas surgidas en torno a los principales riesgos microbiológicos, así como a aspectos legales relacionados con la denominación del producto.

PALABRAS-CLAVE: Bacillus licheniformis – Lactobacillus casei – Lactobacillus fermentum – Margarina – Yogur.

SUMMARY

Occurrence of *Lactobacillus* spp. and *Bacillus licheniformis* in margarine with yoghurt.

The microbiological analysis of thirty samples of commercially produced margarine with incorporated yoghurt was carried out. After the initial control, the other tests were runned after 26, 56, 88, 116 and 157 days of refrigerated storage. Constitutive biota of yoghurt was not detected. Occurrence (100% of samples) of *Lactobacillus* spp. *(Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum,* being the first one slightly more numerous), and *Bacillus licheniformis,* which counts were mostly in a 10^3-10^4ufc/g range, and only in 10% of the cases were < 10^3 ufc/g. Samples did not show signs of deterioration.

Article calls upon about the convenience of developing a specific normative that clarifies the doubts about main microbiological hazards as well as the legal aspects regarding the product denomination.

KEY-WORDS: Bacillus licheniformis – Lactobacillus casei – Lactobacillus fermentum – Margarine – Yoghurt.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se tiende al consumo de alimentos con reducido contenido en grasas, menos colesterol y en definitiva hipocalóricos. Los fabricantes de yogur han satisfecho esta tendencia ofreciendo variedades con menor contenido graso, y los de emulsiones tipo margarina, disminuyendo los contenidos en grasa o en sal. Este hecho supone una disminución de algunos de los elementos que más contribuyen a la estabilidad microbiológica de estos sistemas, por lo que las buenas condiciones de producción se hacen más trascendentales, si cabe.

Actualmente se comercializan algunos productos a los que se incorpora yogur como ingrediente, tal es el caso de helados, pan, chocolate, mayonesa y margarina, sin que este hecho haya planteado hasta el momento una revisión de la normativa específica a aplicar a estos productos.

En el Codex Alimentarius de la FAO las definiciones de yogur y yogur aromatizado contienen el enunciado: «los microorganismos en el producto final deben ser viables y abundantes». En la mayoría de los estados de la Unión Europea (UE) se prescribe para el yogur un número mínimo de bacterias presentes. Por otra parte la comisión relativa a las denominaciones de venta de productos alimentarios de la UE, basándose en la definición de yogur antes citada y en las reglamentaciones de muchos países miembros, ha estimado que un producto que debido a un tratamiento térmico no presente bacterias viables, le puede ser legítimamente denegado por un estado miembro el derecho de llevar la denominación «yogur», u otra denominación que contenga una referencia a dicho término ya que podría inducir al consumidor a error sobre la verdadera naturaleza del producto, sin que un etiquetado correctivo adicional pudiera corregirlo (Glaser, 1992).

El objetivo primordial del presente trabajo es el estudio microbiológico de una margarina elaborada con yogur y su evolución con el tiempo de almacenamiento refrigerado.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Presentación, transporte y almacenamiento de las muestras

Se han analizado treinta muestras de margarina con yogur pertenecientes a un mismo lote comercial

(c) Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Licencia Creative Commons 3.0 España (by-nc)

correspondiente a una firma de amplia difusión en el mercado español. Las muestras se comercializaban en envases de cartón parafinado con un contenido aproximado de 500 gramos, y fueron conseguidas directamente de la factoría productora el mismo día de su fabricación y envasado.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en sus propios envases, en un vehículo debidamente refrigerado. Una vez en el laboratorio se tomaron cinco muestras con vistas a la realización del control inicial; las restantes se mantuvieron a 4-7°C hasta su análisis a los 26, 56, 88, 116 y 157 días de almacenamiento.

