



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DEL RECUENTO DE *AEROBIOS MESÓFILOS* EN
LECHE CRUDA QUE INGRESA A INDUSTRIAS LACTO OCHOA -
FERNÁNDEZ CIA. LTDA”**

**Tesis previa a la obtención del
Título de Bioquímico Farmacéutico**

AUTORES

NARDA CATALINA BUÑAY BARAHONA
FERNANDA KATERINE PERALTA VÁSQUEZ

DIRECTORA

BQF. JÉSSICA ANDREA LEÓN VIZÑAY. Mgt

CUENCA - ECUADOR

2015



RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la higiene con la cual es tratada la leche cruda por cada uno de los proveedores, desde su extracción hasta su llegada al área de recepción de Industrias Lacto Ochoa – Fernández Cía. Ltda., la misma que proviene de diferentes zonas de la provincia de Cañar.

Se desarrolló un estudio de tipo observacional descriptivo, con 21 proveedores y un total de 168 muestras. Las muestras fueron tomadas directamente del recipiente en el que llega la materia prima a la empresa, para el análisis se realizó el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* mediante placas Petrifilm, por el método 986.33 de la AOAC equivalente al recuento REP (Norma INEN 1529-5:2006) se obtuvieron resultados que fueron contrastados con el valor límite máximo de la norma INEN 9:2012. Leche cruda. Requisitos; adicionalmente se llevó a cabo la prueba del TRAM, comparándose los resultados obtenidos al finalizar estas dos pruebas. La prueba del TRAM como indicador microbiológico indirecto permitió clasificar la leche cruda de acuerdo a su calidad, considerándose como límite mínimo 3 horas, para categorizarla de buena calidad, según la Norma INEN 9:2012. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Microsoft Excel 2013 y SPSS v. 22.0.

Los resultados obtenidos muestran que: el 51,2 % del total de proveedores sobrepasan el límite máximo permitido de carga microbiana para *Aerobios mesófilos*, en cambio la prueba del TRAM indica que solamente el 67,9 % de los proveedores, no cumplen con el criterio de buena calidad.

Palabras clave: AEROBIOS MESÓFILOS, TRAM, LECHE CRUDA, RECuento.



ABSTRACT

In the present study was evaluate the hygiene with which it's treated raw milk for each of the suppliers, from extraction to the time it reaches the reception of Industries Lacto Ochoa – Fernández Cía. Ltda, the same that comes from different areas of the province of Cañar.

It was develop a descriptive observational probabilistic study with a sample of 21 suppliers of milk and a samples number of 168. Samples were taken directly from the storage container in which to reach the raw matter to the company, to analyze count mesophilic aerobic microorganisms was performed using Petrifilm plates for the AOAC official method 986.33 equivalent to REP counting method (Norm INEN 1529-5:2006. Microbiological food control. Determination of the amount of mesophilic aerobic) obtained results that were compared with the maximum permitted limit value under Norm INEN 9:2012. Raw milk. Requirements; additionally held TRAM testing with each of the samples so that the results could be compared at the end of these tests. TRAM test as indirect microbiological indicator allowed to classify raw milk according to its quality considering minimum limit 3 hours to categorize quality, complying with the standard issued in Norm INEN 9:2012.

For the interpretation of the results, was perform a statistical analysis using Microsoft Excel 2013 program and SPSS v. 22.0.

The results show that: 51,2 % of suppliers exceed the maximum allowed limit of microbial load for *mesophilic aerobic* microorganisms in return TRAM test indicates that only 67,9 % of suppliers do not meet the criteria good quality.

Keywords: AEROBIC MESOPHILIC, TRAM, RAW MILK, COUNT.



INDICE GENERAL

PORTADA.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE GRÁFICOS	8
ÍNDICE DE ANEXOS	8
CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR.....	9
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	11
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTO.....	15
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I	18
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 LECHE	18
1.1.1 Definición de leche.....	18
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE.....	18
1.2.1 Características Organolépticas	18
1.2.2 Características Físicas	19
1.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE	21
1.3.1 Agua.....	21
1.3.2 Hidratos de carbono..	22
1.3.3 Proteínas..	22
1.3.4 Grasa..	23
1.3.5 Minerales y vitaminas.....	24
1.4 MICROORGANISMOS EN LECHE CRUDA.....	25
1.4.1 Bacterias Gram positivas.....	26
1.4.2 Bacterias Gram negativas.....	27
1.4.3 Levaduras..	30



1.4.4 Mohos.).....	30
1.5 ALTERACIONES EN LA LECHE	30
1.5.1 Agriado o formación de ácido.....	31
1.5.2 Producción de gas.....	32
1.5.3 Proteólisis.....	32
1.5.4 Sacarólisis.....	32
1.5.5 Enranciamiento.....	33
1.5.6 Producción de olores y sabores.....	33
1.5.7 Modificaciones del color.....	34
1.6 VÍAS DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE	34
1.6.1 Contaminación Intrínseca.....	35
1.6.2 Contaminación extrínseca.....	35
1.7 PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA.....	36
1.7.1 Aire.....	36
1.7.2 Maquinarias y utensilios.....	36
1.7.3 Agua.....	36
1.7.4 Transporte adecuado.....	36
1.7.5 El ambiente donde se realiza el ordeño.....	37
1.7.6 El ordeñador.....	37
1.8 INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA.....	37
1.9 MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS	38
1.10 TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO (TRAM)	40
CAPÍTULO II	42
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
2.1 TIPO DE ESTUDIO.....	42
2.2 POBLACIÓN Y ÁREA DE ESTUDIO	42
2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	43
2.4 TOMA DE MUESTRA.....	43
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	43
2.5.1 Recuento de microorganismos en placas Petrifilm.....	43



2.5.2	Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos en placas Petrifilm	44
2.6	TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO (TRAM)	45
2.7	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	45
2.8	PROCEDIMIENTOS	47
2.8.1	Recuento de Aerobios mesófilos.....	47
2.8.2	Prueba del TRAM.....	51
2.9	RECOLECCIÓN DE LOS DATOS PRIMARIOS.....	52
2.10	PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS.....	52
CAPÍTULO III		54
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1	VARIABLES FÍSICAS, DE MANEJO Y MANIPULACIÓN DE LA LECHE CRUDA QUE INGRESA A INDUSTRIAS LACTO OCHOA - FERNÁNDEZ CÍA. LTDA	54
3.2	AEROBIOS MESÓFILOS, TRAM Y CALIDAD DE LA LECHE	57
3.3	FACTORES ASOCIADOS A LA BAJA CALIDAD DE LA LECHE ENTREGADA.....	62
CONCLUSIONES.....		68
RECOMENDACIONES		69
BIBLIOGRAFÍA		70
ANEXOS		77

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones minerales y vitaminas en la leche.	25
Tabla 2. Clasificación de la microflora de la leche.	26
Tabla 3. Temperatura y condiciones de transporte de la leche cruda al momento del acopio.	54
Tabla 4. Comportamiento general del recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> y TRAM.	57
Tabla 5. Concordancia en la clasificación de la calidad de la leche según TRAM y el Recuento de <i>Aerobios mesófilos</i>	60
Tabla 6. Comportamiento del Recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> , TRAM y Temperatura según el tiempo de entrega.	63
Tabla 7. Coeficientes de correlación Rho de Spearman entre el recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> , TRAM y Temperatura.	63
Tabla 8. Frecuencia de entrega y variables indicadoras de calidad microbiológica en la leche bajo estudio.	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación geográfica del sector Coyoctor.	42
Figura 2. Diseño Placa Petrifilm TM	45
Figura 3. Centro de acopio de leche cruda “Industrias Lacto Ochoa – Fernández”. ...	83
Figura 4. Llegada de proveedores de leche al centro de acopio.	83
Figura 5. Tanque de acero Inoxidable para el transporte de cruda que llega el centro de acopio.	83
Figura 6. Cantarilla para transporte de la leche cruda que llega al centro de acopio.	84
Figura 7. Tanque de almacenamiento para la leche cruda en la planta.	84
Figura 8. Medidor de pH y temperatura para leche.	85
Figura 9. Estufa de incubación Memmert con un rango de temperatura de trabajo: +30° a 70°C.	85
Figura 10. Autoclave.	85
Figura 11. Cooler para mantener las muestras en refrigeración.	86

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de frecuencias (%) de la temperatura de la leche al momento de la entrega.	55
Gráfico 2. Temperatura promedio (°C) de la leche al momento del acopio según la frecuencia de entrega del productor.	56
Gráfico 3. Clasificación de la leche según los parámetros recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> y TRAM.	59
Gráfico 4. Relación lineal entre TRAM y Log ₁₀ (UFC/ml). R = -0,359; P < 0,01.60	
Gráfico 5. Comportamiento de TRAM según los cuartiles de temperatura (ANOVA, P = 0,010). Letras diferentes indican valores medios diferentes.	64
Gráfico 6. Comportamiento de la media del recuento de <i>Aerobios mesófilos</i> (Log ₁₀ (UFC/ml)) según los cuartiles de temperatura (ANOVA, P = 0,046).....	65
Gráfico 7. Frecuencia con la que la leche es clasificada como apta para ser usada como materia prima según la relación de los valores de TRAM y el recuento de microorganismos <i>Aerobios mesófilos</i> con la frecuencia de entrega.67	

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9: 2012 (Leche Cruda. Requisitos) Quinta revisión.....	77
Anexo B. Lista de proveedores de leche del centro de acopio.....	81
Anexo C. Flujograma gráfico de la toma de muestra.	82
Anexo D. Imágenes descriptivas del Centro de Acopio "Industrias Lacto Ochoa Fernandez".....	83
Anexo E. Imágenes descriptivas de los instrumentos utilizados en el estudio. 85	
Anexo F. Guía de interpretación Placas 3M Petrifilm para el recuento de <i>Aerobios</i>	87
Anexo G. Resultados del Recuento de microorganismos <i>Aerobios mesófilos</i> .94	
Anexo H. Resultados de la prueba de Tiempo de reducción del azul de metileno.....	98

CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Narda Catalina Buñay Barahona, autora de la tesis “Determinación del recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda que ingresa a Industrias Lacto Ochoa – Fernández Cía. Ltda.”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 27 de Marzo del 2015



Narda Catalina Buñay Barahona

C.I: 0302428248



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Fernanda Katerine Peralta Vásquez, autora de la tesis “Determinación del recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda que ingresa a Industrias Lacto Ochoa – Fernández Cía. Ltda.”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 27 de Marzo del 2015

Fernanda Katerine Peralta Vásquez

C.I:0302494075



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Narda Catalina Buñay Barahona, autora de la tesis “Determinación del recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda que ingresa a Industrias Lacto Ochoa – Fernández Cía. Ltda.”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 27 de Marzo del 2015

Narda Catalina Buñay Barahona

C.I: 0302428248



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Fernanda Katerine Peralta Vásquez, autora de la tesis “Determinación del recuento de *Aerobios mesófilos* en leche cruda que ingresa a Industrias Lacto Ochoa – Fernández Cía. Ltda.”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 27 de Marzo del 2015

Fernanda Katerine Peralta Vásquez

C.I: 0302494075



LISTA DE ABREVIATURAS

Cp: Centipoise

Cal: Calorías

µg: Microgramo

mg: Miligramo

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

TTC: Cloruro de Trifenil Tetrazolio

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales



DEDICATORIA

A Dios, por regalarme la vida, permitirme culminar mi carrera universitaria, estar siempre presente en cada etapa de mi vida, guiarme por el camino adecuado y darme fuerzas para seguir siempre hacia adelante.

A mi padre Fernando, por el gran ejemplo de perseverancia, fortaleza y responsabilidad que siempre he recibido de él y por sus consejos y el amor incondicional que siempre me ha brindado, y que me han hecho ser la persona que soy hoy en día.

A mi madre Rosita, que con su ternura, dulzura y abnegación ha sido mi soporte día a día.

A mis hermanas por el gran apoyo, compañía y motivación que me han brindado en cada etapa de mi vida.

Con mucho cariño Catalina

Este logro se lo dedico a Dios, por darme fuerza, paciencia y sabiduría a lo largo de mi vida.

A mis padres y hermanos, por ser mi apoyo incondicional en todo momento.

A mi esposo por comprenderme y alentarme en mis momentos de debilidad.

En especial va dedicado a la luz de mi vida, al pequeño ser que con solo mirarla me llena de alegría a diario, mi hija Katherin Valentina.

Katerine



AGRADECIMIENTO

En el presente trabajo de tesis, en primer lugar agradecemos a Dios por bendecirnos a lo largo de este gran paso para nuestra vida profesional.

Un especial agradecimiento a nuestra Directora la Dra. Jessica León por compartirnos todos sus conocimientos y experiencia, por brindarnos sus consejos, apoyo incondicional, esfuerzo y dedicación para que podamos concluir satisfactoriamente con nuestra investigación.

Gracias, a nuestras queridas familias que con su motivación, amor y apoyo incondicional nos han incentivado a seguir adelante para alcanzar metas a lo largo de nuestras vidas.

A la Dra. Paulina Escobar por sus ideas y orientación durante la elaboración del proyecto de esta investigación.

Al Msc. Dariel Díaz por su apoyo y asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este estudio.

También agradecemos a todos nuestros profesores, quienes nos han impartido todos los conocimientos a lo largo de nuestra carrera ya que fueron parte importante de nuestra formación universitaria.

Un agradecimiento para el Sr. Marco Ochoa Administrador de Industrias Lacto Ochoa Fernández Cía. Ltda. por brindarnos su ayuda, colaboración y darnos las facilidades necesarias para poder llevar a cabo la presente investigación en dicha empresa.

A todos y cada uno de ustedes mil gracias Catalina y Katerine



INTRODUCCIÓN

La leche es uno de los productos esenciales y de mayor importancia, por la cantidad de nutrientes de alto nivel que posee, de los cuales los principales son grasa, proteína, lactosa, vitaminas A, B1, B2, calcio y minerales.

Con el crecimiento de la población humana y el aumento de la demanda de este alimento para la nutrición de la sociedad, se ha impulsado el desarrollo y la expansión de la producción industrial de la leche y sus derivados, lo que exige una óptima calidad en los productos elaborados para que de esta manera se dé un adecuado aprovechamiento del alimento y contribuir a la buena salud de los consumidores.

La leche es considerada como un alimento completo para la dieta de los seres humanos y un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Un estudio realizado en la ciudad de Cuenca – Ecuador, con el propósito de determinar la presencia de microorganismos *Aerobios mesófilos* en la leche cruda que se expende en carros repartidores en esta zona, la misma que a su vez fue recolectada en las zonas de Tarqui, Tutupali, Victoria del Portete y alrededores, muestran que un 43.90% de los carros repartidores expenden leche no apta para el consumo humano (ROJAS PESÁNTEZ, 2013), razón por la cual es preocupante observar malas prácticas higiénicas por parte de ordeñadores y transportistas de la leche cruda, motivando a que se lleve a cabo un estudio que determine si la leche en la zona de Cañar es de óptima calidad para ser usada como materia prima para su tratamiento posterior.



La producción de leche de calidad higiénica, como todo sistema productivo, resulta sumamente complejo, más aún por la situación de que el producto a manejar es extremadamente delicado, afectándose mucho por la manipulación. Así Industrias Lacto Ochoa Fernández Cia. Ltda., pretende cumplir con su misión que es alimentar de forma nutritiva, saludable y con productos de calidad a los consumidores de productos ALPURA, cumpliendo con las expectativas de clientes internos y externos.

La leche que es procesada en la fábrica proviene de distintos sectores de la provincia del Cañar. La recepción de la materia prima se da en las instalaciones de la empresa y se realiza el respectivo análisis físico-químico para determinar si esta ingresa o no a la planta de acopio y hasta la fecha no practican ningún tipo de análisis microbiológico; por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar las condiciones higiénicas en las que ingresó la leche cruda a Industrias Lacto Ochoa - Fernández Cía. Ltda., a través de la determinación del recuento de *Aerobios mesófilos* y el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno, de la materia prima que aportaron los proveedores de la zona del Cañar a esta industria, como se indica en la Norma INEN 9:2012.

Este trabajo de investigación aportó con datos específicos y brindó información sobre la calidad de la leche entregada por cada proveedor, lo que permitió establecer medidas de prevención y corrección sobre el ordeño y manejo de la leche, por lo cual la empresa está dispuesta a dar la capacitación necesaria a cada uno de los proveedores, con el objetivo de conseguir una materia prima de calidad superior, condición que benefició positivamente a la empresa.



CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LECHE

1.1.1 Definición de leche

1.1.1.1 Definición de leche según el INEN. La leche es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo. (INEN, 2006)

1.1.1.2 Definición de leche cruda según el INEN. Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento; es decir, que su temperatura no ha superado los 40°C, que es la temperatura promedio a la cual se encuentra la leche luego de haber sido extraída de las glándulas mamarias (INEN, 2012).

La leche es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y un pH próximo a la neutralidad y la función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el periodo crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos (ARANCETA & SERRA, 2005).

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE

1.2.1 Características Organolépticas

1.2.1.1 Color. El color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a la reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato - fosfatocálcico en suspensión coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Aquellas leches



que han sido parcial o totalmente descremadas o que han sido adulteradas con agua, presentan un color blanco con tinte azulado.

Las leches de retención o mastíticas presentan un color gris amarillento y la presencia de un color rosado puede ser el resultado de la presencia de sangre o crecimiento de ciertos microorganismos.

Una leche adulterada con suero de quesería puede adquirir una coloración amarilla-verdosa debida a la presencia de riboflavina.

1.2.1.2 Sabor. El sabor de la leche normalmente no es ácido ni amargo, sino más bien ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa. A veces se presenta con cierto sabor salado por la alta concentración de cloruros que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del periodo de lactancia o que sufren estados infecciosos de la ubre como por ejemplo en la mastitis; otras veces el sabor se presenta ácido cuando el porcentaje de acidez en el producto es superior a 0,2 - 0,3 % de ácido láctico.

En general, el sabor de la leche fresca normal es agradable y puede describirse simplemente como característico (PINZÓN FERNÁNDEZ, 2004).

1.2.1.3 Olor. La leche recién ordeñada tiene un ligero olor al medio ambiente donde es obtenida, pero luego desaparece. El olor de la leche comercial es difícil de percibir, salvo que sea un olor ajeno a ella provenientes de alimentos, utensilios, medio ambiente y microorganismos (GARCIA HERNÁNDEZ, 2005).

