

DETERMINACIÓN DEL INDICE DE BACTERIAS MESOFILAS
AEROBIAS PRESENTES EN LA LECHE CRUDA VERSUS
LECHE PASTEURIZADA QUE SE COMERCIALIZAN EN LA
ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE POPAYAN

ALFREDO PINZON FERNANDEZ
ZOOTECNISTA



Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Facultad de Ciencias Agrarias
Programa de Zootecnia

POPAYÁN 2006

Los contenidos, las opiniones y posibles errores expresados en este trabajo de Investigación así como la exactitud y adecuación de las referencias a trabajos consultados y mencionados en el texto del documento son responsabilidad exclusiva y total del autor.

A la memoria de mis padres

A mis hermanas

A mi hermano

A mis hijas

CONTENIDO

	Página
Summary	
Resumen	1
Introducción	2
2.Planteamiento del problema y situación actual	9
3.Objetivos	13
3.1.Objetivo General	13
3.2.Objetivos específicos	13
4.Justificación	14
5.Marco Referencial	17
5.1.1 Naturaleza y características de la leche	17
5.1.2 Métodos de ordeño	21
5.1.3 Características de la leche	23
5.1.4 Condiciones especiales	24
5.1.5 Características organolépticas	24
5.1.6 El procesamiento de la leche	27
5.1.7 Métodos generales para el procesamiento de la leche	28
5.1.9 La Pasteurización	29
5.1.8.1 Objetivos de la Pasteurización	30
5.1.8.2 Condiciones de la Pasteurización	30
5.1.8.2.1 Intensidad del Tratamiento térmico	30
5.1.8.2.2 Condiciones que debe tener el calentamiento y el enfriamiento	30

5.8.3.Métodos de Pasteurización	31
5.1.8.3.1 La pasteurización baja	31
5.1.8.3.1 La pasteurización alta	31
5.1.9 Microbiología de la leche	33
5.1.10 Factores que afectan el crecimiento de microorganismos	33
5.1.10.1 Factores intrínsecos	34
5.1.10.1.1 PH	34
5.1.10.1.2 Actividad del agua	34
5.1.10.1.3 Potencial de oxido-reducción	35
5.1.10.1.4 Contenido de nutrientes	36
5.1.10.1.5 Componentes y sistemas antimicrobianos de la leche	37
5.1.10.2 Factores Extrínsecos	40
5.1.10.2.1 Temperatura	40
5.1.10.2.2 Humedad relativa	42
5.1.10.2.3 Gases Atmosféricos	42
5.1.10.3 Factores implícitos	43
5.1.11 Microorganismos de importancia en la leche cruda	43
5.1.11.1 Bacterias	44
5.1.11.1.1 Bacterias Gram. positivas	44
5.1.11.1.2 Bacterias Gram. negativas	47
5.1.11.2 Mohos y Levaduras	48
5.1.11.3 Virus	49
5.1.12 Control de la contaminación	49
5.1.12.1 Contaminación de la leche en interior de la ubre	51
5.1.12.1 Contaminación en el exterior de la glándula mamaria	52

5.1.13 Infecciones e intoxicaciones provocadas por leches contaminadas	54
5.1.13.1 Carbunco	55
5.1.13.2 Shigelosis (Disentería Bacilar)	55
5.1.13.3 Brucelosis	56
5.1.13.4 Cólera	57
5.1.13.5 Difteria	58
5.1.13.6 Fiebre tifoidea y Paratifoidea	58
5.1.13.7 Otras Salmonelosis	58
5.1.13.8 Estreptococias	59
5.1.13.9 Tuberculosis	60
5.1.13.10 Adenovirus	61
5.1.13.11 Hepatitis Infecciosa	61
5.1.13.12 Fiebre Q	61
5.1.13.13 Encefalitis transmitidas por garrapatas	62
5.1.13.14 Botulismo	62
5.1.13.15 Gastroenteritis Enterotoxica Estafilococica	62
5.1.13.16 Infección por Clostridium Perfringens (Welchii)	64
5.1.13.17 Infecciones por Gemenes Coliformes	64
5.1.14 Toma de Muestras para el Análisis Microbiológico	65
5.1.15 Determinación de la calidad microbiana de la leche cruda.	66
5.1.15.1 Método indirecto	66
5.1.15.1.1 Sedimento	66
5.1.15.1.2 Lacto fermentación	67
5.1.15.1.3 Acidez titulable y pH	67
5.1.15.1.4 Tiempo de reducción-TRAM-	67
5.1.15.2 Método directo	67