Dilución y preparación de las muestras

Se tomaron, con una cucharilla estéril 25 g de muestra, se depositaron en un matraz y se atemperaron a 45°C en un baño termostático con el fin de fundirla. Posteriormente, se añadieron al contenido del matraz 225 ml de diluyente atemperado a 45°C (citrato sódico al 2%, Mallinckrodt, INC. 0754). La solución de citrato sódico caliente funde los lípidos y neutraliza la fase acuosa de la margarina. De esta forma, se obtiene una dilución 1/10. A partir de ésta se prepararon diluciones decimales, con agua de peptona (Bacto-peptone, Difco 0768) al 0,1% estéril, con pH 6,80-7,00, hasta llegar a la dilución 10^{-6}.

Enumeración de la biota acidoláctica

Para la enumeración de la biota acidoláctica se ha empleado agar M_{17} (Oxoid) según Terzaghi y Sandine (1975) y agar MRS (Oxoid) acidificado a pH 5.4 a 25°C con una solución de ácido acético al 10%. Dichos medios son los habitualmente usados para la investigación de la biota constitutiva del yogur. El pH del agar M_{17} resulta de 7.0 ± 0.1. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 48h a 37°C en el caso del agar M_{17} y a 37°C durante 72 h en condiciones de anaerobiosis (H_2/CO_2) para las placas con agar MRS. En ambos casos, las colonias presuntamente positivas fueron confirmadas por observación al microscopio, e identificadas utilizando el sistema API (bioMeriéux sa, 69280 Marcy-l'Etoile, France) a nivel de especie. Dichas identificaciones fueron corroboradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia). Los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) de margarina.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre agar MRS, se identificaron dos especies de *Lactobacillus: Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* y *Lactobacillus fermentum,* mientras que sobre agar M_{17} se aisló una especie de *Bacillus,* en concreto *Bacillus licheniformis.* Los resultados correspondientes a estos microorganismos se reflejan en la Tabla I. En ningún caso se detectó la presencia de los microorganismos habituales integrantes de la biota láctea del yogur, hecho destacable teniendo en cuenta la descripción del producto.

Se ha detectado la presencia de lactobacilos en el 100% de las 30 muestras analizadas de margarina con yogur. En el 90% de ellas los recuentos fueron superiores a 10^3 ufc/g en tanto que en el 10% restante oscilaron entre 10^2-10^3 ufc/g. El máximo recuento ($7{,}7.10^3$ ufc/g) se obtuvo a los 25 días, y el mínimo ($8{,}8.10^2$ ufc/g), a los 157 días.

L. fermentum, si bien de forma irregular, presenta sus recuentos medios siempre por encima de 2.10^3 ufc/g tras los cuatro primeros controles (88 días), mostrándose por debajo de 1.10^3 ufc/g sólo al final de la experiencia (157 días). Estos valores se muestran durante toda la experiencia mínimamente superiores a los correspondientes a *L. casei* subsp. *pseudoplantarum,* salvo en el control realizado a los 56 días. En el caso de este último microorganismo, también ocurre

Tabla I
Medias de los recuentos de *Lactobacillus* spp. y *Bacillus licheniformis*

Días a 7°C	Total lactobacilos	*Lactobacillus fermentum* (ufc/g)	*Lactobacillus casei* (ufc/g)	*Bacillus licheniformis* (ufc/g)
Inicial	4,70E+03	2,72E+0,3	1,98E+0,3	2,40E+0,3
26	7,70E+03	5,20E+0,3	2,50E+0,3	2,80E+0,3
56	5,04E+0,3	2,44E+0,3	2,60E+0,3	4,20E+0,3
88	4,04E+0,3	2,16E+0,3	1,88E+0,3	3,40E+0,3
116	2,38E+0,3	1,32E+0,3	1,06E+0,3	3,20E+0,3
157	8,80E+0,2	5,60E+0,2	3,20E+0,2	9,98E+0,2
Media	4,12E+0,3	2,40E+0,3	1,72E+0,3	2,83E+0,3
Rango	8,80E+02-5,04E+03	5,60E+02-5,20E+03	3,20E+02-2,60E+03	9,98E+02-4,20E+03

(c) Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Licencia Creative Commons 3.0 España (by-nc)

que los recuentos medios sólo descienden del valor 1.10^3 ufc/g en el último control (157 días de almacenamiento en refrigeración).