1.2.2 Características Físicas

1.2.2.1 Densidad. La densidad de la leche puede fluctuar entre 1,029 a 1,033 g/cm³ a una temperatura de 15°C; su variación con la temperatura es 0.0002



g/cm^3 por cada grado de temperatura, dicha variación depende de la combinación de las densidades de sus componentes, que son los siguientes:

- Agua: $1,000 \text{ g/cm}^3$
- Grasa: $0,931 \text{ g/cm}^3$
- Proteínas: $1,346 \text{ g/cm}^3$
- Lactosa: $1,666 \text{ g/cm}^3$
- Minerales: $5,500 \text{ g/cm}^3$

(THE UNIVERSITY WISCONSIN-MADISON, 2013)

1.2.2.2 pH. La leche posee un pH ligeramente ácido su valor puede variar entre 6,5 y 6,65. Se pueden presentar alteraciones en estos valores producidos por: mala higiene de la glándula mamaria, por el desarrollo de microorganismos, que desdoblán o convierten la lactosa en ácido láctico; o por la acción de microorganismos alcalinizantes.

1.2.2.3 Acidez. Una leche fresca posee una acidez de 0,15 a 0,16%. Esta acidez se debe en un 40% a su naturaleza anfótera, otro 40% al aporte de la acidez de las sustancias minerales, CO_2 disuelto y ácidos orgánicos; el 20% restante se debe a las reacciones secundarias de los fosfatos presentes.

Una acidez menor al 0,15% puede ser debido a la mastitis, al aguado de la leche o bien por la alteración provocada con algún producto alcalinizante y en cambio una acidez superior al 0,16% es producida por la acción de contaminantes microbiológicos. (CELIS & JUÁREZ, 2009)

1.2.2.4 Viscosidad. La leche natural fresca, es más viscosa que el agua, tiene valores entre 1,7 a 2,2 centipoises para la leche entera. La viscosidad disminuye con el aumento de la temperatura hasta alrededor de los 70°C , por encima de esta temperatura aumenta su valor.



1.2.2.5 Punto de congelación. El valor promedio es de $-0,54^{\circ}\text{C}$ (varía entre $-0,513$ y $-0,565^{\circ}\text{C}$), este valor es menor al del punto de congelación del agua pura debido a la presencia de las sales minerales y de la lactosa en la leche.

1.2.2.6 Punto de ebullición. La temperatura de ebullición es de $100,17^{\circ}\text{C}$, ligeramente superior a la del agua (100°C), a la altura del nivel del mar.

1.2.2.7 Calor específico. La leche completa tiene un valor de $0,93 - 0,94 \text{ cal/g}^{\circ}\text{C}$ (CELIS & JUÁREZ, 2009).

1.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche es considerada como una mezcla tanto física como química, siendo ésta una verdadera dispersión coloidal en donde el agua es el medio dispersante, la leche es un producto nutritivo complejo que posee más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en el agua. Por ejemplo:

- Caseína (la principal proteína de la leche).
- La grasa y las vitaminas solubles en grasa.
- La lactosa (azúcar de la leche).

Las micelas de caseína y los glóbulos grasos le dan a la leche la mayoría de sus características físicas, además le dan el sabor y olor a los productos lácteos tales como mantequilla, queso, yogurt, etc. (DEL ANGEL MEZA, 2013).

1.3.1 Agua. El agua es uno de los nutrientes mayormente requerido para el mantenimiento de la homeostasis corporal y la leche suministra una gran cantidad de ésta, conteniendo aproximadamente 88-90% de agua dentro de su composición; así, permite tener un adecuado balance electrolítico.



La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa sintetizada en las células secretoras de las glándulas mamarias, a donde se va a transportar esta última mediante la corriente circulatoria. La producción de leche es afectada rápidamente por una disminución de agua y ésta es una de las razones por las que la vaca debe tener libre acceso a una fuente de agua abundante todo el tiempo (GIL HERNÁNDEZ, 2010).

1.3.2 Hidratos de carbono. El principal hidrato de carbono en la leche es la lactosa, que a pesar de ser un azúcar, no se percibe por el característico sabor dulce. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante y promedia alrededor de 5%, es similar en todas las razas lecheras y no puede alterarse fácilmente con prácticas de alimentación.

En la leche las moléculas que forman la lactosa, se encuentran en una concentración de: glucosa (14 mg/100 g) y galactosa (12 mg/ 100 g).

En una proporción significativa de la población humana, la deficiencia de la enzima lactasa en el tracto digestivo resulta en la incapacidad para digerir la lactosa. La mayoría de los individuos con baja actividad de lactasa desarrollan síntomas de intolerancia a grandes dosis de lactosa, pero la mayoría puede consumir cantidades moderadas de leche sin padecer malestares (GIL HERNÁNDEZ, 2010).

1.3.3 Proteínas. La cantidad promedio de proteína contenida en la leche es del 3,5%. La proteína láctea es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares distintos, se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas del lactosuero (20%) (AGUDELO & BEDOYA, 2005).

1.3.3.1 Caseínas. Son moléculas de gran tamaño formadas por un gran número de aminoácidos, entre estos los más importantes son el ácido



glutámico, la leucina y la prolina. Las caseínas se agrupan formando micelas que se encuentran en suspensión, estos complejos están constituidos por polímeros de centenares o miles de moléculas de caseínas (GIL HERNÁNDEZ, 2010).

1.3.3.2 Proteínas del suero. Son las proteínas que quedan en solución cuando el pH de la leche está en 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína), se encuentran solubles en el suero obtenido por coagulación de la caseína, entre las principales se encuentran:

- **Albúmina**, es la proteína de la leche, que sigue en cantidad a la caseína, con una cifra aproximada de 0.5%. Este tipo de proteína de la leche es inestable a la acción del calor por lo cual se desnaturalizan con facilidad al calentarlas. Por esta razón durante el proceso de calentamiento a altas temperaturas se destruye gran parte de la proteína sérica.
- **Globulinas**, son proteínas de alto peso molecular que se encuentran preformadas en la sangre, forman parte de estas, las inmunoglobulinas que se encuentran en el calostro (AGUDELO & BEDOYA, 2005).

1.3.4 Grasa. La grasa se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche, se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, cuyos diámetros pueden variar entre 0,10 - 0,22 micrones que se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos que evitan que la grasa se aglutine y pueda separarse de la parte acuosa. La grasa de la leche puede sufrir alteraciones causadas por la acción de la luz, del oxígeno y enzimas.



El contenido de grasa puede variar por factores como: la raza y alimentación; además, se mantiene constante en los diversos periodos de lactancia, tan solo en el calostro parece disminuir su porcentaje.

La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en la forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta (cadenas de menos de ocho átomos de carbono) producidos de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación ruminal (AGUDELO & BEDOYA, 2005).

1.3.5 *Minerales y vitaminas.* La leche es una fuente excelente de la mayoría de los minerales requeridos. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche.

Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto.

Otro mineral de interés en la leche es el hierro cuyas concentraciones bajas, no alcanzan a satisfacer las necesidades nutricionales, pero este bajo nivel pasa a tener un aspecto positivo debido a que limita el crecimiento bacteriano en la leche ya que el hierro es esencial para el crecimiento de muchas bacterias (THE UNIVERSITY WISCONSIN-MADISON, 2013).

Tabla 1. Concentraciones minerales y vitaminas en la leche.

MINERALES mg/100 mL		VITAMINAS µg/100 mL	
Potasio	138	Vit. A	30,0
Calcio	125	Vit. D	0,06
Cloro	103	Vit. E	88,0
Fósforo	96	Vit. K	17,0
Sodio	58	Vit. B1	37,0
Azufre	30	Vit. B2	180,0
Magnesio	12	Vit. B6	46,0
Minerales trazas	< 0,1	Vit. B12	0,42
		Vit. C	1,7

Fuente: *Composición de la leche y valor nutricional*. Consultado el: 20 de Mayo del 2014 de: http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_19.es.pdf

1.4 MICROORGANISMOS EN LECHE CRUDA

A diferencia del agua, la leche no tiene flora bacteriana propia, y es probable que la que sea secretada por la ubre de una vaca sana sea estéril. Sin embargo, la leche en la ubre rara vez o nunca es bacteriológicamente estéril, porque los microorganismos la invaden a través de los conductos lácteos de las tetillas y la primera porción de la leche que sale siempre contiene más bacterias que la última. Además no hay una flora bacteriana característica de la leche; la presencia de microorganismos siempre es consecuencia de contaminación (ROMERO DEL CASTILLO & MESTRES, 2004).

La microflora de la leche para su estudio se la puede dividir en dos grandes grupos: las bacterias gram positivas y las bacterias gram negativas.

**Tabla 2. Clasificación de la microflora de la leche.**

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
Bacterias lácticas	Enterobacterias
Micrococos y Estafilococos	Acromobacteriaceae
Bacterias Esporuladas (Bacillaceae)	Bacterias Gram negativas diversas

Fuente: *Microbiología de la leche*. Consultado el: 24 de Agosto del 2014 de: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf.

1.4.1 Bacterias Gram positivas. Son bacterias de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza; se encuentran en el suelo y en cualquier lugar donde existan altas concentraciones de carbohidratos, proteínas, vitaminas y poco oxígeno. Su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide; soportan un pH= 4 en la leche y son anaeróbicas facultativas, mesófilas, termófilas y de crecimiento exigente. Pueden ser homofermentativas (más del 90% de su metabolismo resulta en ácido láctico) o heterofermentativas (producen además de ácido láctico, otros ácidos y gases).

1.4.1.1 Bacterias lácticas. Estas bacterias pertenecen a la familia de las Lactobacteriaceae y son consideradas las más importantes porque son capaces de fermentar la lactosa, dando así una elevada proporción de ácido láctico en los productos de degradación (El ácido láctico que se forma en la leche por la fermentación de la lactosa es el responsable de que esta se agrie).

1.4.1.2 *Micrococos y Estafilococos*

Los estafilococos, son anaerobios facultativos fuertemente fermentadores de la glucosa con un descenso del pH (hacia 4.3 y 4.5). Este género comprende:

- *Estafilococo pyogenes*
- *Estafilococo epidermidis*
- *Estafilococo aureus*



Los estafilococos causan mastitis y pueden provocar enfermedades o intoxicaciones en los humanos.

Los micrococos, son bacterias aerobias aunque también hay algunas anaerobias, estas no fermentan la glucosa sino más bien la degradan, provocando también un descenso del pH.

Estos no son patógenos, están desprovistos de la coagulasa y la hemolisina por esta razón no causa ninguna enfermedad. Se los encuentra luego del ordeño y forman parte de la flora inocua que contamina la leche (RUIZ OÑATE, 2012).

1.4.1.3 Bacterias esporuladas (Bacillaceae). Se encuentran contenidas por una endospora y por esta razón pueden resistir altas temperaturas (100°C). Este tipo de bacterias no suelen presentarse en la leche cruda ni en productos lácteos que no han sido calentados.

Este grupo está representado por 2 géneros: **Bacillus** (bacterias aerobias), con actividad enzimática: acidificación, coagulación y proteólisis que tiene la capacidad de generar esporas con cierta termorresistencia produciendo cuadros tóxicos en el hombre, debido a la producción de enterotoxinas y **Clostridium** (bacterias anaerobias) que producen gas, algunas son patógenas por sus toxinas, en especial, *Clostridium perfringens* formador de esporas, anaerobio y termorresistente, provoca problemas a nivel de la industria quesera y en la salud pública, ocasionando problemas de diarrea y fiebre (PINZÓN FERNÁNDEZ, 2004).

1.4.2 Bacterias Gram negativas

1.4.2.1 Enterobacterias. La familia de las *Enterobacteriaceae* es muy difícil de dividir, podemos citar que los más frecuentemente encontrados en los



productos lácteos y que fermentan activamente la lactosa son los géneros *Escherichia*, *Cloacae* y *Klebsiella*.

La mayor parte de las enterobacterias son huéspedes normales del intestino de los mamíferos y su presencia en la leche o en el agua se debe a la contaminación con materias fecales, y son importantes desde 2 puntos de vista:

- El higiénico ya que son causantes de varias enfermedades infecciosas.
- El tecnológico ya que fermentan los azúcares con formación de gas ($\text{CO}_2 - \text{H}_2$) y ácidos.

El género *Escherichia* comprende una especie bien definida, es el único productor de indol del grupo, lo cual constituye el principio de su caracterización. Produce gas y ácidos orgánicos, sin embargo es menos acidificante que las bacterias lácticas que lo inhiben cuando el pH está por debajo de 5 – 5,2. Reduce los nitratos a nitritos.

El género *Cloacae* produce gas, origina una ligera acidificación y una sustancia neutra, la acetoína, estas bacterias no son patógenas, aunque algunas se consideran sospechosas.

El género *Klebsiella* comprende cepas saprófitas y cepas patógenas.

En la leche también se pueden encontrar bacterias que no fermentan la lactosa como *Serratia*, *Proteus* y especies patógenas como *Salmonella* (B tífico) y raramente *Shigella* (B disentérico).

Las enterobacterias, como *E. coli* capaz de producir mastitis, pueden originar gastroenteritis debido a la producción de enterotoxinas (GÁLVEZ DE ROSAL, 2008).



1.4.2.2 *Acromobacteriaceae.* Comprende bacterias saprófitas aerobias que no fermentan la lactosa, no coagulan la leche y pueden volverla alcalina. Estas bacterias presentan interés porque forman parte de la microflora psicrófila que prolifera en la leche conservada a baja temperatura.

Algunas producen sustancias viscosas o coloreadas. Se han definido 3 géneros: *Alcaligenes*, *Acromobacter* y *Flavobacterium*.

1.4.2.3 *Bacterias Gram negativas diversas.* Dentro de este grupo tenemos las *Pseudomonas* que se encuentran presentes en la leche por contaminación con aguas impuras, la *Pseudomona aeruginosa* es muy resistente a los antibióticos y desinfectantes, presentes en la glándula mamaria y afecta a la salud pública en asociación con ciertos *Staphylococcus*. Este tipo de microorganismos forman parte de la microflora psicrófila y son nocivas a causa de sus actividades proteolíticas y lipolíticas (PINZÓN FERNANDEZ, 2006).

La Organización Mundial de la Salud, OMS, ha confeccionado una lista en la que se señalan los agentes patógenos que, transmitidos por la leche, pueden originar enfermedades en el hombre. Los más importantes son:

- ***Mycobacterium bovis.*** Es un bacilo muy resistente al medio ambiente, calor y desecación; se difunde por el aire expirado, las secreciones, la leche y la orina. Este microorganismo penetra en el organismo del bovino por vía respiratoria al ponerse en contacto con otro animal enfermo, también se puede adquirir por vía digestiva cuando un ternero se amamanta con leche de vacas con ubres tuberculosas.

En el ser humano generalmente ingresa por vía gastrointestinal al ingerir leche infectada y causa tuberculosis de los ganglios linfáticos y de los huesos (ROVID & et.al., 2010).



- ***Brucella abortus***. Se localizan en los ganglios linfáticos mamarios, liberándose a través de la leche por períodos de tiempo muy prolongados.
- ***Coxiella burnetti***. Provoca la Fiebre Q y se libera durante meses en la leche de vacas enfermas.
- ***Streptococcus agalactiae***. Típico de mastitis, presentándose por lo general el de tipo B, que provoca enfermedades en el hombre, principalmente en los recién nacidos, debido a que el aparato urogenital femenino constituye un reservorio (MAGARIÑOS, 2000).

1.4.3 Levaduras. Son organismos unicelulares ovalados, 3 a 5 μm de diámetro. Se pueden encontrar en ambientes con altas concentraciones de azúcar. En leche cruda suele encontrarse levaduras como *Cándida* causante de leches espumosas debido a fermentaciones alcohólicas gaseosas.

1.4.4 Mohos. No tienen importancia en la leche líquida pero si en los derivados lácteos (CELIS & JUÁREZ, 2009).

1.5 ALTERACIONES EN LA LECHE

La mayoría de los alimentos son buenos medios de cultivo para el crecimiento de muchas clases de microorganismos y como se mencionó anteriormente en el caso de la leche por su composición y características fisicoquímicas, constituye un excelente medio de cultivo especialmente entre 7 y 60°C sobre todo para las bacterias mesófilas y, dentro de éstas, las patógenas, cuya multiplicación depende principalmente de la temperatura y de la presencia de otros microorganismos competitivos o de sus metabolitos, produciendo cambios en los alimentos como en su aspecto, composición, sabor, color, olor y otras cualidades (ALARCÓN & OLIVAS, 2004).



Es así que podemos hallar bacterias que se alimentan básicamente de las proteínas (actividad proteolítica), de las grasas (actividad bioquímica lipolítica), o de los hidratos de carbono (actividad sacarolítica) (CELIS & JUÁREZ, 2009).

De esta manera estos microorganismos en la leche generan distintas acciones pudiendo modificar la constitución y calidad de la leche, entre las que se encuentran:

1.5.1 Agriado o formación de ácido. Cuando la leche se “agria” suele considerarse alterada, especialmente si se cuaja, dicha formación de ácido se manifiesta inicialmente por el olor y sabor agrio, más la coagulación de la misma, de consistencia gelatinosa o más débil que libera un suero claro.

La fermentación láctica tiene lugar cuando se deja la leche cruda durante algún tiempo a temperatura ambiente (GÁLVEZ DE ROSAL, 2008).

Los gérmenes lácticos causantes de esta fermentación pueden ser:

- Homofermentativos: que producen casi exclusivamente ácido láctico y cantidades mínimas de otras sustancias: ácido acético, dióxido de carbono y otros productos volátiles.
- Heterofermentativos: que producen además de ácido láctico cantidades apreciables de productos volátiles (PARRA, 2010).

La acidez láctica puede darse de la siguiente forma:

- Entre 10 y 37°C el causante es *Streptococcus lactis* (germen homofermentativo), ayudado quizás por gérmenes *Coliformes*, *Micrococos*, *Lactobacilos* y *Enterococos*.
- Entre 37 y 50 °C el causante es *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus faecalis* producen alrededor del 1% de ácido láctico y esta acción puede ser continuada por los lactobacilos, tales como el *Lactobacillus vulgaricus*.



Los gérmenes lácticos no son los únicos capaces de provocar la fermentación ácida de la leche; pueden producirla muchos otros, especialmente si las condiciones no son favorables a las bacterias lácticas, por ejemplo las bacterias *Coliformes* originan pequeñas cantidades de ácido láctico y considerables productos volátiles (GÁLVEZ DE ROSAL, 2008).

1.5.2 Producción de gas. La producción de gas por las bacterias va siempre acompañado de la formación de ácido, que es indeseable tanto en la leche como en los productos lácteos.

Los gérmenes productores de gas con más probabilidad de multiplicarse son los *Coliformes*, los del género *Clostridium* y especies del género *Bacillus*, productores de H₂, CO₂ y gérmenes heterofermentativos que producen solo CO₂.

En la leche cruda a temperaturas comprendidas entre 0°C y 37°C, los gérmenes productores de gas con más probabilidad de multiplicarse son los coliformes porque pueden competir bien con otros formadores de ácido (GÁLVEZ DE ROSAL, 2008).

1.5.3 Proteólisis. Como se conoce, es la hidrólisis de las proteínas por la acción de las enzimas proteolíticas y proteinasas provocando lo que se llama “coagulación dulce” (coagulación con escasa producción de ácido), caracterizada por la formación de compuestos de reacción, en especial aminos, a la vez que se producen desprendimientos gaseosos dando a la leche un olor desagradable.