5.1.15.2.1 Recuento microscópico directo	67
5.1.15.2.2 Recuento estándar en placa	68
5.1.15.2.3 Recuento de Bacterias Termoturicas,Termofilas, psicrofilas	68
5.1.15.2.4 Coliformes totales,Coliformes fecales,numero mas probable (NMP).	69
5.1.16 Tiempo de Reducción del Azul de Metileno	69
5.2 Marco Legal	73
6. Metodología	74
6.1. Localización Geográfica	74
6.2. Tamaño de la muestra.	75
6.3 Zonas de Muestreo	75
6.4 Determinación de Bacterias Mesofilas en la leche	76
6.4.1 Recuento estándar en placas de Agar	78
6.5 Materiales y Equipos	80
6.5.1 Reactivos y Medios de Cultivo	80
6.5.2 Muestras	80
6.5.3 Procedimiento	80
6.5.3.1 Limpieza y esterilización del material de vidrio	80
6.5.3.2 Preparación y esterilización del medio de cultivo en autoclave.	81
6.5.3.3 Identificación de las diluciones y placas	81
6.5.3.4 Preparación de la muestra y diluciones	82
6.5.3.5 Siembra e incubación de las placas	82
6.5.3.6 Selección de las placas y recuento de las colonias	84
6.6 Observaciones	86
7 Resultados	87
8. Discusión	99

9.Conclusiones	101
10.Recomendaciones	103
Bibliografía	105
Anexos	107

LISTA DE CUADROS

			Pagina
Cuadro	1	Composición de la leche de diferentes razas lecheras (porcentaje)	18
Cuadro	2	Composición promedio de leches de varios Mamíferos (porcentaje)	19
Cuadro	3	Valores promedios de la composición de la Leche	20
Cuadro	4	Características físico químicas de la leche	23
Cuadro	5	Guía general para la clasificación de la leche según su sabor	26
Cuadro	6	Destrucción Térmica de las Bacterias Patógenas	32
Cuadro	7	Rangos de PH para el crecimiento de microorganismos	34
Cuadro	8	Actividad de agua a la cual crecen algunos organismos	35
Cuadro	9	Rangos de temperatura (°C) para él crecimiento de organismos	41
Cuadro	10	Microorganismos psicrófilos y termófilos de la leche cruda	41

Cuadro	11	Efectos de la Temperatura en la multiplicación microbiana en la leche producida en diferentes condiciones	42
Cuadro	12	Valores promedio del contenido de gérmenes en diferentes sustancias	53
Cuadro	13	Tiempos de duplicación de bacterias presentes en la leche cruda	77

LISTA DE TABLAS

		Pagina
Tabla	1 Interpretación del TRAM	70
Tabla	2 Características de la leche cruda	87
Tabla	3 Características fisicoquímicas de la leche entera	88
Tabla	4 Clasificación de la leche de acuerdo a la prueba TRAM	93
Tabla	5 Resultado de la prueba TRAM para leche cruda	94
Tabla	6 Resultado de la prueba TRAM para leche Pasteurizada	95
Tabla	7 Requisitos Microbiológicos para la leche cruda	96
Tabla	8 Características Microbiológicas de la leche pasteurizada	97

LISTA DE FIGURAS

			Pagina
Figura	1	Ordeño Manual	21
Figura	2	Ordeño Automático	22
Figura	3	Ordeño Automático de un puesto- Instalación de pezoneras	22
Figura	4	Método de enfriamiento en tinas metálicas	23

LISTA DE MAPAS

	Pagina
Mapa 1.Zona urbana del municipio de Popayán	74
Mapa 2.Zonas por comunas para toma de muestras	75