La presencia de bacterias lácticas no puede ser considerada un hecho anormal, ya que es frecuente en la tecnología de la margarina conseguir una mayor acidez, empleando leche fermentada por cultivos lácticos. Castañón e Iñigo (1970) aislaron e identificaron *L. plantarum* a partir de margarinas alteradas. Moisseeva *et al.* (1979), después de almacenar la margarina durante 5 meses a -18°C, no detectaron un incremento de los recuentos de bacterias ácidolácticas. El-Gendy *et al.* (1979), en un estudio sobre la microbiota de mantequilla fresca y almacenada a -20°C determinaron la presencia de *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. solamente en muestras frescas.

Según Board (1988), *L. casei* se puede encontrar como microorganismo alterante en diversos alimentos con determinado nivel de acidez, entre ellos la mantequilla. Existen cepas, sin embargo, que participan en la maduración del queso, en el kefir y en yogures terapéuticos (Varnam y Sutherland, 1995).

L. fermentum, por su parte, se aisla de leche y productos lácteos y ha causado, junto a propionibacterias, grietas y agujeros en quesos Sbrinz de Argentina (Robinson, 1987). En opinión de Board (1988), *L. fermentum* se encuentra como microorganismo alterante en zumos de frutas, bebidas fermentadas y otros alimentos de naturaleza ácida, entre ellos la mantequilla. Efectivamente, debe hacerse notar que los lactobacilos, frecuentemente considerados comensales o participantes beneficiosos dentro de la ecología microbiana del ser humano, pueden en determinados casos causar efectos no deseados, e incluso ciertas enfermedades (caries dental, problemas vasculares de tipo reumático, septicemia, endocarditis infecciosa...), identificándose recientemente como potenciales microorganismos patógenos emergentes en pacientes de edad avanzada o inmunodeprimidos. No obstante, en la mayoría de los casos este riesgo es extremadamente bajo (Harty *et al.*, 1994). En ningún caso las muestras objeto de nuestra experiencia mostraron signos de deterioro.

Por su parte, *B. licheniformis* fue detectado en el 100% de las muestras. Los recuentos obtenidos han sido en su mayoría comprendidos en el rango 10^3-10^4 ufc/g; sólo el 10% de los recuentos fueron inferiores a 10^3 ufc/g. El valor más alto detectado fue de $4{,}2.10^3$ a los 55 días de almacenamiento y el menor de 10^3 ufc/g tras la fecha de caducidad.

Según Castañón e Iñigo (1970), en las margarinas se encuentran frecuentemente micrococos, y bacilos esporulados aerobios, microorganismos que podrían afectar a las grasas. En un estudio sobre la microbiota de margarina fresca y almacenada a -20°C, fue detectada en ambos casos la presencia de esporos bacterianos (El-Gendy *et al.*, 1979). No tenemos información sobre la presencia concreta de *B. licheniformis* en la bibliografía disponible sobre margarinas pero sí en otro tipo de emulsiones. Así, en un estudio microbiológico de mayonesas y salsas se aislaron 26 cepas de bacterias lipolíticas aisladas de distintas muestras, correspondiendo el 53,8% a bacilos Gram positivos esporulados. De ellos, el 64,28% se identificaron como *B. licheniformis* (Mohino *et al.*, 1981). Kurtzman *et al.* (1971) también encontraron *B. licheniformis* y *Bacillus subtilis* en salsas alteradas y no alteradas.

Los esporos de B. *licheniformis* han sido encontrados más en leche desnatada concentrada que en otros tipos de leche. La resistencia de los esporos de estos organismos muestra los efectos de la esterilización en el caso de los mesófilos. Dicha resistencia puede incrementarse por la adición de lactosa, y estabilizarse por la de sales y en ocasiones por proteínas (Behringer y Kessler, 1992). Una reducción en el valor del pH, disminuiría la termorresistencia de los esporos. En el caso del producto objeto de nuestro estudio, la presencia de este microorganismo podría ser atribuida al único ingrediente lácteo utilizado en la fórmula, leche desnatada, de la que se ha aislado frecuentemente. La razón de su supervivencia se basa en que los procesos térmicos destruyen las células vegetativas, dejando un sustrato sin competencia para el desarrollo de los esporos. Posteriormente, el calor puede suponer un estímulo para los mismos, provocándose su germinación (Robinson, 1987).