Las bacterias que más frecuentemente provocan esta coagulación son *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas viscosa*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus liquefaciens* (CELIS & JUÁREZ, 2009).

1.5.4 Sacarólisis. En la sacarólisis (actividad bioquímica sobre el azúcar de la leche), la lactosa se descompone en glucosa y galactosa, para luego por



fermentación producir ácido láctico. Se produce también una coagulación que, a diferencia de la proteolítica, es de naturaleza ácida, provocando un cierto olor agradable por la formación de algunos gases como el diacetilo.

Entre los microorganismos responsables de esta coagulación ácida tenemos: *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*, que forman fundamentalmente ácido láctico (por eso son homofermentativos); en cambio *Leuconostoc citrovorum*, aparte de ácido láctico, forma otros compuestos tales como: acetoína y diacetilo (que proceden del ácido cítrico presente en la leche) (CELIS & JUÁREZ, 2009).

1.5.5 Enranciamiento. Esta alteración se genera por la lipólisis es decir la hidrólisis de la materia grasa, por parte de distintas bacterias y hongos que provocan la descomposición de la grasa degradándola a glicerina y ácidos grasos. Algunos de estos ácidos grasos son los responsables del sabor rancio de algunas leches.

Entre los microorganismos que inducen la lipólisis son: *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter lipolyticum* y los hongos *Cándida lipolytica* y *Penicillium*.

La *Enterobacter aerogenes* provocan compuestos gomosos, por último, la *Pseudomonas ichthyosmia* provoca un típico olor y sabor a pescado debido a la formación de trimetilamina que se genera por el ataque a la lecitina (VERA QUEZADA, 2013).

1.5.6 Producción de olores y sabores. El aroma de la leche recién ordeñada es escaso, delicado y se altera con facilidad, por esta razón pueden presentarse olor y sabor anormales, debido a diversas situaciones como: el estado de lactancia en que se encuentre la vaca, por sufrir ésta de mastitis o como consecuencia del alimento que esté ingiriendo.

Los aromas y sabores que posteriormente desarrolla la leche pueden no tener un origen microbiano (por ejemplo, aromas absorbidos, sabor a sebo causado



por los metales o la luz y enranciamiento producido por la lipasa de la leche); otras veces, estos aromas y sabores si tienen un origen microbiano (ARREGUIN & GARDEA, 2013).

1.5.7 Modificaciones del color. El color puede estar producido por el desarrollo de bacterias y mohos pigmentados en la superficie, sobre la que forman un velo o anillo, o hallarse diseminados por toda la leche, por ejemplo:

- Leche de color azul: *Pseudomonas syncyanea*.
- Leche amarilla: *Pseudomonas synxantha*.
- Leche roja: Esta coloración suele ser debida a especies del género *Serratia* como *Serratia marcescens*, aunque es rara debido a que las demás bacterias crecen más que las especies que producen el pigmento rojo, otro microorganismo que genera este color en la leche es *Brevibacterium erythrogenes* que produce una capa de color rojo en la superficie de la leche, seguida de proteólisis. La presencia de sangre en la leche también confiere color rojo.
- Leche parda: *Pseudomonas putrefaciens* (GÁLVEZ DE ROSAL, 2008).

1.6 VÍAS DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE

La calidad de la leche se puede ver afectada por la posibilidad de que, presente un gran número de agentes microbianos desde el momento de su obtención, dependiendo en gran medida de las prácticas de higiene y sanidad observadas en la manipulación, transporte, proceso y venta.

Es por esta razón que para los productores de leche es de vital importancia evitar la contaminación y posterior proliferación de los microorganismos en la leche y en relación a este problema se ha tratado de aplicar métodos que permitan lograr un mejoramiento en el manejo higiénico de la leche (ROMERO DEL CASTILLO & MESTRES, 2004).

En la leche cruda se pueden observar dos tipos de contaminación:



1.6.1 Contaminación Intrínseca. La contaminación intrínseca se relaciona con el estado del animal y su ubre. Esta contaminación puede ser a través de dos vías:

1.6.1.1 Vía Ascendente (Microorganismos de origen mamario). Aunque la leche se obtenga de vacas sanas y en las mejores condiciones asépticas, es raro que sea enteramente estéril, debido a la anatomía de su ubre. El microorganismo que más frecuentemente es posible hallar en las glándulas mamarias es el *Streptococcus* y *Corynebacterium*.

La propagación de los microorganismos mastíticos pueden deberse a las condiciones del ordeño, el medio ambiente externo y la edad de la vaca, puesto que cuanto más viejas más proclives son a esta infección (LOYA CHÁVEZ, 2013).

1.6.1.2 Vía Descendente o Endógena. Las glándulas mamarias son susceptibles a la infección con microorganismos provenientes de la sangre del animal. Entre estos están el *Mycobacterium tuberculosis* (variedad hominis y variedad bovis) causantes de tuberculosis en el hombre; también pueden hallarse *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* causantes de brucelosis en el hombre y provocan abortos en las vacas.

El *Mycobacterium tuberculosis* es muy resistente en medios ácidos y es bastante termoresistente y por eso que el estudio de la pasteurización se hacen basados en la resistencia térmica de este microorganismo (LOYA CHÁVEZ, 2013).

1.6.2 Contaminación extrínseca. Los puntos de inicio para que se genere una contaminación de la leche cruda proceden de diversos factores del medio externo como son: ordeño, medio ambiente, limpieza del animal, limpieza y salud del personal que trabaja, limpieza de máquinas, equipos, utensilios y la calidad del agua (MAGARIÑOS, 2000).



1.7 PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA

Debe tenerse en cuenta que la leche es un producto biológico que procede de un animal, y por lo tanto desde el momento de su salida de la ubre de la vaca, esta se expone a numerosas fuentes de contaminación microbiana que condicionan su manejo posterior.

Si se pretende obtener leche de buena calidad microbiológica, la atención debe centrarse en los procesos de producción y a mantener las vacas con una adecuada sanidad. Para lo cual se debe identificar las principales fuentes de contaminación de la leche, que comprenden:

1.7.1 Aire. El aire puede transportar bacterias del suelo en donde puede haber excrementos (que contaminan con bacterias tales como *Escherichia coli* y *Salmonella*), restos de alimentos, pajas, etc. Por otro lado si el animal no está limpio es común encontrar en él diversas partículas contaminantes (ARREGUIN & GARDEA, 2013).

1.7.2 Maquinarias y utensilios. Si no se hace una limpieza profunda de maquinarias y utensilios que se usan en el proceso de obtención de la leche, es fácil tener contaminación, especialmente en ciertos ángulos y rugosidades de los mismos, pues ahí es donde más fácilmente se desarrollan los microorganismos. La contaminación se produce al ponerse en contacto la leche con las superficies de: botes lecheros, pipas, tanques de almacenamiento, bombas, tuberías, filtros, agitadores, envasadoras, transportadores, tinas, utensilios, etc.

1.7.3 Agua. Se debe controlar la calidad del agua utilizada para la limpieza de equipos y utensilios en las plantas de proceso.

1.7.4 Transporte adecuado. La leche cruda es susceptible de sufrir alteraciones debidas al crecimiento microbiano en la misma, particularmente



cuando la temperatura de conservación no es la adecuada, su calidad microbiológica cambia significativamente durante su manejo y transporte, particularmente cuando no se cuenta con los medios para su enfriamiento inmediato una vez obtenida. Por lo tanto lo ideal es el transporte en un medio que mantenga a la leche a una temperatura de refrigeración (hasta 4°C) evitando así la proliferación de microorganismos (ARREGUIN & GARDEA, 2013).

1.7.5 El ambiente donde se realiza el ordeño. El ambiente al interior y en los alrededores de las instalaciones donde se lleva a cabo el ordeño afecta los niveles de contaminación de la leche. Si el ordeño se realiza al interior del establo, existe un alto riesgo de contaminación a través del aire y de los insectos, particularmente las moscas.

Resulta más adecuado que el ordeño se realice en el pastizal y no en el establo. Es importante que los recipientes que contengan la leche deban mantenerse cubiertos (CARAVACA RODRIGUEZ & et al., 2005).

1.7.6 El ordeñador. Al pasar de un animal a otro, el ordeñador puede transmitir los microorganismos patógenos a todo el rebaño, lo que contaminaría toda la leche. Una persona que padece de alguna infección o lesión en la piel también puede infectar la leche, volviéndola no apta para el consumo humano.

El ordeñador debe asegurarse que se mantenga un estado de pulcritud en las instalaciones y utensilios, que los animales estén limpios y en buen estado de salud, además de observar su propia higiene personal (CARAVACA RODRIGUEZ & et al., 2005).

1.8 INDICADORES DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA

La leche al ser un producto biológico rico en hidratos de carbono, grasas, proteínas, minerales, vitaminas y oligoelementos y poseer un pH óptimo



(cercano a la neutralidad), se constituye en un medio adecuado para la multiplicación de la mayoría de las bacterias contaminantes (REVELLI, SBODIO, & TERCERO, 2004). Las condiciones de higiene y sanidad en las explotaciones lecheras tienen un efecto importante en la calidad microbiológica de la leche, ya que cuanto mayor sean los cuidados aplicados a la obtención higiénica de la leche y a la sanidad de los animales productores de leche, serán menores los contenidos microbianos en la misma.

Una alta carga de bacterias contaminantes en la leche disminuye la vida útil de los productos elaborados, desmejora la calidad organoléptica y nutricional, e interviene en los procesos de fermentación ácido láctica y en la coagulación enzimática promoviendo el deterioro o proteólisis de las caseínas. Por esta razón, el aumento de microorganismos contaminantes (*Staphylococcus*, Coliformes, Mesófilos), representan grandes pérdidas en la ganadería de leche, ya que al haber más cantidad de bacterias mesofílicas, puede existir un mayor riesgo de contaminación de la leche por patógenos, así como el crecimiento de los mismos en los productos terminados (REVELLI, SBODIO, & TERCERO, 2004).

Y es así que entre los requisitos microbiológicos que dicta la Norma INEN 9:2012 para la leche cruda se encuentra el recuento de *Aerobios mesófilos*, en el cual se centra esta investigación. Esta determinación se realiza por lo general de manera conjunta con la prueba del TRAM (Tiempo de reducción del Azul de Metileno), la cual es un indicador indirecto del contenido microbiano de la leche cruda, lo que nos da mayor claridad en la determinación de la calidad de la leche cruda y siempre con el objetivo de proveer una leche con óptimas condiciones. **(Anexo A).**

1.9 MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS

Los microorganismos *Aerobios mesófilos* son el grupo más grande de indicadores de calidad de los alimentos. Se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer en un rango de temperatura entre



15 – 45°C, con un óptimo de 35°C, siendo la mínima de 15 a 20 °C y la máxima de 45°C. Casi todos los agentes patógenos humanos son mesófilos.

Según el INEN se define a los microorganismos *Aerobios mesófilos* como Aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C (INEN, 2006).

Dentro de este grupo de microorganismos se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a las temperaturas antes mencionadas, y en las condiciones establecidas (CANO RUERA, 2006).

En productos terminados son empleados como indicadores de vida útil.

El número de microorganismos *Aerobios mesófilos* encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad más comúnmente utilizado. Esta determinación permite obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos, su probable vida útil, la descongelación incontrolada de los alimentos o los fallos en el mantenimiento de las temperaturas de refrigeración (ALONSO NORE & POVEDA SÁNCHEZ, 2008).

A este tipo de microorganismos se les encuentra en alimentos almacenados a temperatura ambiente o en alimentos refrigerados cuando se ha roto la cadena de frío.

Recuentos altos en alimentos estables a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario (CAMPOS DÍAZ, 2003).

El recuento de *Aerobios mesófilos* permite:

- Verificar efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección.
- Determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas.



- Determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de alimentos.
- Verificar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte.
- Obtener información acerca de la vida útil de los alimentos.
- Indicar alteración incipiente en ciertos alimentos.

(ALONSO NORE & POVEDA SÁNCHEZ, 2008).

La Norma INEN 9:2012 (**Anexo A**). Establece que: El límite máximo para el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* es de $1,5 \times 10^6$ UFC/ml, por lo tanto solo la leche que cumpla con este requisito puede considerarse apta para su consumo.

1.10 TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO (TRAM)

El tiempo reducción del azul de metileno es una prueba simple y ampliamente utilizada en el análisis de alimentos. Se fundamenta en el hecho de que a medida que se desarrollan los microorganismos en la leche consumen el oxígeno presente en la misma, esto como consecuencia del metabolismo microbiano.

Como indicador se utiliza el azul de metileno que en su forma oxidada es de color azul y en su forma reducida incoloro, el cual evalúa la cantidad aproximada de bacterias en la leche y, por tanto, la capacidad de conservación de la misma.

Esto es lo que comúnmente se describe en bacteriología como un recuento metabólico indirecto (GARCÍA HURTADO, 2013) y (ASTUDILLO, 2012).

El tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora) bajo condiciones controladas es proporcional a la calidad sanitaria de la leche y aunque no es posible establecer con exactitud el número de microorganismos es factible clasificar el producto dentro de ciertos



grados aceptables o no aceptables al correlacionar el tiempo de reducción del azul de metileno con la calidad de la leche (ASTUDILLO, 2012).

La Norma INEN 9:2012 establece un valor límite mínimo de 3 horas para la prueba del TRAM, considerándose leches de buena calidad las que superen este límite de tiempo de reacción.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDIO

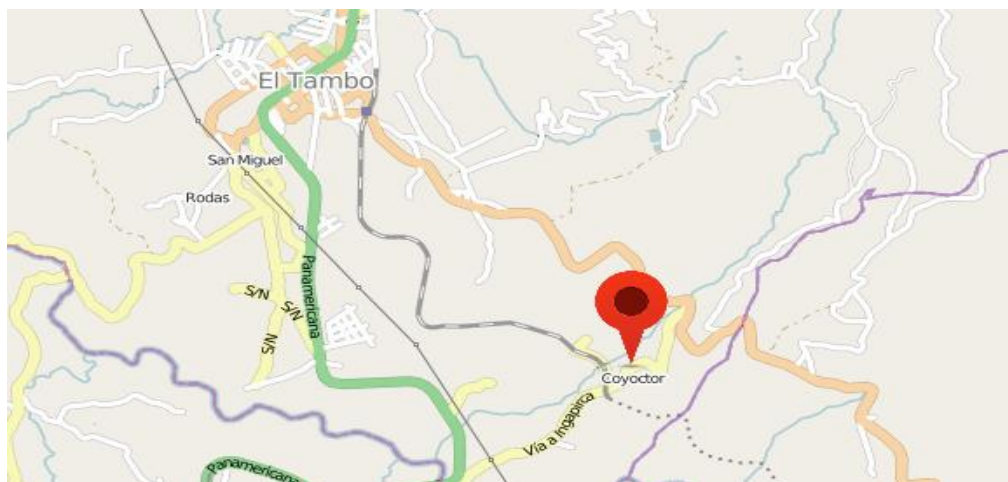
Se realizó un estudio de tipo observacional descriptivo, probabilístico.

2.2 POBLACIÓN Y ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó con los proveedores de leche que ingresan a Industrias Lacto Ochoa Fernández Cia. Ltda., ubicado en una zona urbana de la provincia del Cañar, cantón El Tambo, Sector Coyoctor – Panamericana Norte, con una altura sobre el nivel del mar de 2500 mts. y una temperatura promedio que oscila entre 11,5°C - 12°C (GOBIERNO PROVINCIAL DEL CAÑAR, 2011).

Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Industrias Lacto Ochoa Fernández Cía. Ltda.

Figura 1. Ubicación geográfica del sector Coyoctor.



Fuente: *Ubica ec.* Consultado el 7 de septiembre del 2014 de: <http://www.ubica.ec/ubicaec/lugar/p249600834>



2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de muestra fueron los 21 proveedores provenientes de diferentes sectores de la región analizada, quienes aportaron con la materia prima que ingresó a la planta de lácteos, una vez que cumplieran con los requisitos físico-químicos u otras exigencias de la industria; tales como, la limpieza de los camiones transportadores. El estudio se realizó durante el período comprendido entre las fechas: 28 de Julio y 26 de Agosto del 2014, realizándose 4 muestreos durante este lapso de tiempo, uno por cada semana, teniendo un total de 168 muestras de leche cruda que fueron procesadas.

Los análisis microbiológicos se realizaron por duplicado, incluyéndose en el estudio solamente las muestras que cumplieron con los requisitos anteriormente mencionados. **(Anexo B).**

2.4 TOMA DE MUESTRA

Cada muestra comprendió un mínimo de 100ml de leche cruda que fueron tomados directamente del tanque de almacenamiento y posterior a esto se tomó y registró la temperatura con la que llega a la planta, se colocó en frascos estériles; identificados con el número de muestra, nombre del proveedor, temperatura con la que llega, la fecha y hora de recolección. Las muestras fueron conservadas en refrigeración (cooler) para transportarlas al laboratorio en donde se procedió con el análisis microbiológico conjuntamente con la prueba del TRAM **(Anexo C).**

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

2.5.1 Recuento de microorganismos en placas Petrifilm. El uso de las placas petrifilm, es un método para llevar a cabo pruebas microbiológicas rápidas, avalado por la AOAC International para el recuento de bacterias, la principal ventaja de este método es que no requiere la preparación previa de medios de cultivo, lo que reduce costo y tiempo, no con esto reduciendo su efectividad y la confiabilidad de los resultados que se obtienen.



Las placas petrifilm consisten en láminas delgadas con un medio de cultivo y un agente solidificante soluble en agua. Además, pueden estar recubiertas por una película de polipropileno para atrapar el gas producido por algunas bacterias.

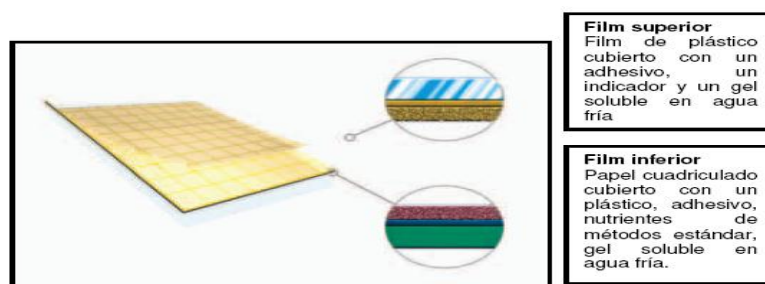
También, tienen incorporado indicadores de pH que colorean las colonias para facilitar su identificación, así como una cuadrícula para hacer el recuento de las UFC. Al sembrar en placas Petrifilm se requiere ajustar el pH de la muestra entre 6.5 y 7.2 ya que el tinte que colorea las colonias reacciona de forma óptima a pH neutro (3M, 2006).