LISTA DE GRAFICOS

			Pagina
Grafico	1	Porcentaje de Acidez de la Leche cruda	88
Grafico	2	Porcentaje de Acidez de la Leche pasteurizada	89
Grafico	3	Densidad de la Leche Cruda	89
Grafico	4	Densidad de la Leche Pasteurizada	90
Grafico	5	Porcentaje de Grasa de la Leche Cruda	90
Grafico	6	Porcentaje de Grasa de la Leche Pasteurizada	91
Grafico	7	Porcentaje de Solidos Totales en la Leche Cruda	91
Grafico	8	Porcentaje de Solidos Totales en la Leche Pasteurizada	92
Grafico	9	Porcentaje de Solidos no Grasos en Leche Cruda	92
Grafico	10	Porcentaje de Solidos no Grasos en Leche Pasteurizada	93
Grafico	11	Prueba de TRAM para la Leche Cruda	94
Grafico	12	Prueba de TRAM para la Leche Pasteurizada	95
Grafico	13	Recuento Total de Mesofilos en Leche Cruda	96
Grafico	14	Recuento Total de Mesofilos en Leche Pasteurizada	97
Grafico	14	Recuento Total de Mesofilos en Leche Pasteurizada	98

SUMMARY

The nutritional characteristics that make of the milk a complete food for the diet of the human beings, also make it a means of cultivation ideal for the growth of a great variety of microorganisms.

The milk is one of the few foods that can be considered as balanced, it is accepted by the population like the most stable and basic food, independently of the age of the consumers.

Although they are unquestionable the nutritious qualities of the milk and the milky products, it is not less certain than, from their synthesis in the mammary gland until their arrival to the consumer, these qualities are subjected to a great number of risks that you/they make be in danger the original quality. These risks are: the contamination and multiplication of microorganisms, contamination with germs pathogens, physical-chemical alteration of their components, absorption of strange scents, generation of bad flavors and contamination with such chemical substances as pesticides, antibiotics, metals, detergents, disinfectant, particles of dirt, etc. All these, be already in isolated form or on the whole, they conspire in form negative about the hygienic and nutritional quality of the product and, consequently, they conspire against the public health

With reference to the public health, they are clear the risks that the consumption of raw milk brings, that which –summed to the nonexistence of control mechanisms—he/she can bring problems of health in the population, but, as many things in this country, we will begin to surely take measures when either very late

RESUMEN

Las características nutricionales que hacen de la leche un alimento completo para la dieta de los seres humanos, también la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

La leche es uno de los pocos alimentos que puede ser considerado como equilibrado, es aceptada por la población como el alimento más estable y básico, independientemente de la edad de los consumidores.

Si bien son incuestionables las cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos, no es menos cierto que, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un gran número de riesgos que hacen peligrar la calidad original. Estos riesgos son: la contaminación y multiplicación de microorganismos, contaminación con gérmenes patógenos, alteración físico-química de sus componentes, absorción de olores extraños, generación de malos sabores y contaminación con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes, partículas de suciedad, etc. Todos éstos, ya sean en forma aislada o en conjunto, conspiran en forma negativa sobre la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, conspiran en contra de la salud pública

Con referencia a la salud pública, son claros los riesgos que el consumo de leche cruda trae, lo cual –sumado a la inexistencia de mecanismos de control— puede traer problemas de salud en la población, pero, como muchas cosas en este país, comenzaremos a tomar medidas seguramente cuando ya sea muy tarde

INTRODUCCION

El consumo regular de leche por parte de las personas se remonta al momento en que los antepasados dejaron de ser nómadas y comenzaron a cultivar la tierra para alimentar a los animales capturados que mantenían junto al hogar. En aquellos tiempos, la leche se guardaba en pieles, tripas o vejigas animales que, en ocasiones, no estaban bien lavadas o se dejaban expuestas al sol, por lo que el producto coagulaba. De este modo surgió el que probablemente fuera el primer derivado lácteo, al que ya se hacían alusiones en la Biblia: la leche cuajada.

El uso de la leche como alimento, se remonta a más de 3500 años antes de Cristo, y a lo largo del tiempo, las diferentes culturas la han aprovechado de distintas maneras.