Según Jay (1996), la pasterización en productos lácteos eliminaría todos los microorganismos excepto las cepas termodúricas, principalmente estreptococos y lactobacilos, y las bacterias esporógenas del género *Bacillus.* Crielly *et al.* (1994) aislaron *B. licheniformis* de leche, productos lácteos y leche en polvo preincubados a temperatura ambiente. Giffel *et al.* (1996), sobre distintos alimentos (leche y chocolate, entre ellos), detectaron la presencia de *B. licheniformis* en el 10% de las muestras. Ralf *et al.* (1994), destacan que durante el almacenamiento en refrigeración de productos elaborados con leche pasterizada, dentro de la biota bacteriana contaminante resulta dominante el género *Bacillus,* cuyos esporos influyen en las propiedades nutritivas y sensoriales de la leche pasterizada por su actividad proteolítica y lipolítica (Pacova *et al.*, 1996). Esta capacidad de formar esporos que son altamente resistentes a condiciones desfavorables son de particular importancia en la industria láctea, donde *B. licheniformis,* al igual que otras especies, tienen la capacidad de sobrevivir a la pasterización. Se tiene la evidencia de que existe contaminación de *Bacillus* spp. tras la pasterización en el 25% de productos con crema pasterizada (Crielly *et al.*, 1994).

Pacova *et al.* (1996) detectaron a partir de leche diversas especies de *Bacillus,* siendo la especie más frecuente *B. licheniformis* con 58 cepas. Mientras que *B. cereus* se desarrolla preferiblemente a

(c) Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Licencia Creative Commons 3.0 España (by-nc)

temperaturas de refrigeración, *B. licheniformis,* así como *B. subtilis* y *B. pumilis* crecen en condiciones de mesofilia. Esto supone, considerado en conjunto, que si bien *B. licheniformis* no se multiplicaría durante su almacenamiento comercial o en el refrigerador de un consumidor, el riesgo de alteración permanece ya que se demuestra que se mantiene viable.

En las últimas décadas, ha ido aumentando el número de informes que relacionan a *Bacillus* spp. *(B. licheniformis* entre ellas) con toxiinfecciones alimentarias (Johnson, 1984; Claus y Berkeley, 1986; Kramer y Gilbert, 1989). Aunque se considera que *B. licheniformis* es un microorganismo no patógeno para el hombre, se han dado intoxicaciones alimentarias causadas por posibles toxinas relacionadas con dicho bacilo si bien en casos aislados y sólo en conexión con el consumo de comidas preparadas inapropiadamente. Este aspecto sí podría tener relevancia en el caso de productos como el que estudiamos. Sin embargo, De Boer y col. (1994) no hallan referencias que informen de alguna toxicidad o patogenidad asociada con la presencia de este microorganismo en los alimentos. Por otro lado, también existen casos de experiencias concernientes al uso industrial de cepas de *B. licheniformis* que han sido aprobadas y autorizadas en los Estados Unidos, Europa y Japón.

Por último, la ausencia de la biota constitutiva del yogur hace replantear la conveniencia de aceptar o no que el término «yogur» aparezca en el etiquetado de nuevos productos. Este hecho también ha sido puesto de manifiesto en otros preparados que en la actualidad están adicionados con «yogur» según su descripción comercial (López, 1996). Asimismo, sería planteable un ajuste de la normativa (Anon., 1982) especificando para este tipo de productos, que no incluya el recuento de aerobios mesófilos (improcedente si se pretende incluir yogur como parte de la receta), y sí algunos otros posibles contaminantes, entre ellos los de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus.*

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo (1982). –«Norma Microbiológica para grasas, margarinas y minarinas».– (Real Decreto) 3141/1982, BOE de 24-11-82.