Este tipo de placas utiliza medios deshidratados sobre películas plásticas muy finas, además posee un componente que permite la gelificación en frío y colorantes para la tinción de las colonias facilitando su identificación y recuento, el medio se rehidrata una vez que se adiciona el sustrato a analizar (MARTÍN DE SANTOS, 2007).

2.5.2 Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos en placas Petrifilm

Placas Petrifilm™ para Recuento de Aerobios totales. Son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que es el TTC (Cloruro de trifenil tetrazolio) que se asocia a la enzima deshidrogenasa de la membrana de las bacterias y los iones H se liberan reduciendo el TTC a formazan coloreando las colonias de rojo, facilitando así el recuento de las mismas. Las placas Petrifilm se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc. (3M, s.f.) **(Anexo F)**.

Figura 2. Diseño Placa Petrifilm™



Fuente: (3M, 2006)

2.6 TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO (TRAM)

El test de TRAM es un método que se basa en el hecho de que la cadena respiratoria de las bacterias se la localiza en la membrana plasmática de las mismas y es fácilmente accesible a los aceptores de electrones. Si se interrumpe la oxigenación del cultivo de una bacteria y se incorpora un indicador redox, como aceptor artificial de electrones, es posible estimar cualitativamente la actividad metabólica de esa población bacteriana, por el cambio de color del indicador.

Como indicador se utiliza el azul de metileno, que actúa como aceptor de electrones, ya que en su forma oxidada es de color azul pero al recibir electrones, en este caso, de la cadena respiratoria bacteriana se reduce y pasa a su forma incolora (RODRÍGUEZ CAVANILLI, 2005).

2.7 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

2.7.1 *Materiales y reactivos:*

- Pipetas serológicas 1ml \pm 0,006
- Pipetas serológicas 5ml \pm 0,01
- Pipetas serológicas 10ml \pm 0.02
- Pipeta automática capacidad máxima de 1000 μ L
- Erlenmeyer 200 ml



- Vaso de precipitación 500 ml
- Frascos estériles capacidad mínima de 100 ml
- Probeta 100 ml
- Tubos de ensayo estériles capacidad 15 ml
- Lámparas de alcohol
- Varillas de vidrio
- Dispensor para placas petrifilm
- Tarrinas plásticas
- Frascos de lata
- Cooler *mobillife*
- Puntas azules capacidad máxima de 1 ml
- Placas Petrifilm 3M para recuento de Aerobios Totales AC
- Agua de Peptona bufferada
- Solución de agua de peptona bufferada de concentración 0,1%
- Placas Petrifilm® 3M, para Recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos*.
- Agua destilada
- Alcohol Industrial
- Alcohol Antiséptico
- Solución de azul de metileno (solución de 5 mg/150 ml).

2.7.2 Equipos:

- Estufa de Incubación Memmert con rango de temperatura: 30°C a 70°C
- Balanza analítica Kern- capacidad máxima 200g ± 0,1mg
- Autoclave de mesa Handyclave - capacidad 16,5 litros
- Baño María Indulab 37°C. ± 0,5°C

2.7.3 Insumos:

- Etiquetas
- Marcadores

- Bolígrafos
- Hojas de papel bond
- Carpetas
- Papel empaque
- Cinta adhesiva
- Guantes
- Cofias
- Zapatones
- Mascarillas
- Fundas rojas
- Fundas azules
- Fundas negras
- Detergente
- Jabón líquido
- Cepillos para tubos de ensayo
- Bolsas de hielo
- Calculadora

2.8 PROCEDIMIENTOS

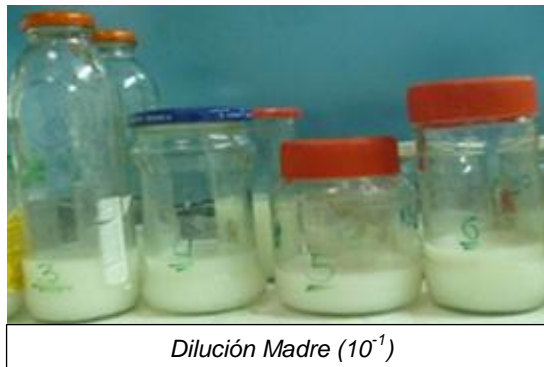
2.8.1 *Recuento de Aerobios mesófilos*

2.8.1.1 *Preparación de la muestra*

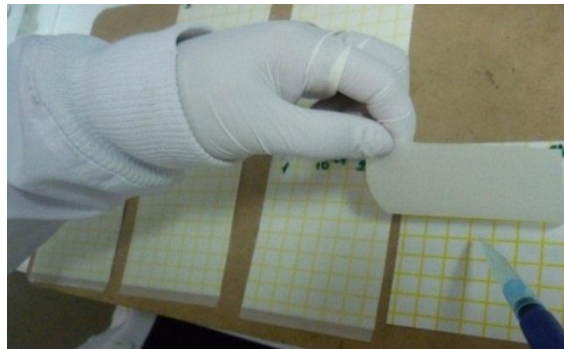
- Se midió y colocó 10ml de muestra sobre el frasco estéril con 90ml de agua de peptona 0,1% (10^{-1}).



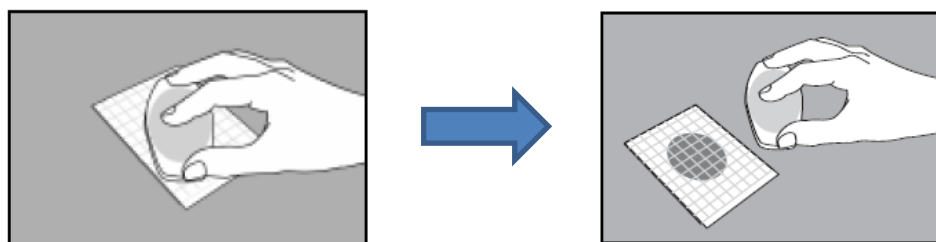
- Se agitaron los frascos mediante movimientos circulares para obtener una muestra homogénea.



- Se colocaron las placas Petrifilm previamente rotuladas en una superficie plana.
- Se levantó el film protector y se inoculó la muestra en el centro de la placa, evitando la formación de burbujas.



- Se colocó el dispersor en el centro de la placa, presionándolo levemente para distribuir la muestra de manera uniforme y se esperó alrededor de un minuto para que se solidifique el gel.

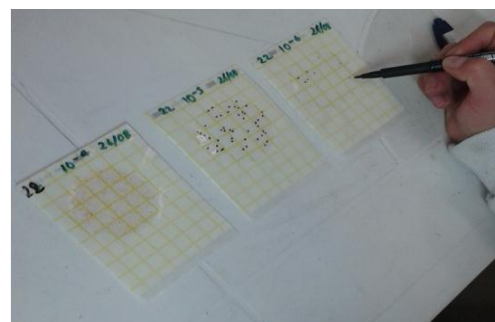
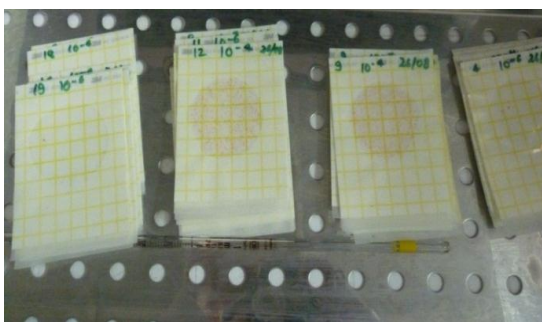


Fuente: (3M, 2006)

- Se incubó las placas a 37°C durante un periodo de 48 horas



- Transcurrido el tiempo de incubación se contó las colonias de color rojo y se realizó los cálculos correspondientes.



- Cuando una de las muestras presentó un crecimiento con colonias muy numerosas para contar se realizaron diluciones seriadas de ésta muestra, la cual fue almacenada anteriormente en refrigeración; se tomó 1ml de solución 10^{-1} y se agregó a un tubo de 9ml de agua de peptona al 0,1% para obtener una dilución 10^{-2} y así se repitió el procedimiento hasta obtener las diluciones necesarias, pudiendo llegar hasta 10^{-6} o más si así lo requiere la muestra de acuerdo a la cantidad de crecimiento que presente la placa y posteriormente se sembraron las diluciones preparadas en las placas Petrifilm.





2.8.1.2 Cálculos para el recuento de *microorganismos Aerobios mesófilos*

Luego de haber realizado el conteo manual de las colonias de *Aerobios mesófilos* tomando en cuenta que solo entraron al recuento las placas con un número entre 25 y 250 colonias independientemente de la dilución de la cual procedan. El resultado corresponde al valor del recuento obtenido, multiplicado por el inverso de la dilución a la que corresponda la placa, de esta manera se obtiene el número de unidades formadoras de colonia /ml de muestra.

$$N = \sum C \times f = \text{UFC} / \text{ml}$$

En el caso de que dos diluciones entren en el conteo se aplicó la siguiente fórmula:

Número de colonias contadas o calculadas

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Cantidad total de muestra sembrada

$$\sum C$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$V(n_1 + 0,1n_2)d$$

En donde:

$\sum C$ = Suma de las colonias o calculadas en todas las placas elegidas

n_1 = Número de placas contadas de la primera dilución seleccionada

n_2 = Número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada

d = Dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos

V = Volumen del inóculo sembrado en cada placa

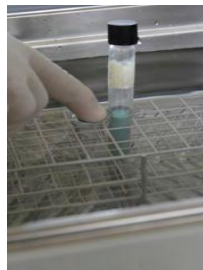
2.8.2 Prueba del TRAM

2.8.2.1 Procesamiento de la muestra

- Se midieron 10 ml de la muestra de leche cruda y se colocaron en un tubo estéril rotulado.



- Se colocó 1 ml de la solución de azul de metileno en el tubo y se homogenizó invirtiéndolo mínimo 3 veces.
- Se incubó en Baño María a 37°C.



- Se realizó la primera lectura luego de los primeros 30 minutos y las lecturas posteriores se hicieron luego de una hora.
- Cuando se produjo la decoloración de la muestra, se procedió a realizar el cálculo del tiempo que se utilizó para que se de este cambio.





2.8.2.2 Determinación del tiempo de reducción del azul de metileno.

Para determinar el intervalo de tiempo en el cual se reduce el azul de metileno, se utilizó un cronómetro el cual dio inicio a su conteo desde el momento en el que la leche se mezcló con el azul de metileno y se colocó en incubación y finalizó en el momento en el que la leche que se encuentra en el tubo de ensayo se decoloró totalmente. Este dato se interpretó basándose en el criterio de clasificación de leche expresado en la norma INEN 9:2012 para la leche cruda, esto indicará la categoría de la leche según el tiempo de duración de la prueba.

Se registraron los tiempos tanto de inicio como de finalización de la reacción obteniéndose así el tiempo de duración de la prueba para cada muestra y estos valores se los transformó a horas para realizar el posterior análisis estadístico.

2.9 RECOLECCIÓN DE LOS DATOS PRIMARIOS

Se elaboró una base de datos en Microsoft Excel 2013 para la recolección de los datos primarios y antecedentes de cada proveedor como fueron: nombre del proveedor, sector recolección de la leche, tipo de ordeño, recipiente de transporte, tiempo de traslado de la leche desde el lugar de obtención de esta hasta el centro de acopio.

2.10 PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

Para realizar una mejor gestión de los datos y resultados obtenidos de las variables analizadas en este estudio, estos se almacenaron en una base de datos elaborada para tales efectos. La base de datos original fue creada en el programa Microsoft Excel 2013, la misma que posteriormente fue procesada con el paquete estadístico SPSS v. 22.0.



Los datos cuantitativos se resumieron mediante el cálculo de medidas de tendencia central como la media y la mediana. La dispersión se presentó como la desviación estándar y los valores mínimos y máximos del conjunto de datos. Los datos cualitativos se resumieron en frecuencias relativas dadas en porcentaje.

Para la comparación de medias se probó primero la homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene para los grupos independientes, así como la distribución normal de los datos por la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Para ello el recuento de *Aerobios mesófilos* fue transformado logarítmicamente lo que permite reducir la dispersión de los datos y aproximar la distribución a la normal.

Para comparar las medias de dos grupos independientes se empleó la prueba T-Student siempre que se cumpliera la distribución normal de los datos. Cuando esto no se cumplió se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff para comparar de forma más integral las distribuciones de frecuencias de los grupos independientes.

Para comparar más de dos grupos diferentes se aplicaron el ANOVA con la prueba post-hoc de Duncan, cuando no fue posible aplicar estas pruebas, se procedió a analizar los datos por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

La concordancia de la clasificación por el método de reducción del azul de metileno y el recuento de *Aerobios mesófilos* se realizó por el coeficiente Kappa de Cohen, el cual se analiza de forma similar a los coeficientes de correlación lineal de Pearson.

La relación lineal entre las variables cuantitativas analizadas se desarrolló por el coeficiente *Rho* de Spearman como alternativa al coeficiente de Pearson cuando los datos no siguieron una distribución normal.

En todos los casos el nivel de significancia estadística fue para un alfa de 0,05.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 VARIABLES FÍSICAS, DE MANEJO Y MANIPULACIÓN DE LA LECHE CRUDA QUE INGRESA A INDUSTRIAS LACTO OCHOA - FERNÁNDEZ CÍA. LTDA

El transporte de la leche se realizó en tanques, con almacenamiento mecánico sin refrigeración y fue extraída por ordeño manual. El 85 % de los productores entregaban la leche diariamente mientras que los demás hacían la entrega tres veces por semana.

En la tabla 3 se resume el comportamiento de algunas variables físicas, asociadas al manejo y transporte de la leche por estos productores durante el período de estudio. Las mismas fueron recopiladas al momento de la entrega del producto en la industria investigada. Los datos primarios se relacionan en los **Anexos B, G, H**.

Tabla 3. Temperatura y condiciones de transporte de la leche cruda al momento del acopio.

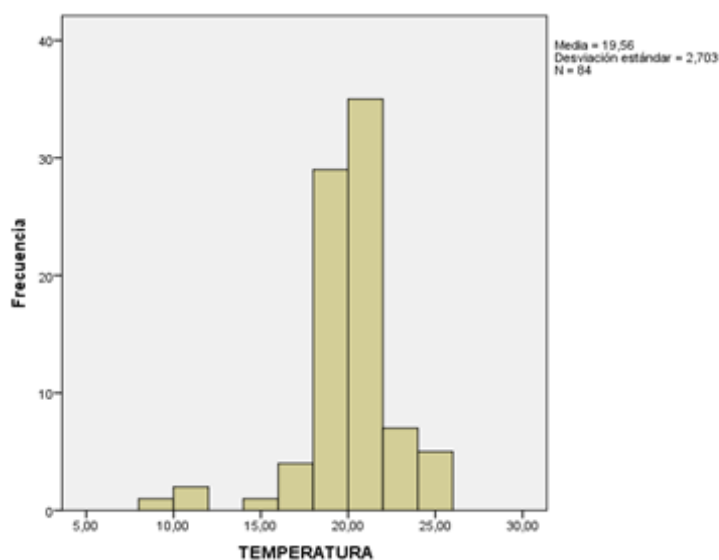
Variable	Media	Desviación estándar	Mediana	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	19,6	2,7	20,0	8,0	25,0
Tiempo de transporte (horas)	2,5	0,5	3,0	2,0	3,0

Fuente: (las autoras)

La temperatura promedio al momento de la entrega fue de 19,6°C, oscilando entre los distintos productores en valores desde 8°C hasta 25°C. Una de cada dos muestras presentó una temperatura superior a 20°C. El tiempo promedio de transporte fue de 2 horas y media, donde aproximadamente el 50 % de la leche fue entregada a las 3 horas post ordeño.

La temperatura recomendada para el transporte de la leche cruda es una temperatura inferior a 8°C si va a ser entregada en el mismo día o inferior a 6°C si se va a entregar al día siguiente (UNIVERSIDAD DE MURCIA, s.f).

Gráfico 1. Distribución de frecuencias (%) de la temperatura de la leche al momento de la entrega.



Fuente: (las autoras)

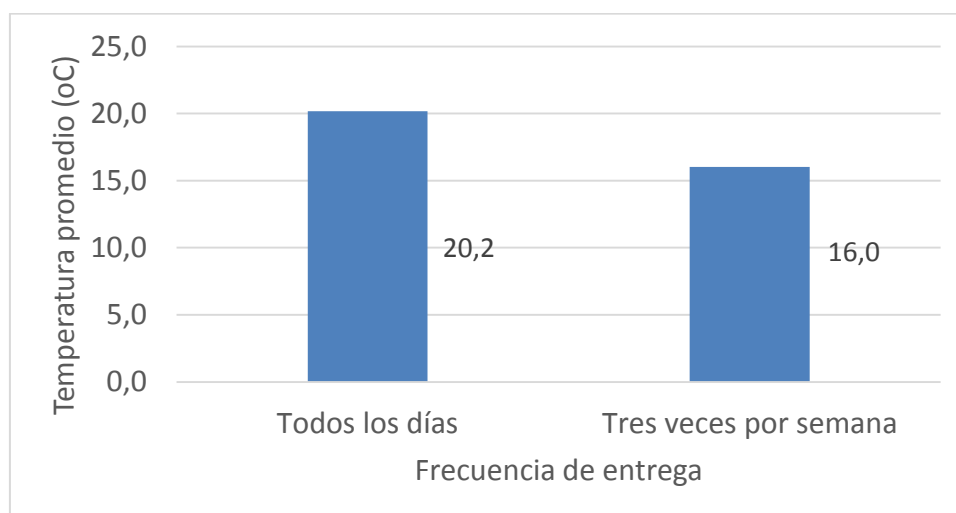
En este gráfico se muestra las frecuencias expresadas en porcentajes del total de muestras analizadas, que llegaron a la planta de acopio con sus correspondientes temperaturas de ingreso.

Los microorganismos *Aerobios mesófilos* pueden crecer en un rango de temperaturas entre 20°C y 45°C (INEN, 2006). Según (MAGARIÑOS, 2000) la leche transportada entre el intervalo de temperaturas anteriormente mencionado, además de un tiempo de transporte elevado y sufriendo agitación mecánica (oxigenación) durante este proceso, sugiere una elevada probabilidad de contaminación microbiológica.

Considerando que más de la mitad de las muestras analizadas tenían una temperatura comprendida entre el rango mencionado, con un tiempo de transporte promedio de 2,5 horas y la agitación durante su transporte, pone en

manifiesto la alta probabilidad de contaminación microbiológica de la leche acopiada.

Gráfico 2. Temperatura promedio (°C) de la leche al momento del acopio según la frecuencia de entrega del productor.



P < 0,01 Prueba T de Student para muestras independientes.

Fuente: (las autoras)

Al estratificar las muestras se evidenció que la leche entregada por los productores que acopian solo tres veces por semana posee una temperatura de unos 4°C inferior a la de los que lo entregan diariamente (Gráfico 2), a pesar de que todos ellos requieren de al menos tres horas para el transporte de la leche hasta la empresa en cuestión.

