

## Comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias ácido lácticas en el yogurt

Ana Graciela Briceño<sup>1</sup> y Raúl Martínez<sup>2</sup>

Dpto. Procesos Biológicos y Bioquímicos U.S.B. Inst. Ciencias y Tecnología de Alimentos U.C.V.

**RESUMEN.** La presencia de las bacterias lácticas del yogurt, activas y viables, en número no menor de  $10^6$  ufc/g de producto, es una condición establecida en las normas vigentes nacionales e internacionales. La viabilidad y la actividad de la flora láctica hasta el final de la vida útil del yogurt se ve influenciada por varios factores, lo que incide en la enumeración y detección de esta microflora. Para este estudio se seleccionaron los medios de cultivo MRS y agar LEE para el recuento total de bacterias lácticas; el M17 para el *S-salivarius* ssp *thermophilus* y el RCA para *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*. Se utilizaron diferentes metodologías para la detección y enumeración de esta flora que incluyó siembra directa a partir de diluciones seriadas; tratamiento térmico selectivo y un período de recuperación de las células en caldo Trypticase de Soya. Los recuentos se efectuaron desde el inicio del proceso de fermentación (0 y 3 horas) y durante el almacenamiento del producto (4, 12 y 21 días). Los resultados mostraron excelente recuperación de la flora láctica en los medios y técnicas evaluadas. En el RCA, los recuentos fueron significativamente inferiores, el agar LEE mostró una significativa mejor recuperación. El tratamiento térmico previo a la siembra, ejerció un efecto negativo reversible, mayor sobre los lactobacilos que sobre los estreptococos. La técnica de recuperación mostró su efecto en las muestras de yogurt durante el almacenamiento. Se realizaron determinaciones de pH y acidez durante el proceso de elaboración y durante el almacenamiento del producto. Se observó que a mayor tiempo de almacenamiento mayor disminución de pH, como consecuencia de la producción de ácido láctico, lo que se corresponde con la actividad de la flora láctica presente.

**SUMMARY.** Comparison of methodologies for the detection and enumeration of lactic acid bacteria in yogurt. It is generally agreed that the population of lactic acid bacteria in yogurt must be not less than  $10^6$  ufc/g. Viability of the lactic flora until the end of shelf-life is affected for many factors, which has incidence in the recuperability of this microflora. MRS and LEE agar were selected for the total count of lactic bacteria, the M17 was used for the *S salivarius* ssp *thermophilus* and the RCA for *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*. Different methodologies were used for detection and enumeration of this bacteria: direct plate count; thermal treatment and recuperation of the injured cells in Soy Trypticase broth. The enumeration was done at time zero and 3 hours after the start of the fermentative process and during storage at 4, 12 and 21 days. The results shown an excellent recuperability of the lactic flora in the selected media and methods that were used; however the enumeration was significantly lower in the RCA agar. The counts in the LEE agar shown a better recuperability. The thermal treatment affected negatively the counts of lactic flora and the repair method shown better results in the yogurt sample during storage. pH and acidity were determined at the beginning and during the storage period. It was observed a pH decrease because of the lactic acid production at the end of shelf-life.

### INTRODUCCION

Microbiológicamente el yogurt se puede definir como el producto final de una fermentación controlada de leche

completa o descremada con alto contenido de sólidos y con una mezcla simbiótica de *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* (1), anteriormente denominados *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, respectivamente.

Actualmente, el yogurt es considerado un alimento probiótico ya que es elaborado con microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso en el huésped, por mejorar el balance microbiano intestinal (2). La condición de viabilidad en el tracto intestinal es una de las características deseadas

1 Profesor agregado. Departamento Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Universidad Simón Bolívar.  
2. Profesor agregado. Instituto Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

para que ciertos microorganismos sean incluidos en la elaboración de alimentos probióticos(3).

La norma venezolana COVENIN (2393-86) establece que las bacterias lácticas del yogurt deben permanecer viables y estar presentes cada una en cantidad no menor a  $10^6$  ufc/g de producto, a partir del cuarto día de fabricación, hasta la fecha de su vencimiento, aproximadamente 21 días a 5°C. En la elaboración de yogurt es de considerable importancia mantener un balance adecuado de la flora simbiótica, estreptococcus y lactobacilos, lo cual es determinante en la calidad del producto final.