En las proximidades de Ur, antigua Caldea, se han descubierto bajorrelieves que se habían realizado entre el 3.100 y 3.500 antes de Cristo; estos muestran el ordeño de dos vacas y la fabricación de manteca, operaciones realizadas por sacerdotes del templo de la diosa Nin-Har-Sag (protectora del ganado). Los bajorrelieves pertenecían a los sumerios, que invadieron Caldea entre 4.000 y 5.000 años antes de Cristo, por lo que se supone que las prácticas lecheras de este pueblo se remontan aún más atrás en el tiempo.

Alimento por excelencia, la leche ha sido usada como medicina y cosmética en las antiguas civilizaciones. Hipócrates, que vivió en Grecia 400 años A.C. y es considerado el padre de la medicina, recetaba leche fresca de vaca como antídoto eficaz para casos de envenenamiento. Además, mezcladas con otras sustancias como vino, agua y miel, entre otras, la leche era indicada para curar

inflamaciones, fiebre y afecciones en la garganta. En el Imperio Romano se consideraba que la leche poseía propiedades rejuvenecedoras. (PINZON,2004)

Durante gran parte de la edad Media el ganado era habitualmente usado para arrastrar instrumentos de labranza o para la producción de carne, y la leche era considerada un producto secundario. El consumo de leche se reservaba para servir a la subsistencia de sirvientes y artesanos. Si existía leche sobrante se la transformaba en manteca o queso, como manera de conservar las propiedades nutricionales del alimento.

Aun con la expansión del comercio iniciada alrededor del siglo XIII y el incremento de la actividad mercantil, la leche siguió siendo un producto de bajo consumo, puesto que sólo podía ser conservada durante unas pocas horas. Así, mientras la evolución de las sociedades humanas iba transformando las pequeñas aldeas en grandes ciudades, aparecían problemas de abastecimiento de productos frescos para esa creciente población urbana. Llegando al siglo XIX comienza la producción industrial. (PINZON,2004)

El incremento de la población urbana, el desarrollo del transporte y el incremento del número de cabezas de ganado introdujeron nuevas perspectivas para la producción y distribución de la leche. Pero seguía sin resolverse el problema del abastecimiento frente a una demanda en aparición: el sistema de transporte de productos frescos era todavía insuficiente y los adelantos alcanzados no lograban ampliar su período de conservación. Además, el ordeño aún era realizado precariamente en los establos, mientras que los envases presentaban serias deficiencias higiénicas.

A mediados del siglo XIX, los descubrimientos de Louis Pasteur representaron la primera victoria de la ciencia contra la acción de toxinas y microorganismos potencialmente patógenos, y permitieron además, conservar por más tiempo las propiedades nutritivas y digestivas de los alimentos.

El tratamiento térmico (pasteurización) de la leche cruda, el descremado mecánico (separadores centrífugos) y el desarrollo de las técnicas de enfriamiento de los alimentos, sumados a otros avances, permitieron hacia fines del siglo XIX la modificación de la producción industrial de la leche y sus derivados. La producción lechera alcanzó así un grado importante de expansión y desarrollo a partir del siglo XX, al destinarse grandes extensiones de tierra exclusivamente para la producción lechera, tanto en Europa como en Estados Unidos. (PINZON,2004)

A lo largo de la historia de la humanidad, el tema de la alimentación demandó muy poca atención por parte de las disciplinas relacionadas con el cuidado de la salud. Pero la Primera guerra mundial puso en evidencia que gran parte de los soldados estaba en condiciones deficientes de nutrición. Esto ocasionó una toma obligada de conciencia que, una vez terminada la guerra dio lugar a un importante movimiento a favor de la buena alimentación; que situó en un lugar relevante la necesidad de una alimentación más higiénica y saludable.

Así fue como después de la Segunda guerra mundial se produjo una revolución con el logro de mayores niveles de productividad lechera de los ganados. Estos avances estimularon el establecimiento nuevas plantas productoras que multiplicaron las posibilidades de industrialización de la leche.

A partir de entonces, los procesos tecnológicos fueron perfeccionándose hasta llegar al actual grado de desarrollo que exhibe la industria láctea mundial.