Según PINZÓN FERNÁNDEZ (2006), si bien la refrigeración rápida a temperaturas cercanas a 4°C después del ordeño puede limitar considerablemente el crecimiento de los microorganismos mesófilos, se debe tener en cuenta que una refrigeración prolongada también puede favorecer el crecimiento de microorganismos psicrótrofos. Esta flora puede superar a las 10⁵ UFC/ml en 48 horas dependiendo de las prácticas de producción y almacenamiento.

3.2 AEROBIOS MESÓFILOS, TRAM Y CALIDAD DE LA LECHE

El recuento de *Aerobios mesófilos* se movió en un amplio rango desde $2,5 \times 10^5$ UFC/ml hasta $1,5 \times 10^8$ UFC/ml este último dato registrado en una única muestra. Más del 50 % de las muestras presentaron un recuento de $1,7 \times 10^6$ UFC/ml (mediana), valor superior al recomendado por la norma INEN para que se considere a la leche cruda como aceptable para ser usada como materia prima. (INEN, 2012).

Por otra parte el TRAM se movió entre 1 hora con 20 minutos y las 3 horas con 50 minutos, donde más del 50 % de las muestras poseen un valor inferior a las 3 horas (mediana = 2,67 horas), también considerado un tiempo límite para declarar aceptable para el consumo humano de este producto (INEN, 2012). En la tabla 4 se resumen los resultados generales para estas dos variables y la transformación logarítmica del recuento de *Aerobios mesófilos*.

Tabla 4. Comportamiento general del recuento de *Aerobios mesófilos* y TRAM.

	Recuento <i>Aerobios mesófilos</i>		TRAM (horas)
	(UFC/ml) Log_{10}	(UFC/ml)	
Media	6,42	$6,8 \times 10^6$	2,59
Mediana	6,23	$1,7 \times 10^6$	2,67
Desviación estándar	0,56	$1,7 \times 10^7$	0,62
Mínimo	5,40	$2,5 \times 10^5$	1,33
Máximo	8,18	$1,5 \times 10^8$	3,83

Fuente: (las autoras)

Los resultados presentados en esta tabla se encuentran entre el rango de datos reportados en la ciudad de Cuenca por ROJAS PESÁNTEZ (2013). Dicha autora detectó recuentos de *Aerobios mesófilos* en un rango entre 7×10^4 UFC/ml y $2,96 \times 10^8$ UFC/ml.

En la Sabana de Bogotá, Colombia, un estudio que evaluó la calidad microbiológica de más de 7000 muestras de leche cruda que se recibían en



siete procesadoras indicó que el recuento de *Aerobios mesófilos* superaba en algunos casos las 10^8 UFC/ml, con un valor promedio aproximado de 10^6 UFC/ml. En dicho país, las normas de calidad en el año 2006 establecían que un recuento superior a 3×10^5 UFC/ml indicaba una leche de mala calidad microbiológica. Según los autores del estudio, las principales causas de dicha contaminación por esta flora fueron: residuos de leche en las herramientas del ordeñador, almacenamiento insalubre, higiene inadecuada de las ubres de las vacas ordeñadas y la refrigeración tardía de la leche (CALDERÓN, GARCÍA, MARTINEZ, 2006). A similares conclusiones sobre las posibles causas de la mala calidad de la leche cruda en dicho país llegaron (CALDERÓN, RODRÍGUEZ, ARRIETA, MARTÍNEZ, & VERGARA, 2012) y (NEIRA BERMÚDEZ & DE SILVESTRI SAADE, 2006). En el último estudio citado se detectaron recuentos promedios superiores a 3×10^8 UFC/ml en todas las muestras analizadas.

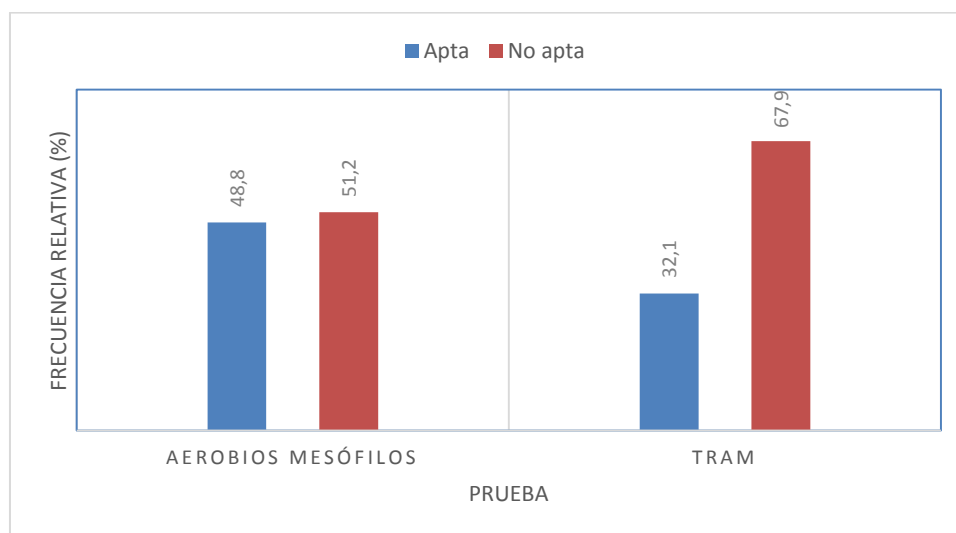
Otra investigación similar realizada en Venezuela sobre la calidad de la leche cruda acopiada y mantenida en frío en cuatro industrias indicó valores promedios de recuento de *Aerobios mesófilos* superiores a las 10^7 UFC/ml. Por otra parte, los resultados promedios de TRAM presentados en este estudio concuerdan con los datos de MOLINA SANTILLÁN (2009) quien detectó en una investigación similar realizada en cuatro comunidades del cantón Quito, Ecuador, valores de TRAM entre 1,45 h y 2,81 h.

La prueba del TRAM es una de las herramientas más empleadas en la industria lechera para evaluar con escasos recursos y de forma indirecta la calidad microbiológica del producto a comercializar. En Colombia ha sido fomentado este test durante muchos años entre los productores y comercializadores apoyándose en una bonificación para los que cumplan con los requisitos de un tiempo de reductasa superior a las tres horas (CABRERA BARRETO, 2006).

La clasificación de la leche según el cumplimiento de la norma INEN 9:2012 para los indicadores analizados se muestra en el gráfico 3. Según estos datos

aproximadamente una de cada dos muestras de leche entregadas no fueron aptas según el recuento de *Aerobios mesófilos*. Por su parte aproximadamente dos de cada tres (67,9 %) del total de las muestras analizadas no cumplen tampoco con la prueba de reductasa o TRAM, todo lo cual implica que más del 60 % del total de la leche entregada no cumple alguno de los parámetros de calidad analizados. Estos resultados corroboran lo planteado en párrafos anteriores sobre la pobre calidad del producto que se entrega a la industria objeto de estudio.

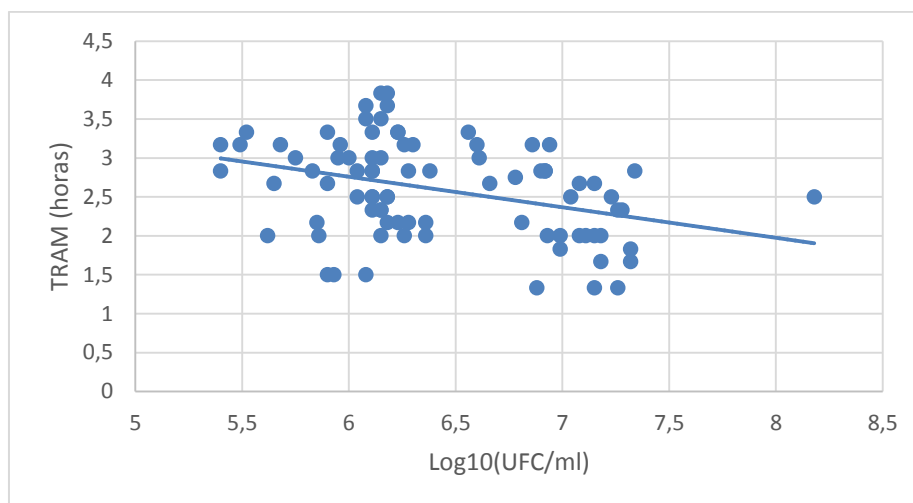
Gráfico 3. Clasificación de la leche según los parámetros recuento de Aerobios mesófilos y TRAM.



Fuente: (las autoras)

En este gráfico se representa el porcentaje de muestras aptas y no aptas de acuerdo a las determinaciones del recuento de *Aerobios mesófilos* y TRAM según los criterios expresados en la Norma INEN 9:2012.

Gráfico 4. Relación lineal entre TRAM y Log₁₀ (UFC/ml). R = -0,359; P < 0,01.



Fuente: (las autoras)

Como se observa en el gráfico 4, ambos parámetros analizados (TRAM y *Aerobios mesófilos*) están relacionados de forma negativa, siendo el coeficiente de correlación lineal de -0,359; aunque su valor es significativamente diferente de cero ($P < 0,01$), el mismo indica una débil asociación entre estas variables. Se usaron valores logarítmicos para obtener una mayor aproximación de los datos y observar de mejor manera la relación lineal entre las variables analizadas.

Tabla 5. Concordancia en la clasificación de la calidad de la leche según TRAM y el Recuento de *Aerobios mesófilos*.

PRUEBAS		TRAM		Kappa (k)
		CUMPLE	NO CUMPLE	
RECuento	CUMPLE	18	23	0,23*
AEROBIOS MESÓFILOS	NO CUMPLE	9	34	

*: Valor significativamente diferente de cero para $P = 0,024$.

Fuente: (las autoras)



En el presente gráfico se observa que existe relación entre la clasificación de la calidad de las muestras de leche aportada, según las pruebas correspondientes al recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* y el TRAM (Tabla 5). En dicho caso solo el 61 % de las muestras son clasificadas de igual modo entre las dos pruebas, lo que repercute en el valor del coeficiente concordancia Kappa el mismo que indica una relación muy débil con un valor de 0,23 significativamente diferente de cero ($P = 0,024$).

Con anterioridad algunos autores indicaron la débil o nula asociación entre la prueba del TRAM y el recuento de microorganismos. RAMÍREZ *et al.* (2005) por ejemplo obtuvieron sobre un total de 261 muestras de leche cruda que el 10 % era clasificado como no apta por el TRAM, mientras que aproximadamente un 40 % lo fue por recuento total de bacterias y un 60 % por recuento de coliformes. Algo similar indicaron LUIGI *et al.* (2013) donde el 72,5 % de las muestras presentaron recuentos de *Aerobios mesófilos* superiores a lo permitido, mientras que solo un 30 % incumplían la norma por TRAM.

Otro estudio realizado en Suazilandia, aportó un coeficiente de correlación débil entre TRAM y recuento de bacterias totales que estuvo entre -0,44 y -0,69 sugiriendo los autores que no se emplee más esta prueba en dicho país para determinar la calidad de la leche (DLAMINI, 1999). Sin embargo, MUHAMMAD *et al.* (2009) sostienen que la misma puede seguirse utilizando puesto que la correlación entre el recuento bacteriano y el TRAM pueden ser superiores a -0,800 en las diluciones de una misma muestra.

Si bien la flora aerobia mesófila es uno de los indicadores de la calidad de la leche más empleados, no debe descartarse que también pueden desarrollarse otros microorganismos como los psicrótrofos, especialmente en la leche almacenada a bajas temperaturas. Así mismo, pueden multiplicarse microorganismos anaerobios que no son considerados en la prueba del TRAM (RAMÍREZ *et al.*, 2005) y (MUHAMMAD *et al.*, 2009). Estas observaciones pueden explicar el por qué tales indicadores de calidad no tengan una concordancia elevada.



3.3 FACTORES ASOCIADOS A LA BAJA CALIDAD DE LA LECHE ENTREGADA

Las variables analizadas no siguieron una distribución normal al estratificarse por el tiempo requerido en el transporte. Es por ello que se aplicó una prueba no paramétrica que puede detectar las diferencias en las distribuciones de los datos según la estratificación por tiempo de entrega asignada: Test de Kolmogorov-Smirnoff para dos muestras independientes. Esta prueba es muy sensible cuando se quieren detectar diferencias en la forma de la distribución de frecuencias, lo que va más allá de comparar los estadísticos de tendencia central como la media o mediana que emplean otros test como el de Mann-Whitney, el test de Student o el de la mediana. De esta manera es aplicable cuando se disponen de pequeños o diferentes tamaños muestrales, o cuando se sospecha asimetría y curtosis en las distribuciones de frecuencias, condiciones no evaluadas por otras pruebas y bastante similares a las observadas en este estudio (ENGMANN & COUSINEAU, 2011) y (PETT, 2005).

Los resultados no indicaron diferencias en las distribuciones de frecuencias para el recuento de *Aerobios mesófilos* y la temperatura según las horas de transporte que declaran los productores-transportistas. Sin embargo, se detectaron diferencias en TRAM entre ambos tiempos de entrega. Los resultados sugieren que los que entregan en un tiempo menor poseen un mayor TRAM. La tabla 6 resume este análisis.

Lo planteado sobre la posible relación entre tiempo de transporte, temperatura y TRAM está en consonancia con lo descrito en párrafos anteriores considerando que un mayor tiempo de transporte a temperaturas no refrigeradas (como es el caso) puede ser una variable importante en el desarrollo de un mayor crecimiento microbiano y afectación de la calidad del producto.

Como se mencionó en párrafos anteriores, el tiempo prolongado de transporte puede asociarse con un aumento en la agitación y la temperatura de la leche lo

que a su vez puede influir sobre el crecimiento microbiano (MAGARIÑOS, 2000).

Tabla 6. Comportamiento del Recuento de *Aerobios mesófilos*, TRAM y Temperatura según el tiempo de entrega.

			Mediana	Mínimo	Máximo
RECUENTO (Log ₁₀ (UFC/ml))	Tiempo de transporte (horas)	2	6,27	5,40	8,18
		3	6,18	5,40	7,32
TRAM (horas)		2	2,79	1,33	3,50
		3	2,33	1,33	3,83
TEMPERATURA (°C)		2	20,0	8,0	21,0
		3	20,0	11,0	25,0

Fuente: (las autoras)

Tabla 7. Coeficientes de correlación Rho de Spearman entre el recuento de *Aerobios mesófilos*, TRAM y Temperatura.

Variable	TRAM (horas)	TEMPERATURA (°C)
RECUENTO (Log ₁₀ (UFC/ml))	-0,347**	0,197
TRAM (horas)	--	-0,334**

** : $P < 0,01$

Fuente: (las autoras)

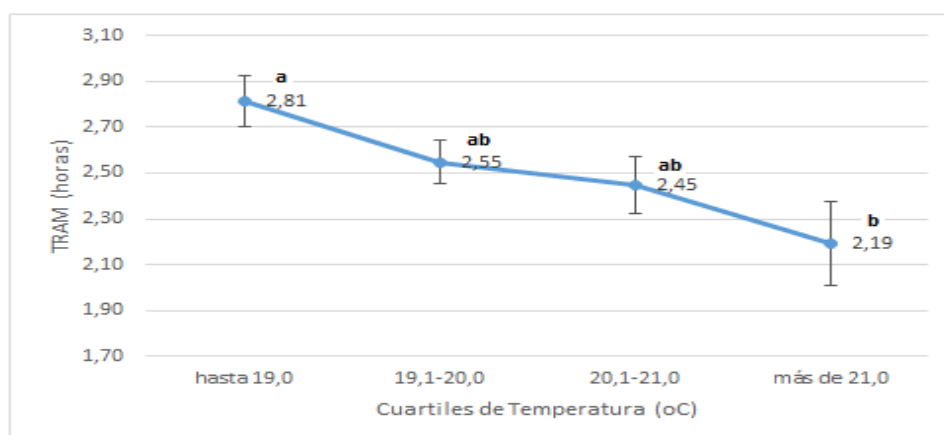
En la presente tabla se analiza la relación existente entre las variables cuantitativas que fueron analizadas en el estudio mediante el coeficiente de correlación Rho de Spearman ya que los datos no siguieron una distribución normal pudiendo notarse que entre el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* y el TRAM existe una correlación negativa porque el valor de Rho se aproxima a - 1 lo que quiere decir que a mayor cantidad de microorganismos presentes en la leche cruda menor será el tiempo en que se reduce el azul de metileno. Esto concuerda con lo mencionado en la teoría puesto que son justamente los microorganismos los que cuentan con las enzimas necesarias para reducir el azul de metileno.

Entonces al haber más microorganismos, mayor cantidad de enzimas y por ende mayor velocidad de reducción del azul de metileno. Por otro lado la correlación no es totalmente lineal porque pueden existir múltiples especies de microorganismos con distinta capacidad de reducir el azul de metileno.

También se observa que el TRAM con la temperatura se relacionaron de manera negativa lo que indica que a una mayor temperatura de almacenamiento menor es el TRAM. Esto se relaciona con el hecho de que la temperatura puede favorecer de diferente manera a diferentes especies de microorganismos Aerobios mesófilos y así modificar la reducción del azul de metileno por parte de estos microorganismos.

Por último, debe notarse que el recuento de *Aerobios mesófilos* se relaciona de manera positiva con la temperatura ya que el valor de Rho se aproxima débilmente a 1 indicándonos que mientras aumenta la temperatura el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* será mayor, lo cual es aceptable desde el punto de vista microbiológico ya que al haber una temperatura mayor a la recomendada durante el almacenamiento y transporte de la leche hay más probabilidad de desarrollo de microorganismos mesófilos.

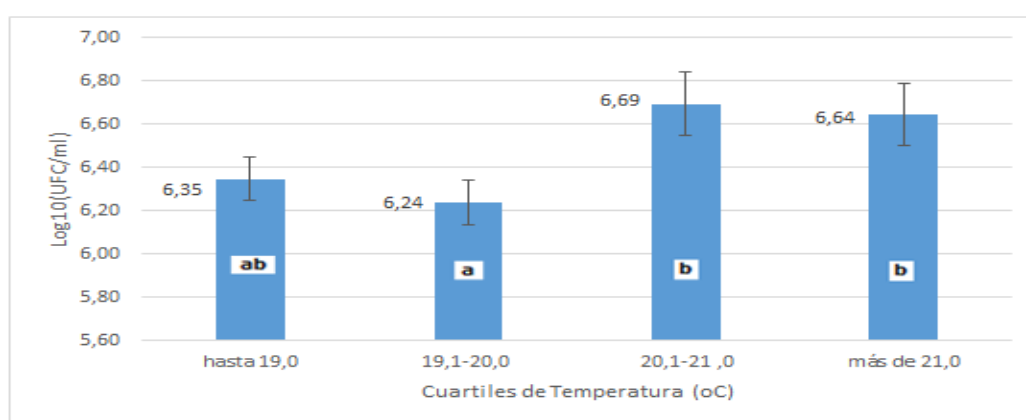
Gráfico 5. Comportamiento de TRAM según los cuartiles de temperatura (ANOVA, P = 0,010). Letras diferentes indican valores medios diferentes.