Se ha establecido que la proporción 1:1 es suficiente para garantizar un producto con «flavor» y textura deseada (4). La calidad del yogurt se debe en parte a la actividad de las bacterias lácticas, cuyo recuento en producto fresco debe ser entre  $10^8$  -  $10^9$  ufc/g de producto, pero por efecto de la acidez progresiva, desarrollada durante el almacenamiento, puede ocurrir una reducción de la población, atribuida al «stress» o daño subletal, ocasionado por el ácido láctico a la célula bacteriana (5), la cual puede quedar incapacitada para desarrollarse en los medios de cultivo normalmente usados para el recuento, por lo que se haría necesario incluir una etapa de recuperación en la metodología de enumeración de las bacterias lácticas.

En Venezuela, en los últimos años, se ha observado para algunas marcas comerciales, fluctuaciones significativas de la población de la flora láctica, que en algunos casos está por debajo del criterio establecido en la normativa venezolana (datos sin publicar). En un intento por relacionar esta problemática nacional y la metodología oficial, surge el presente estudio, cuyo objetivo fue evaluar diferentes metodologías y medios de cultivo para la detección y enumeración de las bacterias ácido lácticas del yogurt, en diferentes etapas, desde el proceso de fermentación, hasta el final de la vida útil del producto, almacenado a 5°C.

## MATERIALES Y METODOS

**Muestras:** Se utilizaron un total de 90 muestras comerciales de yogurt firme natural, obtenidas en planta en tres lotes diferentes de producción. En cada lote se seleccionaron seis unidades de 125 gramos para cada uno de los diferentes tiempos de muestreo, 0 y 3 horas del proceso de fermentación y a los 4, 12 y 21 días de almacenamiento a 5°C del producto terminado. Las muestras de yogurt de cada lote de producción fueron elaboradas con el cultivo madre (CM) recién preparado, evaluado en los laboratorios de la planta fabricante, al igual que las muestras correspondientes a las fases iniciales de elaboración del producto; mientras que el estudio del almacenamiento de las muestras de yogurt (4, 12 y 21 días a 5°C) se realizó en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela.

**Preparación de las muestras:** Las muestras de yogurt seleccionadas según el plan de muestreo (0 y 3 horas y 4, 12 y 21 días de almacenamiento) se sometieron a las siguientes condiciones: Sin tratamiento térmico, con tratamiento térmico y tratamiento térmico más un período de recuperación. Con las muestras sin tratamiento térmico se prepararon diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% y se procedió a realizar la siembra en placas de petri. Para las muestras con tratamiento térmico, se preparó la primera dilución en Caldo Trypticase de Soya y se colocó en baño de María a 60°C por 15 minutos y luego se continuó con la preparación de diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1%. Para el caso del tratamiento térmico más recuperación, la primera dilución de la muestra, además del calentamiento indicado (60°C por 15 minutos) se sometió a un período de recuperación de una hora a temperatura ambiente y luego se continuó con la preparación de diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% y la siembra en placas de petri.

**Medios de cultivo:** Se utilizaron los medios: De Man Rogosa Sharp (MRS); el agar diferencial LEE; el agar reforzado para clostridios (ARC) pH: 5,5 y el medio M17 con B-glicerofosfato, pH:6,8.

## Enumeración de Bacterias Lácticas

Para el recuento total de las Bacterias Acido Lácticas (BAL), Estreptococos y Lactobacilos, se utilizó el agar MRS, en el cual crecen ambos microorganismos sin diferencias apreciables y el medio diferencial Agar LEE que permite la identificación de la flora láctica por cambios de color, las colonias amarillas, se identifican como *S. salivarius* ssp *thermophilus* y las blancas como *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*.

Para el recuento de los estreptococos se utilizó el agar M17 con Beta-glicerofosfato y para los lactobacilos, el ARC. En ambos casos se utilizó la técnica de siembra en profundidad. La misma técnica se empleó con el MRS y para el agar LEE, se utilizó la técnica de siembra en superficie.

Las placas de agar LEE; MRS y ARC se incubaron a 37°C por 48,72 y 96 horas, respectivamente, en condiciones de anaerobiosis, utilizando la técnica GasPak. Las placas de M17 se incubaron en aerobiosis por 48 horas. En todos los casos se verificó la morfología de la flora láctica mediante la coloración Gram.