Behringer, R. y Kessler, H. G. (1992). –«Influence of individual constituents on the heat resistance of *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus* spores».– Int. Dairy J. **2**, 243-255.

Board, R. G. (1988). –«Introducción a la Microbiología de los Alimentos».– Acribia, Zaragoza.

Castañón, M. y Iñigo, B. (1970). –«Estudio microbiológico de margarinas alteradas».– Alimentaria **34**, 13-20.

Claus, D. y Berkeley, R. C. W. (1986). –«Genus *Bacillus*».– In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. **2**, 1105-1139, Williams and Wilkinson. Baltimore, MD.

Crielly, E. M., Logan, N. A. y Anderton, A. (1994). –«Studies on *Bacillus* flora of milk and milk products».– J. Appl. Bacteriol. **77**, 256-263.

De Boer, A., Priest, F. y Diderichsen, B. (1994). –«On the industrial use of *Bacillus licheniformis:* a review».– Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**, 595-598.

El-Gendy, S. M., Kamal, M., Youssef, E., Hussein, M. y Hassan, M. E. (1979). –«Microflora of fresh and storaged margarine».– Egyptian J. Food Sci. **5** (1/2), 61-66.

Giffel, M. C., Beumer, R. R., Leijendekkers, S. y Rombouts, F. M. (1996). –«Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subfilis* in foods in the Netherlands».– Food Microbiol. **13**, 53-58.

Glaser, H. (1992). –«Living bacteria in yoghurt and others fermented milk products».– European Dairy Magazine **5**, 6-15.

Harty, D., Oakey, H., Patrikakis, M., Hume, E. y Knox, K. (1994). –«Pathogenic potential of lactobacilli».– Int. J. Food Microbiol. **24**, 179-189.

Jay, J. M. (1996). –«Modern Food Microbiology».– 5th Edition. Chapman & Hall, New York.

Johnson, K. M. (1984). –«*Bacillus cereus* in food-borne illness-an update».– J. Food Prot. **47**, 145-153.

Kramer, J. M. y Gilbert, R. J. (1989). –«*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species».– In Food-borne Bacterial Pathogens pp. 21-77. Marcel Dekker, New York.

Kurtzman, C. P., Rogers y Hesseltine (1971). Appl. Microbiol. **21**, 870-874. Citado por Mohino *et al.* (1981).

López, M. C. (1996). –«Dinámica de población microbiana en helados de yogur. Influencia en la vida útil».– Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Mohino, M., De la Rosa, M. C., Mosso, M. A. y Mohino, M. R. (1981). –«Estudio microbiológico de mayonesas y otras salsas».– Anales de Bromatología **33**(1), 27-34.

Moisseeva, E.V., Michoutchkova, L. A. y Petroukhina, E. P. (1979). –«Microbiological processes ocurring in frozen butter and margarine during refrigerated storage».– Bulletin de l'Institut International du Froid **59**(4), 1200-1201.

Pacova, Z., Vyhnalkova, J., Lukasova, J. y Holec, J. (1996). –«Identification of aerobic and facultatively anaerobic sporulating bacteria isolated during the primary milk collection».– Veterinary Medicine (Praha) **41**(1), 19-21.

Ralf, W., Heinz, K. y Wallnöfer, P. (1994). –«Identification of *Bacillus* strains isolated from milk and cream with classical and nucleic acid hybridization methods».– J. Dairy Res. **61**, 529-535.

Robinson, R. K. (1987). –«Microbiología Lactológica».–, Vol. 2. Microbiología de los Productos Lácteos. Acribia, Zaragoza.

Terzaghi, B. E. y Sandine, W. E. (1975). –«Improved medium for the lactic streptococci and theirbacteriophages».– Appl. Microbiol. **29**, 807-813.

Varnam, A. y Sutherland, J. (1995). –«Leche y Productos Lácteos. Tecnología, Química y Microbiología».– Serie 1. Alimentos básicos. Acribia, Zaragoza.

Recibido: Julio 1997
Aceptado: Noviembre 1997

(c) Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Licencia Creative Commons 3.0 España (by-nc)