Fuente: (las autoras)

La correlación negativa entre temperatura y TRAM se evidencia también al analizar los valores medios de esta última según los cuartiles de la temperatura (Gráfico 5). En este se observa de forma más explícita el comportamiento descendente de TRAM al aumentar la temperatura de la leche, lo que sugiere un mayor crecimiento microbiano aun cuando estos no sean solo *Aerobios mesófilos*.

Gráfico 6. Comportamiento de la media del recuento de *Aerobios mesófilos* ($\text{Log}_{10}(\text{UFC/ml})$) según los cuartiles de temperatura (ANOVA, $P = 0,046$).



Fuente: (las autoras)

En esta representación gráfica se muestran los valores de la media al lado derecho de cada barra y los bigotes en su extremo superior respectivamente indican la desviación estándar de cada grupo de datos.

Si bien el coeficiente de correlación lineal entre el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* y la temperatura no fue significativo, al estratificar por cuartiles de esta última se muestra que la leche con mayor temperatura también tenían mayor recuento de estos microorganismos (Gráfico 6).

Los resultados mostrados en este gráfico suponen que los transportistas-productores de leche no están cumpliendo con las recomendaciones dadas por la OMS y la FAO para la leche y productos lácteos: El tiempo y temperatura con la que se transporta la leche deben ser mínimos para que esta sea idónea (CODEX ALIMENTARIUS, 2011).

Otro factor que pudiera estar influyendo en el no cumplimiento de lo dispuesto por la OMS-FAO es la no entrega diaria de la leche. Este producto requiere que se disponga de su uso antes de las tres horas después del ordeño, en caso contrario se debe refrigerar a aproximadamente 4°C. En la muestra investigada, el 15 % de los productores entregan sus leche tres veces por semana. Durante el tiempo que no se entrega, se almacena presumiblemente en frío, lo que manejado adecuadamente puede reducir de forma significativa el crecimiento microbiano (Tabla 8) (AGROCALIDAD, 2012).

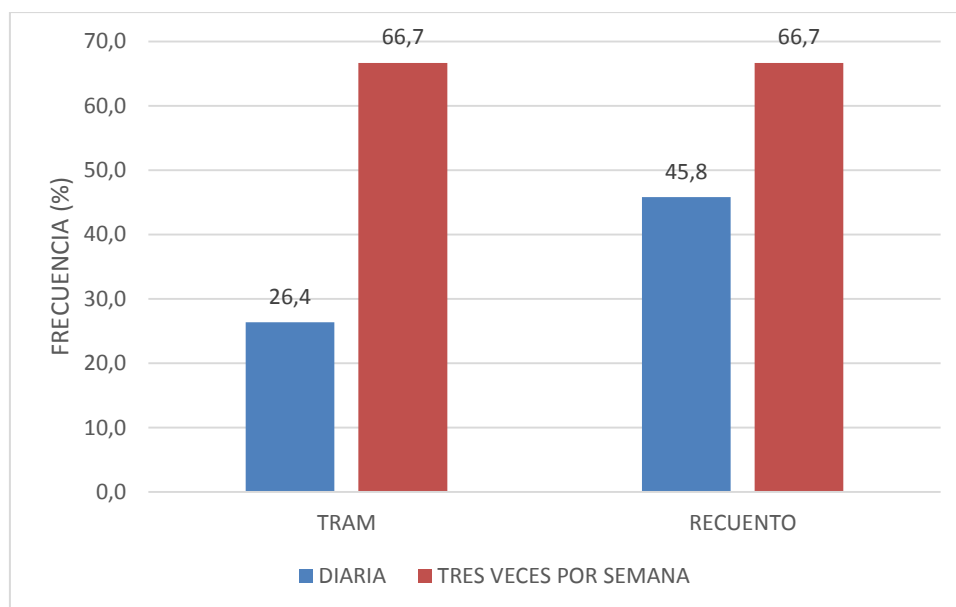
Tabla 8. Frecuencia de entrega y variables indicadoras de calidad microbiológica en la leche bajo estudio.

VARIABLE	ENTREGA	Media	Desviación estándar	P
Log ₁₀ (UFC/ml)	Diaria	6,43	0,52	0,545
	Tres veces/semana	6,30	0,81	
TRAM (horas)	Diaria	2,51	0,58	0,001
	Tres veces semana	3,11	0,56	

Fuente: (las autoras)

El resultado anterior también se ve respaldado con el hecho de que la clasificación de la calidad microbiológica de la leche tiende a ser mayor en aquellas muestras que se entregan solo tres veces por semana (Gráfico 7). No obstante, no se debe perder de vista que algunos autores han demostrado que aún en frío los microorganismos *Aerobios mesófilos* pueden alcanzar recuentos tan elevados como las 10⁷ UFC/ml, presumiblemente por una mayor carga contaminante antes del enfriamiento (ROMÁN, GUERRERO, & PACHECO, 2003).

Gráfico 7. Frecuencia con la que la leche es clasificada como apta para ser usada como materia prima según la relación de los valores de TRAM y el recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos* con la frecuencia de entrega.



Fuente: (las autoras)

Lo analizado hasta el momento indica que un elevado número de productores no cumplen con la entrega de una leche de calidad. Es entonces importante continuar indagando sobre las causas de esta desviación. Un estudio realizado en Riobamba sugiere que los programas de capacitación en buenas prácticas de producción lechera pueden mejorar notablemente la calidad del producto entregado, no solo en las variables analizadas en la presente investigación, sino además en otras como la acidez y la higiene del producto, lográndose un incremento en la rentabilidad del productor (MOLINA SANTILLÁN, 2009).



CONCLUSIONES

- Culminando el análisis se pudo concluir que aproximadamente el 50% de la leche proveniente de distintas zonas de la provincia del Cañar y que es acopiada en Industrias Lacto Ochoa-Fernández Cia. Ltda. no cumple con el valor límite máximo estipulado en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9:2012 con respecto al contenido de *Aerobios mesófilos* y la prueba del TRAM. En donde se observó que la temperatura es un factor influyente ya que las muestras fueron transportadas a una temperatura promedio de 19,6°C, oscilando entre los distintos proveedores en valores desde 8°C hasta 25°C y se determinó que una de cada dos muestras presentó una temperatura superior a 20°C, esto se debe a que casi la totalidad de la leche es transportada en recipientes de acero inoxidable que no cuentan con cadena de frío.
- Se determinó que la leche cruda que ingresa a la empresa, tiene un contenido de microorganismos *Aerobios mesófilos* promedio de $6,8 \times 10^6$ UFC/ml, con un mínimo de $2,5 \times 10^5$ UFC/ml y máximo de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml; lo cual contrastándose con el valor límite máximo permitido en la Norma INEN 9:2012 ($1,5 \times 10^6$ UFC/ml) nos demuestra que el 51,2 % de las muestras que se analizaron tienen un valor superior al dictaminado por la Norma anteriormente citada.
- Por otra parte la prueba del TRAM que se llevó a cabo muestra que la leche que se acopia tiene un promedio de 2,59 horas para esta prueba, con un máximo de 3,83 y mínimo de 1,33 horas; estos tiempos obtenidos muestran que el 69,7% de los proveedores no cumplen con el criterio de 3 horas que se encuentra establecido en la Norma INEN 9:2012 para que la leche sea clasificada como apta.



RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo vigilancias sanitarias periódica en la leche que se consume en la provincia del Cañar especialmente en los carros que expenden leche no procesada y que es entregada directamente al consumidor.
- Se debe implementar en la empresa el análisis microbiológico de la leche, ya que no es suficiente solo un análisis físico-químico para garantizar una buena calidad de la misma, tomando en cuenta que no solamente se debe buscar un beneficio económico para la empresa sino también brindar salud a los consumidores.
- Realizar un estudio sobre las prácticas de obtención, manipulación y almacenamiento de la leche de manera que se pueda determinar las potenciales causas de la contaminación durante estos procesos y así educar a los productores para mejorar la calidad de esta materia prima.
- Realizar un estudio más detallado sobre la utilidad de la prueba TRAM en la clasificación de la calidad de la leche para el consumo humano.
- Los resultados obtenidos en el estudio nos permitieron detectar cuáles de los proveedores de la empresa necesitan capacitación acerca del proceso de obtención y manipulación de la leche con la finalidad de mejorar la calidad de materia prima que ingresa a la planta de acopio.



BIBLIOGRAFÍA

1. 3M. (Julio de 2006). *Placas Petrifilm para Recuento de Aerobios Totales (AC)*. Recuperado el 2 de Diciembre de 2014, de Micronoticias. 3M Microbiología: http://solutions.3m.com.co/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1332535872000&locale=es_CO&assetType=MMM_Image&assetId=1319223911236&blobAttribute=ImageFile
2. 3M. (s.f.). *Placas Petrifilm. Aspectos Técnicos Relevantes*. Recuperado el 6 de Enero de 2015, de 3M Petrifilm: http://www.proveedormedico.com/Placas%20Petrifilm_Folleto.pdf
3. AGROCALIDAD. (2012). *Guía de Buenas prácticas Pecuarias de Producción de Leche. Resolución Técnica No.0217. R.O. No. 842 del 30 de Noviembre 2012* (Primera ed.). Ecuador: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
4. AGUDELO, D., & BEDOYA, O. (Enero-Junio de 2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, II(1), 38-42.
5. ALARCÓN, L. R., & OLIVAS, E. (2004). *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos* (Primera ed.). Ciudad Juárez.
6. ALONSO NORE, L., & POVEDA SÁNCHEZ, J. (Diciembre de 2008). *Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el mercado y Placas Perifilm 3M para el análisis de alimentos (Tesis)*. Recuperado el 4 de Enero de 2014, de Pontificia Universidad Javeriana.Facultad de ciencias.Carrera de Microbiología Industrial: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
7. ARANCETA, J., & SERRA, L. (2005). *Leche, Lacteos y Salud*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
8. ARREGUIN, B., & GARDEA, S. (22 de Abril de 2013). *Microbiología de la Leche Cruda de Vaca*. Recuperado el 16 de Septiembre de 2014, de COFOCALEC: <http://cofocalec.org.mx/>



9. ASTUDILLO, A. (2012). *Microbiología e higiene de los alimentos: Manual de prácticas* (Primera ed.). Cuenca .
10. CABRERA BARRETO, E. (2006). *Evolución de la calidad higiénica, composicional y sanitaria de la leche en Colombia conforme con el acuerdo de competitividad de la cadena láctea (Tesis)*. Bogotá-Colombia: Universidad de La Salle.
11. CALDERÓN, A., GARCÍA, F., & MARTÍNEZ, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev. MVZ Córdoba* ; 11(1), 37-725.
12. CALDERÓN, A., RODRÍGUEZ, V., ARRIETA, G., MARTÍNEZ , N., & VERGARA, O. (2012). Calidad físicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del Sistema Doble Propósito en Montería(Córdoba). *Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient.*, 15(2), 399-407.
13. CAMPOS DÍAZ, J. (Noviembre de 2003). *Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la isla de Tenerife*. Recuperado el 14 de Octubre de 2014, de Revista Española de Salud Pública. Scielo: http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S1135-57272003000600008&script=sci_arttext
14. CANO RUERA, S. (5 de Abril de 2006). *Métodos de Análisis Microbiológico. Normas ISO, UNE...* Recuperado el 17 de Octubre de 2014, de ANALIZA CALIDAD: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>
15. CARAVACA RODRIGUEZ, F., & et al. (2005). *Bases de la producción animal* (Primera ed.). Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
16. CELIS, M., & JUÁREZ, D. (2009). *Microbiología de la Leche*. Recuperado el 24 de Agosto de 2014, de Edutecne: http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf
17. CEPERO, O., AGUILAR, J., & PÉREZ, I. (2005). Efecto de los campos magnéticos en la conservación de la leche cruda sin refrigerar. *REDVET*(8), 1-12.



18. CODEX ALIMENTARIUS. (2011). *Leche y productos Lácteos* (Segunda ed.). Roma: OMS/OPS.
19. CODEX ALIMENTARIUS. (2012). *Normas Alimentarias FAO/OMS CODEX alimentarius*. Recuperado el 23 de Septiembre de 2014, de CODEX en línea Glosario de terminos-CODEX Alimetarius: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/reference/glossary.html?lang=es>
20. DÁVILA, J., & REYES, O. (2006). Evaluación Microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda en una Industria Venezolana. *ALAN*(56), 51-59.
21. DEL ANGEL MEZA, A. R. (2013). *Principios básicos de Bromatología para Estudiantes de Nutrición*. EE.UU: Author Solutions.
22. DLAMINI, A. (2006). An evaluation of the Methylenen Blue Reduction Method used for raw milk quality control in Swaziland (abstract). *UNISWA Research Journal of Agriculture, Science and Technology*, 3(1).
23. ENGMANN, S., & COUSINEAU, D. (2011). Comparing distributions: the two-sample Anderson-Darling Test as an alternative two the Kolmogorov-Smirnoff Test. *JAQM*, 6(3), 1-17.
24. GALVÁN DÍAZ, M. (10 de Septiembre de 2005). *Proceso Básico de la leche y el queso*. Recuperado el 29 de Julio de 2014, de Revista Virtual Universitaria: http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art87/sep_art87.pdf
25. GÁLVEZ DE ROSAL, A. (Agosto de 2008). *Determinación de Puntos Críticos de Contaminación en la Leche Obtenida por productores de San José Pinula, Guatemala*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Recuperado el 27 de Octubre de 2014, de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1138.pdf
26. GARCIA HERNÁNDEZ, L. A. (2005). *La Globalización Productiva y Comercial de la Leche y sus Derivados: Articulación de la ganadería intensiva lechera de la comarca lagunera* (Primera ed.). México: Plaza y Valdés.



27. GARCÍA HURTADO, M. (2013). *Recepción y Almacenamiento de Leche y otras Materias primas. INAE0209* (Primera ed.). IC Editorial.
28. GIL HERNÁNDEZ, Á. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos* (Segunda ed., Vol. II). (M. D. Lopez, Ed.) Madrid: Editorial Médica Panamericana.
29. GOBIERNO PROVINCIAL DEL CAÑAR. (2011). *El Tambo*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2014, de http://www.gobiernodelcanar.gob.ec/public_html/paginas/el-tambo.17
30. INEN. (2006). *NTE INEN 1529-5:2006. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos Aerobios mesófilos.REP.* Quito.
31. INEN. (2012). *NTE INEN 9:2012 Leche cruda. Requisitos.* Quito.
32. JOHNSON, A. P., & SA, L. P. (2001). La Leche de calidad requiere una rutina de ordeño adecuado. *Producción animal. UNCPBA, 16(169), 62-67.*
33. LOYA CHÁVEZ, A. (2013). *Efectos del Ozono en las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas de la leche.* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia.
34. LUIGI, T., ROJAS, L., & VALBUENA, O. (2013). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda y pasteurizada expendida en el estado de Carabobo, Venezuela. *Salus online, 17(1), 35-50.*
35. MAGARIÑOS, H. (2000). *Producción Higiénica de Leche Cruda: Manejo adecuado de la leche.* Recuperado el 24 de Agosto de 2014, de División de Ciencia y Tecnología: http://www.science.oas.org/oea_gtz/LIBROS/LA_LECHE/le_html/cap3_leche.htm
36. MARTÍN DE SANTOS, R. (2007). *Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de alimentos.* Madrid.



37. MOLINA SANTILLÁN, F. (2009). *Determinación de la calidad de la leche cruda (acidez, densidad, grasa, reductasa, sólidos totales), aplicando un programa de capacitación en 4 comunidades de la parroquia Pintag, cantón Quito (Tesis)*. Quito-Ecuador : Escuela Superior Politécnica de Chimborazo .
38. MUHAMMAD, K., ALTAF, I., HANIF, A., ANJUM, A. A., & TIPU, M. Y. (2009). Monitoring of hygienic status of raw milk marketed in Lahore City, Pakistan. *Journal of Animal & Plant Science*, 19(2), 74-77.
39. NEIRA BERMÚDEZ, E., & DE SILVESTRI SAADE, J. (2006). Análisis del proceso de ordeño y de la calidad higiénica de la leche utilizada en la fabricación del queso Paipa en el municipio Paipa (Boyacá), Colombia. *Revista de Investigación*, 6(2), 70-163.
40. PARRA, R. (Enero-Junio de 2010). Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Scielo*, 8(1), 96.
41. PETT, M. (2005). *Nonparametric Statistics for Health Care Research. Statistics for small samples and unusual distributions* . California-US : Sage Publications .
42. PINZÓN FERNÁNDEZ, A. (2004). *Montaje de una planta piloto para la producción y comercialización de leche pasteurizada en empaque biodegradable en la meseta de Popayán (Tesis)*. Recuperado el 16 de Octubre de 2015, de UNAD: https://images.engormix.com/s_articles/Pinzon_leche_bacterias.PDF
43. PINZÓN FERNÁNDEZ, A. (2006). *Determinación del Índice de Bacterias mesófilas aerobias presentes en la leche Cruda versus Leche Pasteurizada que se comercializan en la Zona Urbana de la Ciudad de Popayán (Tesis)*. Popayán: Universidad Técnica y a Distancia. Facultad de Ciencias Agrarias .
44. RAMÍREZ, N., HERNÁNDEZ , J. E., & GONZÁLEZ , Y. (2005). *Aplicación del sistema DIRALEC para la evaluación de la calidad microbiológica de la leche en la provincia de Sancti Spíritus*. La Habana.Cuba: IV Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería.
45. REVELLI, G., SBODIO, O., & TERCERO, E. (Septiembre de 2004). *Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona*



- noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Recuperado el 12 de Agosto de 2014, de Revista Argentina de Microbiología. Scielo: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412004000300010
46. RODRÍGUEZ CAVANILLI, E. (2005). *Bacteriología Clínica: Principios y Prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universiada de Costa Rica.
47. ROJAS PESÁNTEZ, J. M. (2013). *Estudio Preliminar de Aerobios Mesófilos en la leche cruda que se expende en carros repartidores en la ciudad de Cuenca (Tesis)*. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay. Departamento de Postgrados.
48. ROMÁN, S., GUERRERO, L., & PACHECO, L. (2003). Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. *Rev.Cient FCV-LUZ., XII, 13(2)*, 146-152.
49. ROMERO DEL CASTILLO, R., & MESTRES, J. (2004). *Productos lácteos. Tecnología*. Catalunya: Edicions UPC.
50. ROVID, A., & et.al. (2010). *Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales* (Primera ed.). EE.UU: CFSPH Iowa State University.
51. RUIZ OÑATE, E.G. (2012). "*Efecto del ozono sobre la eliminación de Brettanomyces bruxellensis en maderas de roble americano*". Facultad de Ciencias Agronómicas escuela de pregrado (Tesis). Recuperado el 17 de Octubre de 2014, de <http://www.tesis.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112206/Eduardo%20Ruiz%20O%C3%B1ate.pdf?sequence=1>.
52. THE UNIVERSITY WISCONSIN-MADISON. (2013). *Hoja de Información sobre cuestiones de Seguridad en la Granja; Riesgos para la salud al beber leche cruda*. Recuperado el 12 de Agosto de 2014, de INSTITUTO BABCOCK: http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/documents/es_rawmilkRev.pdf.
53. UNIVERSIDAD DE MURCIA. (s.f). *Higiene, Inspección y Control Alimentario*. Recuperado el 19 de Marzo de 2015, de Higiene, Inspeccion y Control de