## Análisis Físico Químico

Se realizaron mediciones de pH y acidez, expresada como porcentaje de ácido láctico, tanto al cultivo madre recién preparado como a las 0 y 3 horas del proceso de fermentación y a los 4, 12 y 21 días de almacenamiento del yogurt. El pH se registró con un potenciómetro, calibrado con buffer pH: 4,0 y 7,0 y el porcentaje de ácido láctico se determinó mediante titulación de 10 gramos de muestra con NaOH 0,1 N y fenolftaleína como indicador.

**Tratamiento Estadístico:**

Los resultados obtenidos de las réplicas de los tres lotes de producción, se procesaron mediante el Análisis de Varianza Multifactorial y el análisis de rango por diferencia mínima significativa (Stat Graphic V. 6,0). Los resultados microbiológicos son reportados en términos de la media logarítmica del número de unidades formadoras de colonias por gramo de producto ( $\bar{X}$  log ufc/g).

**RESULTADOS Y DISCUSION**

Los resultados de la evaluación del CM al momento de la elaboración del yogurt, fueron : pH de 4,2; acidez titulable de 0,90% de ácido láctico y la población de la flora láctica entre  $5-10 \times 10^8$  ufc/g, a las tres horas de incubación, lo que refleja óptimas condiciones del cultivo madre, por cuanto su actividad medida en términos de pH y acidez y del número de bacterias viables obtenidas, se corresponden con los valores sugeridos por el fabricante del cultivo láctico liofilizado (CHR, Hansen's. Dairy Cultures) y con los criterios internos establecidos en la planta fabricante. Con estos resultados se puede asumir que el presente estudio se desarrolló sobre las bases de un producto elaborado bajo un proceso representativo y controlado, lo que garantiza la presencia de la flora láctica viable sujeta a ser evaluada y cuantificada.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del Recuento total de las BAL en agar LEE y MRS; en las Tablas 2 y 3 se presentan los resultados correspondientes a los recuentos de *S. salivarius* spp *thermophilus* y *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, respectivamente.

TABLA 1

RECuento TOTAL DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS ( $\bar{X}$  LOG UFC/G ) EN EL YOGURT DURANTE LA FERMENTACION Y EL ALMACENAMIENTO A 5 °C UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS MUESTRAS

Medios/ Tratamientos	TIEMPO				
	Fermentación		Almacenamiento		
	0 hr	3 hr	4 días	12 días	21 días
<b>LEE</b>					
Sin T.T.	6,7	10,5	10,5	9,7	8,7
Con T.T.	6,8	9,5	10,5	7,9	7,5
Con T.T. y T.R.	6,9	10,5	10,5	8,7	8,6
<b>MRS</b>					
Sin T.T.	6,1	7,5	8,8	8,7	7,5
Con T.T.	5,8	7,5	8,1	8,2	7,0
Con T.T. y T.R.	6,5	7,6	8,5	8,5	7,0

T.T.= Tratamiento Térmico (60 °C por 15 min.)

T.R.= Tratamiento de Recuperación (1 hr. en CTS a temperatura ambiente)

TABLA 2  
RECuento TOTAL DE *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* SSP. *THERMOPHILUS* ( $\bar{X}$  LOG UFC/G ) EN EL YOGURT DURANTE LA FERMENTACION Y EL ALMACENAMIENTO A 5 °C UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS MUESTRAS

Medios/ Tratamientos	TIEMPO				
	Fermentación		Almacenamiento		
	0 hr	3 hr	4 días	12 días	21 días
<b>LEE</b>					
Sin T.T.	6,6	10,5	10,5	9,3	7,7
Con T.T.	6,7	9,4	10,5	7,5	6,5
Con T.T. y T.R.	6,5	10,5	10,5	7,9	7,5
<b>M17</b>					
Sin T.T.	6,6	7,8	8,3	8,2	8,4
Con T.T.	6,7	7,7	8,6	8,1	8,0
Con T.T. y T.R.	7,0	8,3	8,6	8,2	8,3

T.T.= Tratamiento Térmico (60 °C por 15 min.)

T.R.= Tratamiento de Recuperación (1 hr. en CTS a temperatura ambiente)

TABLA 3

RECuento TOTAL DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SSP. *BULGARICUS* ( $\bar{X}$  LOG UFC/G ) EN EL YOGURT DURANTE LA FERMENTACION Y EL ALMACENAMIENTO A 5 °C UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS MUESTRAS

Medios/ Tratamientos	TIEMPO				
	Fermentación		Almacenamiento		
	0 hr	3 hr	4 días	12 días	21 días
<b>LEE</b>					
Sin T.T.	6,5	10,5	10,5	9,6	8,6
Con T.T.	6,3	9,3	10,5	7,9	7,5
Con T.T. y T.R.	6,9	10,5	10,5	8,6	8,4
<b>ARC</b>					
Sin T.T.	5,3	7,9	7,1	7,5	7,1
Con T.T.	5,0	7,8	7,0	6,5	5,0
Con T.T. y T.R.	5,6	7,1	7,6	7,7	7,2

T.T.= Tratamiento Térmico (60 °C por 15 min.)

T.R.= Tratamiento de Recuperación (1 hr. en CTS a temperatura ambiente)

Al observar los recuentos obtenidos en el Agar LEE y MRS (Tabla 1), se nota que en ambos casos la población láctica se mantuvo viable durante 21 días de almacenamiento refrigerado y en número mayor a  $10^6$  ufc/g de producto, valor establecido en la Norma venezolana COVENIN (6). Del tratamiento estadístico de estos resultados se desprende que hubo una recuperación significativamente mayor ( $p < 0,005$ ) en agar LEE que en MRS. Sin embargo, en ambos medios se observa una reducción de la población después del 4° día de almacenamiento a 5 °C, siendo ésta más acentuada en el agar LEE.

Con respecto al recuento del *S. salivarius* ssp *thermophilus*, en agar LEE y M17 (Tabla 2), se aprecia que a los 4 y 12 días de almacenamiento de las muestras de yogurt, hay mejor recuperación en agar LEE; mientras que a los 21 días de almacenamiento, se obtienen mejores recuentos en M17. Aún cuando el tratamiento estadístico no reflejó diferencias significativas ( $p > 0,005$ ) de los recuentos en ambos medios, el M17 resultó más efectivo para la recuperación de los estreptococos, al final del almacenamiento.

En cuanto a los valores obtenidos para el recuento de *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus* (Tabla 3) se puede apreciar mejor recuperación en el Agar LEE durante el almacenamiento; mientras que en ARC la población se mantuvo con valores bajos durante el proceso de fermentación y el almacenamiento del yogurt a 5 °C. Estos resultados fueron significativamente diferentes ( $p < 0,005$ ), lo que denota la poca efectividad del ARC en la recuperación de este grupo de microorganismos, ya que se espera que los lactobacilos estén viables y en número mayor que los estreptococos, al final del almacenamiento, por su condición de ser más ácido tolerante que los estreptococos (7).

Aún cuando el agar LEE no mostró mejor recuperación para los estreptococos al final del almacenamiento, pero si para los lactobacilos, los resultados reflejan la efectividad del medio para el recuento total de bacterias lácticas. Es de hacer notar que al final del almacenamiento se presenta una condición de sobreacidificación del producto, a la cual son sensibles los estreptococos y por consiguiente más difícil su detección (8).

El recuento en agar LEE se basa en la enumeración diferencial de los estreptococos y los lactobacilos, considerando la capacidad fermentativa de ambos microorganismos, ya que los estreptococos fermentan lactosa y los lactobacilos no utilizan la sacarosa, por lo que la preparación del medio incluye una adecuada combinación de ambos azúcares (9).

La mayor recuperación de las bacterias ácido lácticas en el agar LEE puede atribuirse, a la presencia de los dos azúcares, lactosa y sacarosa, así como a la concentración final de los mismos, lo que ejerce un efecto estimulante en el crecimiento de los estreptococos y lactobacilos (10). Además la presencia de carbonato de calcio en el medio inhibe la difusión del ácido, lo cual contribuye a la mayor recuperación de estos microorganismos cuando están presentes en poblaciones mixtas (9).

El agar M17 contiene sólo lactosa y en menor proporción, pero en su preparación se incluye B-glicerofosfato, el cual es

un potente buffer, lo que le confiere al medio mayor recuperabilidad de los estreptococos en condición de sobreacidificación (11).

Los resultados estadísticos indican que no hubo efecto significativo ( $p > 0,005$ ) de los tratamientos aplicados a las muestras sobre la viabilidad de la flora láctica presente en el yogurt. Sin embargo se aprecia de los datos (Tablas 1, 2 y 3) que el tratamiento térmico a 60 °C por 15 minutos, al final del almacenamiento, afecta negativamente el recuento de la flora láctica, específicamente a los lactobacilos, el cual alcanza poblaciones por debajo de  $10^6$  ufc/g; mientras que los estreptococos se ven menos afectados con este tratamiento. El efecto del tratamiento térmico podría atribuirse a la combinación de dos factores de daño a la célula bacteriana, la acidez y el calor aplicado.