Calidad de la leche: <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/tema-2.pdf>

54. VERA QUEZADA, J. (30 de Octubre de 2013). *Control de Calidad de Productores Pecuarios: Factores que Influyen en la calidad de la leche*. Recuperado el 16 de Septiembre de 2014, de Slideshare: <http://es.slideshare.net/jotarqv/control-decalidad>
55. WATTIAUX, M. A. (2007). *Composición de la leche y valor nutricional*. Recuperado el 20 de Mayo de 2014, de Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin Madison: http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_19.es.pdf



ANEXOS

Anexo A. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9: 2012 (Leche Cruda. Requisitos) Quinta revisión.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 9:2012
Quinta revisión

LECHE CRUDA. REQUISITOS

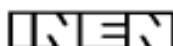
Primera Edición

RAW MILK REQUIREMENTS

First Edition

DESCRIPCIÓN: Este es el primer libro de normas técnicas, en idioma español, sobre leche cruda, en quinto libro.
AL: 03.01-011
CD: 01. 03. 01. 01. 01. 01
CI: 01. 01. 01
LIC: 01. 01. 01. 01

CDU: 637.133.4
ICS: 67.100.01



CIU: 3112
AL 03.01-401

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	LECHE CRUDA REQUISITOS	NTE INEN 9:2012 Quinta revisión 2012-01
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir la leche cruda de vaca, destinada al procesamiento.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma se aplica únicamente a la leche cruda de vaca. La denominación de leche cruda se aplica para la leche que no ha sufrido tratamiento térmico, salvo el de enfriamiento para su conservación, ni ha tenido modificación alguna en su composición.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Leche.</i> Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo.</p> <p>3.1.2 <i>Leche cruda.</i> Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C).</p> <p style="text-align: center;">4. DISPOSICIONES GENERALES</p> <p>4.1 La leche cruda se considera no apta para consumo humano cuando:</p> <p>4.1.1 No cumple con los requisitos establecidos en el Capítulo 5 de la presente norma.</p> <p>4.1.2 Es obtenida de animales cansados, deficientemente alimentados, desnutridos, enfermos o manipulados por personas afectadas de enfermedades infectocontagiosas.</p> <p>4.1.3 Contiene sustancias extrañas ajenas a la naturaleza del producto como: conservantes (formaldehído, peróxido de hidrógeno, hipocloritos, cloraminas, dicromato de potasio, lactoperoxidasa adicionada), adulterantes (harinas, almidones, sacarosa, cloruros, suero de leche, grasa vegetal), neutralizantes, colorantes y residuos de medicamentos veterinarios, en cantidades que superen los límites indicados en la tabla 1.</p> <p>4.1.4 Contiene calostro, sangre, o ha sido obtenida en el período comprendido entre los 12 días anteriores y los 7 días posteriores al parto.</p> <p>4.1.5 Contiene gérmenes patógenos o un conteo microbiano superior al máximo permitido por la presente norma, toxinas microbianas o residuos de pesticidas, y metales pesados en cantidades superiores al máximo permitido.</p> <p>4.2 La leche cruda después del ordeño debe ser enfiada, almacenada y transportada hasta los centros de acopio y/o plantas procesadoras en recipientes apropiados autorizados por la autoridad sanitaria competente.</p> <p>4.3 En los centros de acopio la leche cruda debe ser filtrada y enfiada, a una temperatura inferior a 10°C con agitación constante</p> <p>4.4 Los límites máximos de pesticidas serán los que determine el Codex Alimentarius CAC/MRL 1 (Continúa)</p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, leche cruda, requisitos.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-3999 - Baquerizo Moreno Es-09 y Almagro - Quito-Ecuador - Prohíbida la reproducción



4.5 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios para la leche serán los que determine el Codex Alimentario CAC/MRL 2.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Requisitos organolépticos (ver nota 1)

5.1.1.1 *Color.* Debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento.

5.1.1.2 *Olor.* Debe ser suave, lácteo característico, libre de olores extraños.

5.1.1.3 *Aspecto.* Debe ser homogéneo, libre de materias extrañas.

5.1.2 Requisitos físicos y químicos

5.1.2.1 La leche cruda, debe cumplir con los requisitos físico-químicos que se indican en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda.

REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MAX.	METODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C A 20 °C	-	1,029 1,028	1,033 1,032	NTE INEN 11
Materia grasa	% (fracción de masa) ⁴	3,0	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	-
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14
Punto de congelación (punto crioscópico) **	°C °H	-0,536 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16
Ensayo de reductasa (azul de metileno)***	h	3	-	NTE INEN 018
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68 % en peso o 75 % en volumen; y para la leche destinada a ultrapasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71 % en peso o 78 % en volumen			NTE INEN 1500
Presencia de conservantes ¹⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de neutralizantes ²⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Presencia de adulterantes ³⁾	-	Negativo		NTE INEN 1500
Grasas vegetales	-	Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	-	Negativo		NTE INEN 2401
Prueba de Brucelosis	-	Negativo		Prueba de anillo PAL (Ring Test)
RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS ⁴⁾	ug/l	---	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2	Los establecidos en el compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del codex ⁵⁾

** Diferencia entre el contenido de sólidos totales y el contenido de grasa.

** °C= °H - 1, donde H= 0,9656

*** Aplicable a la leche cruda antes de ser sometida a enfriamiento

1) Conservantes: formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas, lactoperoxidasa adicionada y dióxido de cloro.

2) Neutralizantes: orina, carbonatos, hidróxido de sodio, jabones.

3) Adulterantes: Harina y almidones, soluciones azucaradas o soluciones salinas, colorantes, leche en polvo, suero de leche, grasas vegetales.

4) "Fracción de masa de B, W_B: Esta cantidad se expresa frecuentemente en por ciento, %. La notación "% (m/m)" no deberá usarse".

5) Se refiere a aquellos medicamentos veterinarios aprobados para uso en ganado de producción lechera.

6) Establecidos por el comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos

NOTA 1. Se podrán presentar variaciones en estas características, en función de la raza, estación climática o alimentación, pero estas no deben afectar significativamente las características sensoriales indicadas.

5.1.3 **Contaminantes.** El límite máximo para contaminantes es el que se indica en la tabla 2.

TABLA 2. Límites máximo para contaminantes

Requisito	Límite máximo (LM)	Método de ensayo
Plomo, mg/kg	0,02	ISO/TS 6733
Aflatoxina M1, µg/kg	0,5	ISO 14674

5.1.4 **Requisitos microbiológicos.** La leche cruda debe cumplir con los requisitos especificados en la tabla 3.

TABLA 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en hato

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos REP, UFC/cm ³	1,5 x 10 ⁶	NTE INEN 1529-5
Recuento de células somáticas/cm ³	7,0 x 10 ⁵	AOAC = 978.26

5.2 **Requisitos complementarios.** El almacenamiento, envasado y transporte de la leche cruda debe realizarse de acuerdo a lo que señala el Reglamento de leche y productos lácteos del Ministerio de Salud Pública.

6. INSPECCIÓN

6.1 **Muestreo.** El muestreo debe realizarse de acuerdo con la NTE INEN 4.

6.2 **Aceptación o rechazo.** Se acepta el producto si cumple con los requisitos indicados en esta norma, caso contrario se rechaza.

Anexo B. Lista de proveedores de leche del centro de acopio.

N°	Sector de recolección	Cantidad aproximada de leche (Litros)	Tipo de ordeño	Tiempo de traslado (Horas)	Recipiente de transporte
1	Ingapirca	1500	Manual	2	Tanque
2	El Tambo	1300	Manual	2	Tanque
3	Chorocopte	900	Manual	2	Tanque
4	Honorato Vásquez	1000	Manual	2	Tanque
5	Ingapirca	1200	Manual	3	Tanque
6	Chunchi	1500	Manual	3	Tanque
7	Chorocopte	2000	Manual	3	Tanque
8	Tucayta	100	Manual	2	Tanque
9	Malal	1300	Manual	3	Tanque
10	Chunchi	3000	Manual	3	Tanque
11	Socarte	2500	Manual	3	Tanque
12	Juncal	700	Manual	2	Tanque
13	Cañar	1000	Manual	2	Tanque
14	Cañar - Honorato Vasquez	2000	Manual	3	Tanque
15	Biblián - Azogues	1700	Manual	3	Tanque
16	Capsul - Chunchi	1200	Manual	3	Tanque
17	Cañar	500	Manual	2	Tanque
18	Biblián	1400	Manual	3	Tanque
19	Socarte	1200	Manual	3	Tanque
20	Cañar	2000	Manual	2	Tanque
21	Joyacshi	500	Manual	2	Tanque

Anexo C. Flujoograma gráfico de la toma de muestra.



Llegada de proveedores a la planta



Toma de muestra del proveedor



Tomar aprox. 100 ml de leche cruda



Análisis Físico – Químico



Muestras de cada proveedor



Conservación de las muestras

Anexo D. Imágenes descriptivas del Centro de Acopio "Industrias Lacto Ochoa Fernandez".

Figura 3. Centro de acopio de leche cruda "Industrias Lacto Ochoa – Fernández".



Figura 4. Llegada de proveedores de leche al centro de acopio.



Figura 5. Tanque de acero Inoxidable para el transporte de cruda que llega el centro de acopio.



Figura 6. Cantarilla para transporte de la leche cruda que llega al centro de acopio.



Figura 7. Tanque de almacenamiento para la leche cruda en la planta.



Anexo E. Imágenes descriptivas de los instrumentos utilizados en el estudio.

Figura 8. Medidor de pH y temperatura para leche.



Figura 9. Estufa de incubación Memmert con un rango de temperatura de trabajo: +30° a 70°C.



Figura 10. Autoclave .




Figura 11. Cooler para mantener las muestras en refrigeración.



Anexo F. Guía de interpretación Placas 3M Petrifilm para el recuento de Aerobios.

Placas 3M™ Petrifilm™
Placas para el Recuento de Aerobios AC



Guía de Interpretación

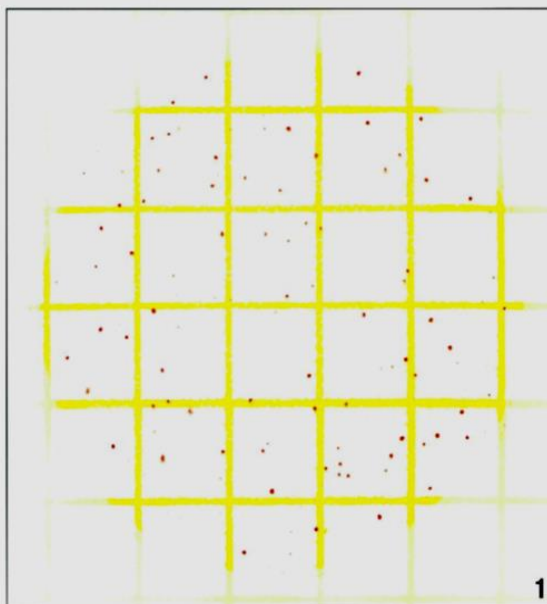
Esta guía lo familiarizará con las Placas 3M™ Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios (cuenta total en placa o aerobios mesófilos).



Placas™ 3M Petrifilm™

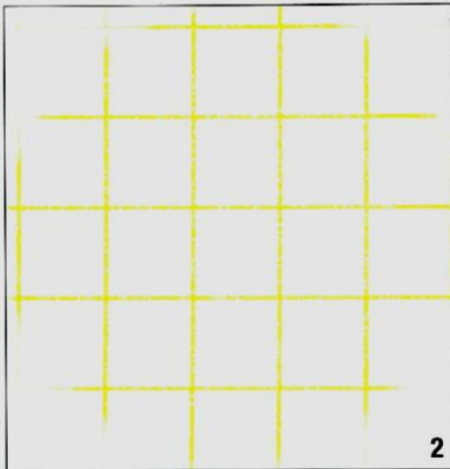
Placas para el Recuento de Aerobios AC

Las Placas 3M™ Petrifilm™ para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) son un medio de cultivo listo para usar, que contiene los nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento total de bacterias aerobias en productos, superficies, etc.



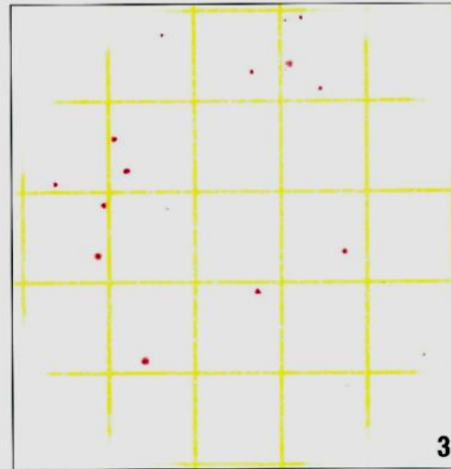
Conteo de Bacterias Aerobias = 152

El indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuento todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.



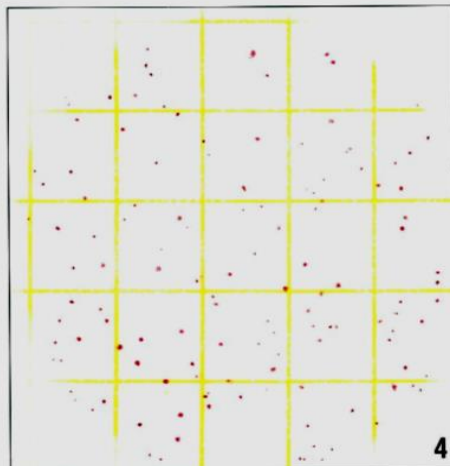
Conteo de Bacterias Aerobias = 0

La Placa Petrifilm™ para Recuento de Aerobios Totales es de fácil interpretación. La figura 2 muestra una placa sin crecimiento de colonias.



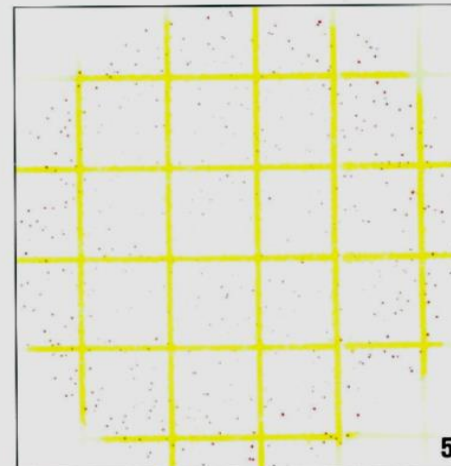
Conteo de Bacterias Aerobias = 16

La figura 3 muestra una Placa Petrifilm™ AC con crecimiento bajo de colonias.



Conteo de Bacterias Aerobias = 143

El rango recomendado de conteo en la Placa Petrifilm™ AC está entre 25-250 colonias. Obsérvese la figura 4.

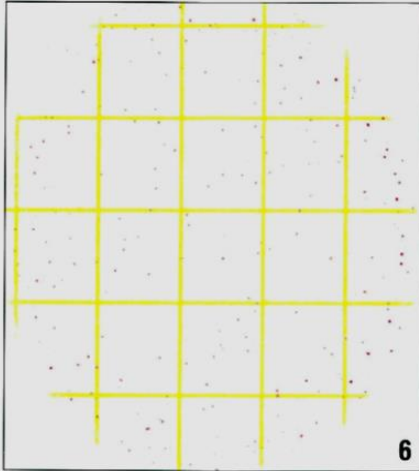


Conteo de Bacterias Aerobias = 560 "estimado"

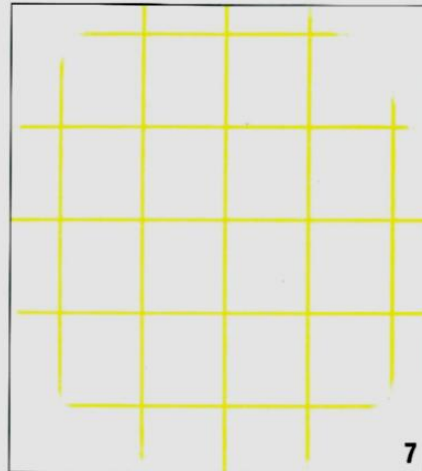
Cuando el número de colonias es mayor a 250 (como se puede observar en la figura 5), por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1 cm²) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación de Petrifilm™ AC es de 20 cm².



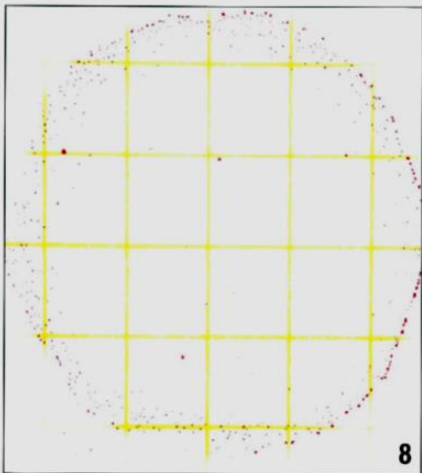
**MNPC (muy numeroso para contar):
para obtener mejores resultados, diluya su muestra.**



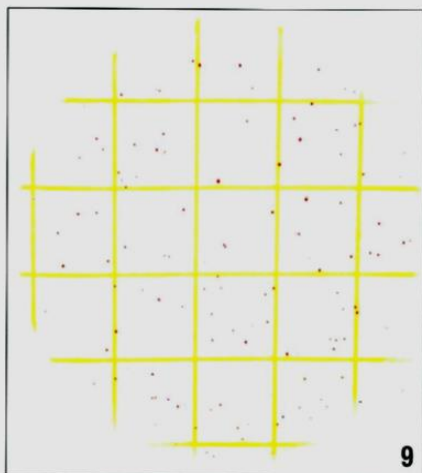
Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC
Conteo estimado: 10^9
 La figura 6 muestra una Placa Petrifilm™ AC con colonias muy numerosas para contar.



Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC
Conteo estimado: 10^8
 Con recuentos muy altos, el área total de crecimiento puede virar o tornarse rosa, como se muestra en la figura 7. Usted podría observar colonias individuales sólo en el borde del área de crecimiento. Registre este resultado como muy numeroso para contar (MNPC).

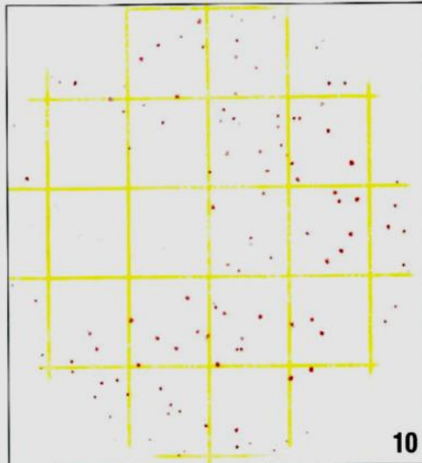


Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC
Conteo estimado: 10^7
 Ocasionalmente, la distribución de las colonias puede aparecer de forma desigual, no homogénea, como se muestra en la figura 8. Esto también es una indicación de un resultado MNPC.



Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC
Conteo estimado: 10^7
 Las colonias de la figura 9 podrían confundirse como contables a primera vista. Sin embargo, si usted observa detalladamente el borde o filo del área de crecimiento, podrá visualizar una alta concentración de colonias. Registre este resultado como MNPC.

Licuefacción del gel y partículas de productos

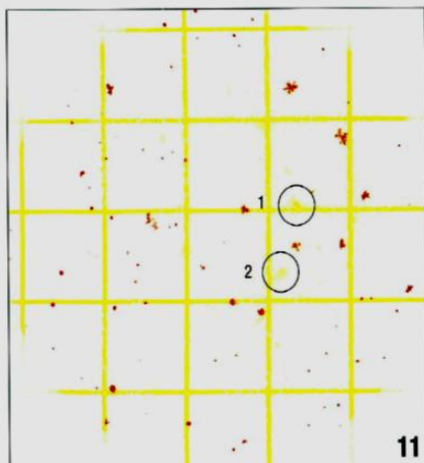


Conteo de Bacterias Aerobias = 160

Como se aprecia en la figura 10, algunas especies de bacterias pueden llegar a licuar el gel de las Placas Petrifilm™ AC.

Cuando esto ocurra:

1. Determine el promedio en los cuadros no afectados y estime los resultados.
2. Realice conteos preliminares para verificar el crecimiento; la licuefacción generalmente se presenta de manera tardía.



Conteo de Bacterias Aerobias = 83

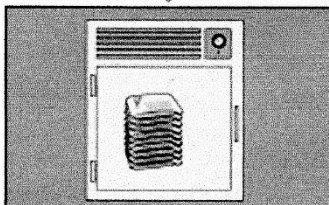
Debido a que en las Placas Petrifilm™ AC las colonias de aerobios se tiñen de rojo, se las puede diferenciar de partículas o residuos de producto, ya que éstos tienen una forma irregular y color opaco (observe los círculos 1 y 2 de la figura 11).

3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios

Recomendaciones de uso

Para detallar información sobre PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

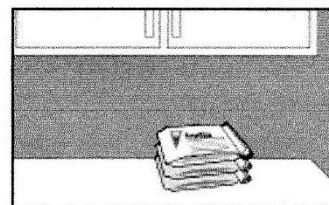
Almacenamiento



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.

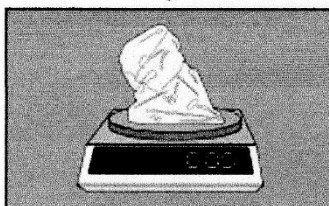


2 Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.

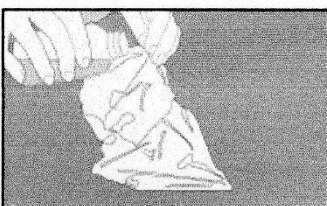


3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ($\leq 77^{\circ}\text{F}$) y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigere los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelos en congelación. Para usar las placas, saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes descritas hasta su fecha de caducidad.

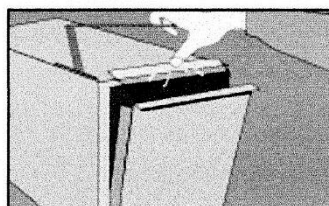
Preparación de la muestra



4 Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipeteo la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH_2PO_4 y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); *buffer* de agua de peptona (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

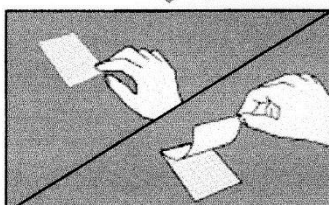


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

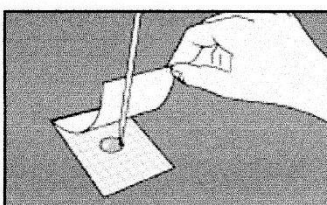
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2: Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH. Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice *buffers* que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

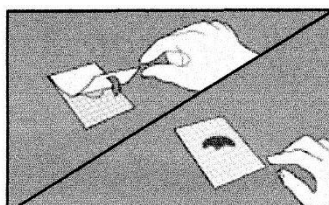
Inoculación



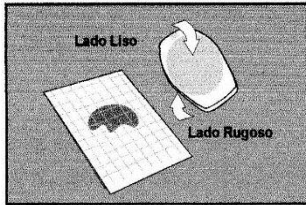
7 Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la lámina semitransparente superior.



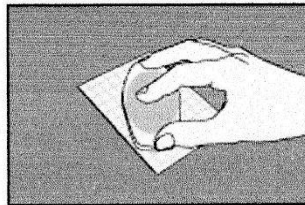
8 Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.



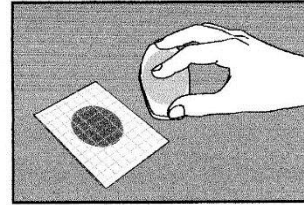
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.



10 Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispersor o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

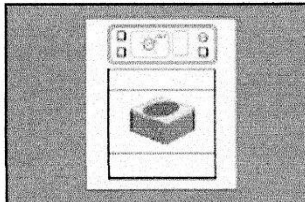


11 Presione suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No gire ni deslice el dispersor. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.



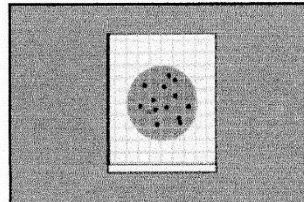
12 Levante el dispersor o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

Incubación

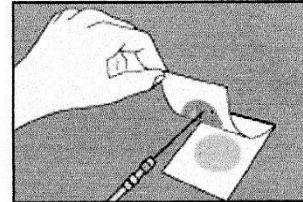


13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Interpretación



14 Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la *Guía de interpretación* para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levante la película superior y recoja la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos aprobados más conocidos son:

- **AOAC método oficial 986.33** (leche y productos lácteos)
Incubar 48 hrs. (\pm 3 hrs.) a 32 °C (\pm 1 °C).
- **AOAC método oficial 990.12**
Incubar 48 hrs. (\pm 3 hrs.) a 35 °C (\pm 1 °C).
- **AFNOR método validado 3M 01/1-09/89**
Incubar 72 hrs. (\pm 3 hrs.) a 30 °C.
- **Método MNKL 146.1993**
Incubar 72 hrs. (\pm 3 hrs.) a 30 °C.

Comentarios adicionales

* Si tiene dudas o preguntas, llame al 1-651-733-7562 o al Representante de Ventas 3M más cercano a usted.

3M

Microbiology Products
3M Center Bldg. 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000
USA
1800-228-3957
microbiology@mmm.com
www.3M.com/microbiology

3M México
Av. Santa Fe 55
Col. Santa Fe, CP 01210
México, D.F.
Tel. (55) 5270-0454
microbiologiamx@mmm.com
www.3M.com/microbiologia

3M Argentina
Los Árboles 842
Hurlingham
Buenos Aires, Argentina
Tel. (11) 4469-8200
microbiologia-ar@mmm.com

Petrifilm es una marca registrada de 3M.
Impreso en: México.
Revisión: 2004.
Referencia: 70-2008-8102-0.



Anexo G. Resultados del Recuento de microorganismos *Aerobios mesófilos*.

Semana N° 1			Fecha: 28 - 30 de Julio del 2014			
N° del proveedor	Hora de recepción	T° al Ingreso (°C)	Fecha de Siembra	T° de Incubación (°C)	Fecha de Lectura de Resultados	Resultado UFC/ml
1	9:38	19	28/07/2014	37	30-07-2014	6,7x10 ⁵
2	10:16	20	28/07/2014	37	30-07-2014	1,3x10 ⁶
3	11:00	20	28/07/2014	37	30-07-2014	1,3x10 ⁶
4	10:05	21	28/07/2014	37	30-07-2014	4,6x10 ⁶
5	10:30	19	28/07/2014	37	30-07-2014	5,6x10 ⁵
6	10:21	21	28/07/2014	37	30-07-2014	8,5x10 ⁶
7	10:33	19	28/07/2014	37	30-07-2014	3,6x10 ⁶
8	10:20	18	28/07/2014	37	30-07-2014	1,3x10 ⁶
9	10:05	20	28/07/2014	37	30-07-2014	1,7x10 ⁶
10	10:40	22	28/07/2014	37	30-07-2014	6,4x10 ⁶
11	11:21	24	28/07/2014	37	30-07-2014	1,3x10 ⁷
12	10:29	18	28/07/2014	37	30-07-2014	4,1 x10 ⁶
13	10:32	21	28/07/2014	37	30-07-2014	3,1x10 ⁵
14	10:46	18	28/07/2014	37	30-07-2014	1,5 x10 ⁶
15	3:45	11	28/07/2014	37	30-07-2014	7,9x10 ⁵
16	11:00	20	28/07/2014	37	30-07-2014	1,5x10 ⁷
17	11:12	18	28/07/2014	37	30-07-2014	9,2x10 ⁵
18	14:00	21,9	28/07/2014	37	30-07-2014	1,4x10 ⁶
19	13:30	17	28/07/2014	37	30-07-2014	1,5x10 ⁷
20	10:31	18	28/07/2014	37	30-07-2014	8,3x10 ⁶
21	11:00	21	28/07/2014	37	30-07-2014	2,2x10 ⁷



Recuentos que superan el valor límite máximo de la Norma INEN 9:2012 (1,5x10⁶ UFC/ml)



Semana N° 2			Fecha: 4 - 6 de Agosto del 2014			
N° del proveedor	Hora de recepción	T° al Ingreso (°C)	Fecha de Siembra	T° de Incubación (°C)	Fecha de Lectura de Resultados	Resultados UFC/ml
1	9:40	20	4-08-14	37	6-08-14	8,0x10 ⁵
2	10:18	20	4-08-14	37	6-08-14	1,1x10 ⁶
3	10:34	20	4-08-14	37	6-08-14	1,3x10 ⁶
4	10:17	20	4-08-14	37	6-08-14	1,8x10 ⁶
5	10:53	20	4-08-14	37	6-08-14	3,3 x10 ⁵
6	10:20	21	4-08-14	37	6-08-14	1,4 x10 ⁷
7	10:35	18	4-08-14	37	6-08-14	1,7 x10 ⁶
8	9:51	19	4-08-14	37	6-08-14	1,3x10 ⁶
9	10:09	20	4-08-14	37	6-08-14	2,4 x10 ⁶
10	10:35	21	4-08-14	37	6-08-14	2,3 x10 ⁶
11	10:30	24	4-08-14	37	6-08-14	1,8 x10 ⁷
12	10:39	19	4-08-14	37	6-08-14	1,8 x10 ⁶
13	10:54	18	4-08-14	37	6-08-14	2,5x10 ⁵
14	10:30	19	4-08-14	37	6-08-14	1,2 x10 ⁶
15	15:30	19	4-08-14	37	6-08-14	8,5 x10 ⁵
16	12:10	23	4-08-14	37	6-08-14	2,1 x10 ⁷
17	10:15	18	4-08-14	37	6-08-14	8,0 x10 ⁵
18	13:30	23	4-08-14	37	6-08-14	1,4 x10 ⁶
19	14:30	10	4-08-14	37	6-08-14	1,4 x10 ⁷
20	10:38	17	4-08-14	37	6-08-14	6,0 x10 ⁶
21	10:30	21	4-08-14	37	6-08-14	1,9 x10 ⁷



Recuentos que superan el valor límite máximo de la Norma INEN
9:2012 (1,5x10⁶ UFC/ml)



Semana N°3			Fecha: 12 - 14 de Agosto del 2014			
N° del proveedor	Hora de recepción	T° al Ingreso (°C)	Fecha de Siembra	T° de Incubación (°C)	Fecha de Lectura de Resultados	Resultados UFC/ml
1	9:50	20	12-08-14	37	14-08-14	4,5x10 ⁵
2	9:52	20	12-08-14	37	14-08-14	1,5x10 ⁶
3	10:17	20	12-08-14	37	14-08-14	1,0x10 ⁶
4	10:30	20	12-08-14	37	14-08-14	1,8x10 ⁷
5	10:30	19	12-08-14	37	14-08-14	1,5x10 ⁶
6	10:32	20	12-08-14	37	14-08-14	7,0x10 ⁶
7	11:30	18	12-08-14	37	14-08-14	1,7x10 ⁶
8	10:05	24	12-08-14	37	14-08-14	1,4x10 ⁶
9	10:18	21	12-08-14	37	14-08-14	2,3x10 ⁶
10	11:03	21	12-08-14	37	14-08-14	1,1x10 ⁷
11	11:46	24	12-08-14	37	14-08-14	7,5x10 ⁶
12	10:11	19	12-08-14	37	14-08-14	4,0x10 ⁶
13	10:50	19	12-08-14	37	14-08-14	4,8x10 ⁵
14	10:23	19	12-08-14	37	14-08-14	1,4x10 ⁶
15	16:26	14	12-08-14	37	14-08-14	1,2x10 ⁶
16	12:05	17	12-08-14	37	14-08-14	2,1x10 ⁷
17	10:50	16	12-08-14	37	14-08-14	1,3x10 ⁶
18	14:20	19	12-08-14	37	14-08-14	4,2x10 ⁵
19	14:29	8	12-08-14	37	14-08-14	1,7x10 ⁷
20	10:32	18	12-08-14	37	14-08-14	7,9x10 ⁶
21	11:35	19	12-08-14	37	14-08-14	1,4x10 ⁷



Recuentos que superan el valor límite máximo de la Norma INEN
9:2012 (1,5x10⁶ UFC/ml)



Semana N° 4			Fecha: 26 - 28 de Agosto del 2014			
N° del proveedor	Hora de recepción	T° al Ingreso (°C)	Fecha de Siembra	T° de Incubación (°C)	Fecha de Lectura de Resultados	Resultados UFC/ml
1	9:28	19	26-08-14	37	28-08-14	2,5x10 ⁵
2	10:03	21	26-08-14	37	28-08-14	1,5x10 ⁶
3	10:30	20	26-08-14	37	28-08-14	1,3x10 ⁶
4	10:10	21	26-08-14	37	28-08-14	1,9x10 ⁶
5	10:26	20	26-08-14	37	28-08-14	1,1x10 ⁶
6	10:11	21	26-08-14	37	28-08-14	9,8x10 ⁶
7	10:47	20	26-08-14	37	28-08-14	7,3x10 ⁶
8	10:00	25	26-08-14	37	28-08-14	1,4x10 ⁶
9	10:12	22	26-08-14	37	28-08-14	1,5x10 ⁷
10	10:48	23	26-08-14	37	28-08-14	2,0x10 ⁷
11	11:51	23	26-08-14	37	28-08-14	1,2x10 ⁷
12	10:05	21	26-08-14	37	28-08-14	8,7x10 ⁶
13	10:45	20	26-08-14	37	28-08-14	9,0x10 ⁵
14	10:37	18	26-08-14	37	28-08-14	1,5x10 ⁶
15	15:41	19	26-08-14	37	28-08-14	1,4x10 ⁶
16	12:20	19	26-08-14	37	28-08-14	1,2x10 ⁷
17	10:46	18	26-08-14	37	28-08-14	1,2x10 ⁶
18	13:10	22	26-08-14	37	28-08-14	7,3x10 ⁵
19	15:30	20	26-08-14	37	28-08-14	1,9x10 ⁶
20	10:28	19	26-08-14	37	28-08-14	8,4x10 ⁶
21	11:23	20	26-08-14	37	28-08-14	9,8x10 ⁶




Recuentos que superan el valor límite máximo de la Norma INEN

9:2012 (1,5x10⁶ UFC/ml)


Anexo H. Resultados de la prueba de Tiempo de reducción del azul de metileno.

Semana N°1			
Fecha: 28 - 30 de Julio del 2014			
Proveedor	Tiempo de duración	Resultado de calidad	
		Buena	Mala
1	2:50		X
2	2:30		X
3	2:50		X
4	2:40		X
5	3:00	X	
6	2:00		X
7	3:20	X	
8	3:00	X	
9	2:10		X
10	2:10		X
11	2:00		X
12	3:00	X	
13	3:10	X	
14	3:40	X	
15	1:30		X
16	1:40		X
17	3:10	X	
18	2:00		X
19	2:30		X
20	2:50		X
21	2:50		X

 Leche de Buena Calidad

 Leche de Mala Calidad



Semana N°2			
Fecha: 4 - 6 de Agosto del 2014			
Proveedor	Tiempo de duración	Resultado de calidad	
		Buena	Mala
1	2:40		X
2	2:30		X
3	2:30		X
4	2:00		X
5	3:20	X	
6	2:00		X
7	3:20	X	
8	2:20		X
9	2:50		X
10	2:10		X
11	1:20		X
12	3:10	X	
13	3:10	X	
14	3:40	X	
15	1:30		X
16	1:40		X
17	3:20	X	
18	2:20		X
19	2:40		X
20	2:45		X
21	2:20		X

X Leche de Buena Calidad

X Leche de Mala Calidad



Semana N°3			
Fecha: 12 -14 de Agosto del 2014			
Proveedor	Resultado del TRAM	Resultado de calidad	
		Buena	Mala
1	2:40		X
2	2:30		X
3	3:00	X	
4	2:20		X
5	2:30		X
6	2:10		X
7	3:20	X	
8	3:00	X	
9	2:00		X
10	2:30		X
11	1:20		X
12	3:10	X	
13	3:10	X	
14	3:50	X	
15	1:30		X
16	1:50		X
17	3:20	X	
18	2:00		X
19	2:30		X
20	2:50		X
21	1:20		X

X Leche de Buena Calidad

X Leche de Mala Calidad



Semana N°4			
Fecha: 26 - 28 de Agosto del 2014			
Proveedor	Tiempo de duración	Resultado de calidad	
		Buena	Mala
1	2:50		X
2	2:10		X
3	2:50		X
4	2:50		X
5	2:50		X
6	2:00		X
7	3:10	X	
8	3:30	X	
9	2:00		X
10	3:10	X	
11	2:00		X
12	3:10	X	
13	3:00	X	
14	3:50	X	
15	1:20		X
16	1:40		X
17	3:30	X	
18	2:00		X
19	2:10		X
20	2:50		X
21	1:50		X

X Leche de Buena Calidad

X Leche de Mala Calidad