Resultados similares reporta Torres (12) en un estudio en muestras de yogurt con piña, en los que se observa que en las muestras sometidas a 60 °C por 30 minutos, después de 10 y 20 días de almacenamiento, hubo reducción importante de la población láctica.

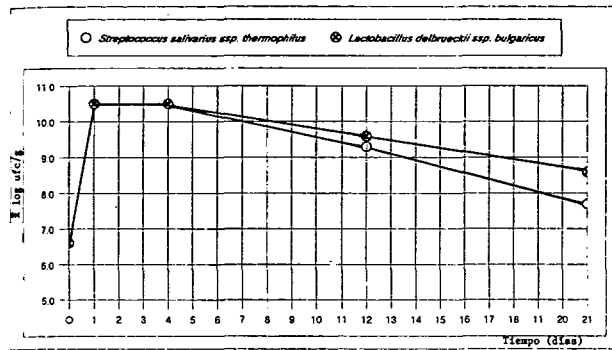
El tratamiento térmico es una condición establecida en la Norma venezolana COVENIN (6) con carácter de recomendación para la enumeración de las BAL del yogurt; lo cual no debería afectar la viabilidad de la flora láctica, por cuanto estos microorganismos son termófilos, pero a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, las células microbianas sufren daños subletales, como consecuencia de la refrigeración sostenida, la progresiva acidificación del sustrato, entre otras, lo que contribuye a reducir la población de estas bacterias. Por esta razón se incluyó la etapa de recuperación después del tratamiento térmico.

Del análisis de estos resultados se sugiere la aplicación del tratamiento térmico como procedimiento opcional en el caso de sospechar presencia de flora acompañante indeseable, además de considerar el período de recuperación de la flora láctica.

En cuanto a efecto del tiempo de almacenamiento sobre los recuentos de la flora láctica se puede asumir de acuerdo a los resultados estadísticos que hubo un efecto significativo ( $p < 0,005$ ) del tiempo de almacenamiento del yogurt sobre la viabilidad y recuperación de los microorganismos evaluados. Se observa de los resultados (Tablas 1, 2 y 3) que al final del proceso de fermentación (3 horas), los recuentos de la flora láctica en el agar LEE están en el rango de  $10^9$  a  $10^{10}$  ufc/g, alcanzando valores superiores a  $10^{10}$  ufc/g al 4° día de almacenamiento del producto, a partir de este momento se inicia la reducción de la población, la cual decae en 2 a 3 ciclos logarítmicos, al final del almacenamiento. La reducción más drástica se observa para los estreptococos, lo cual es de esperarse en muestras con más de 10 días de almacenamiento, ya que en este período ocurre un mayor descenso de pH que inhibe el crecimiento de estas bacterias.

La dinámica de crecimiento de la flora láctica (recuento en agar LEE) se muestra en la Figura 1, en donde se corrobora lo expuesto en el párrafo anterior.

FIGURA 1



Las variaciones de pH y acidez en el proceso de fermentación y durante el almacenamiento del yogurt, se presentan en la Tabla 4. Se observa un aumento progresivo de la concentración de ácido láctico, desde 0,1% hasta 1,19%. El valor de pH se mantuvo en el rango de 4,2 a 3,8 a partir del 4° día de fabricación, lo que confirma lo reportado por otros autores para muestras comerciales de yogurt (13). Estos valores podrían correlacionarse con los recuentos obtenidos para estreptococos y lactobacilos, los primeros dominan el proceso inicial de fermentación y los segundos, más ácido tolerantes, son favorecidos a valores de pH por debajo de 5,5.

TABLA 4  
VALORES DE ACIDEZ Y pH DEL YOGURT  
DURANTE LA FERMENTACION Y EL  
ALMACENAMIENTO 5 °C

Tiempo	Acidez (% ácido láctico)	pH
0 hr	0,17	6,5
3 hr	0,34	5,5
4 días	0,62	4,2
12 días	1,11	4,0
21 días	1,19	3,8

Esta condición se refleja siempre y cuando se mantenga un adecuado balance de cocos: bacilos, el cual según reporta Tamine y col. (14) debe ser 1:1.

Algunos autores (15) reportan que ciertas combinaciones de coco: bacilos pueden ser inhibitorias, estimuladoras o neutras con relación a la velocidad de producción de ácido láctico, lo que puede traer como consecuencia yogurt rancio y sin aroma, en caso de dominar los estreptococos o una sobreacidificación, si dominan los lactobacilos.

Cabe señalar, según resultados de este estudio, que independientemente de los medios de cultivo utilizados, de los tratamientos aplicados y del tiempo de almacenamiento, la población de las BAL se mantiene en el número establecido ( $10^6$  ufc/g), a partir del 4° día de almacenamiento, lo cual

sugiere que la no detección de estas bacterias en muestras comerciales, obedece a problemas de otra naturaleza, lo que justifica posteriores investigaciones para determinar las posibles causas que afectan la viabilidad y actividad de la flora láctica del yogurt, considerando entre éstas, las condiciones de manejo del cultivo liofilizado. Las Bacterias Ácido Lácticas deben mantenerse viables y activas para ejercer su acción probiótica, nutritiva y terapéutica.

## CONCLUSIONES

1. El agar LEE fue el más apropiado para la detección y enumeración de los estreptococos, lactobacilos y en general de las bacterias ácido lácticas en el yogurt.
2. En condiciones de sobreacidificación (final del almacenamiento del yogurt) el M17 fue el más efectivo en la enumeración de los estreptococos.
3. El tratamiento térmico aplicado a las muestras de yogurt afectó negativamente el recuento de la población láctica, específicamente los lactobacilos, al final del almacenamiento.
4. El tratamiento de recuperación aplicado fue efectivo en restablecer la flora láctica, después del tratamiento térmico.
5. La población láctica disminuyó durante el período de almacenamiento, siendo más evidente la disminución de los estreptococos, relacionándose con la progresiva acidificación y reducción de pH en el producto.

## REFERENCIAS

1. Vedamuthu E. Fermented Milks. En: Economic Microbiology. Rose E.H. (E.d). Bath, Inglaterra. 7:214-217. 1982.
2. Fuller R. Probiotics in man and animals. A Review. J Appl Bacteriol 66: 365. 1989.
3. Gilliland S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans. Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J Food Prot 42: 164. 1979.
4. Driessen R.M., F. Kningma and J. Stadhouders. Evidence that *L. bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *S. thermophilus*. Netherlands Milk Dairy Journal 36: 135-144. 1982.
5. Ray B. Impact of Bacterial injury and repair in food Microbiology. It's past, present and future. J. Food Prot 49: 651-655. 1986.
6. COVENIN Norma 2393. Yogurt. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma, Caracas. 1986.
7. Moon J.N., C.A. Hamann and G.W. Reinbold. Recovery of *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* on nine commonly used agar media. Appl. Microb. 28:1076. 1974.
8. Lyn-Radke M. and W. Sandine. Associative growth and differential enumeration of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. J Food Prot 47: 245-248. 1984.
9. Lee S.Y., E.R. Vedamuthy y C.J. Washman. An agar medium for the differential enumeration of Yogurt stater bacteria. J. Milk Food Techn 37:272-276. 1974.
10. Sinha R.P. Effect of carbohydrate on the viability of

- Streptococcus thermophilus*. J Food Prot 54:537-541. 1991.
11. Shankar A. y L.A. Davies, Note on the suppression of *L. bulgaricus* in media containing  $\beta$ -glicerophosphate and application of such media selective isolation of *S. thermophilus* from yogurt. J Soc of Dairy Tech 30:28. 1977.
  12. Torres A. Recuperabilidad de bacterias lácticas viables en yogurt con frutas en diferentes medios de cultivo. Trabajo Especial de Grado. USB. 1989.
  13. Vedamuthu E. The Yogurt story. Past, present and future. Part VI. Dairy, Food and Environmental Sanitation 11: 513-514. 1991.
  14. Tamine A. y H. Deeth. Yogurt: Technology and biochemistry. J Food Prot. 43:939-977. 1980.
  15. Moon J. and G.W. Reinbold, citado por Tamine A. and H.A. Deeth. Yogurt: Technology and biochemistry. J Food Prot. 43: 939-947. 1980.

Recibido: 01-12-1994

Aceptado: 31-07-1995