En las últimas décadas, la innovación industrial y los avances científicos han permitido lograr desarrollos muy significativos en la industria láctea, convirtiendo a los productos lácteos en un bien de fácil acceso para gran parte de la población; ya que se ha llegado a la concienciación de que es muy poco probable que un alimento contenga todos los nutrientes presentes en un simple vaso de leche.(PINZON,2004)

Hoy, la leche y sus derivados ocupan un lugar privilegiado entre los consumos alimentarios naturales de las grandes ciudades.

Las características nutricionales que hacen de la leche un alimento completo para la dieta de los seres humanos, también la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

La leche es uno de los pocos alimentos que puede ser considerado como equilibrado, es aceptada por la población como el alimento más estable y básico, independientemente de la edad de los consumidores (AMIOT, 1991.)

Si bien son incuestionables las cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos, no es menos cierto que, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un gran número de riesgos que hacen peligrar la calidad original. Estos riesgos son: la contaminación y multiplicación de microorganismos, contaminación con gérmenes patógenos, alteración físico-química de sus componentes, absorción de olores extraños, generación de malos sabores y contaminación

con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes, partículas de suciedad, etc. Todos éstos, ya sean en forma aislada o en conjunto, conspiran en forma negativa sobre la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, conspiran en contra de la salud pública y economía de cualquier país. Es por ello que el desafío para quienes trabajan en el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche sino, también, de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son la higiene microbiológica, higiene química e higiene estética. Tres aspectos que, unidos, pueden contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero de nuestros países, con el beneficio consecuente en el desarrollo físico e intelectual de las generaciones venideras, higiene de la leche y salud pública, dos aspectos que se conectan mediante una sola palabra, CALIDAD. (CASADO, 1996).

La producción de leche de calidad higiénica, como todo sistema productivo, resulta sumamente complejo, más aún que otros ya que el producto a manejar es extremadamente delicado, afectándose mucho por la manipulación. En la producción y comercialización de la leche cruda interactúan innumerables factores y todos de una manera u otra se encuentran relacionados. Es por ello que esta complejidad debe ponerse de manifiesto, con la pretensión inequívoca de presentar un problema, analizar los aspectos fundamentales y establecer las líneas generales de solución que permitan debatir el tema con mayor profundidad y contribuir entre todos a la búsqueda de soluciones específicas para cada región o país, conscientes de que no se pueden manejar recetas universales pero sí principios generales.

Otros microorganismos deben ser estudiados no por su utilidad, si no por la capacidad de alterar la composición y características organolépticas de la leche y derivados lácteos o por ser agentes causales de enfermedad en los consumidores.

En general se puede resumir la importancia del estudio microbiológico de la leche basado en esos tres aspectos:

✱ Los microorganismos producen cambios deseables en las características físico químicas de la leche durante la elaboración de diversos productos lácteos.

✱ Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor.

✱ Los microorganismos pueden causar alteraciones de la leche y productos lácteos haciéndolos inadecuados para el consumo.

Las rutas y caminos nacionales, en todas las ciudades y pueblos, se completa con decenas de pequeños carros, motos o bicicletas que recorren los barrios vendiendo leche cruda.

El fenómeno no se limita a iniciativas individuales: ya hay camionetas que tienen montada su propia distribución. y la preocupación central es que esta leche llega al consumidor, sin pasteurizar y por tanto con ausencia de los controles de calidad adecuados para el alimento.

La leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como fuente de alimento. Por esto, un factor fundamental que influye sobre el valor de aceptación universal de la leche es la imagen que ésta representa, a saber, que constituye una fuente nutritiva, no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano.

La confirmación de esta imagen nutritiva está en el uso extensivo que tienen la leche y sus derivados, como parte de la dieta diaria de los pueblos de los países altamente desarrollados. A consecuencia de esto, estas sociedades gozan casi de una completa carencia de enfermedades nutricionales, entre bebés, niños y adultos jóvenes.

Entre los muchos contrastes entre países desarrollados y en desarrollo, pueden citarse, a modo de ejemplo, los siguientes:

- abastecimiento de leche de alta calidad versus abastecimiento deficiente o nulo.
- mejor conservación de alimentos versus pérdidas y deterioro de alimentos.
- muy buena nutrición versus desnutrición escolar en diferentes grados.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y SITUACIÓN ACTUAL

Consumir leche cruda en una ciudad como la nuestra implica riesgos para la salud, debido a que el producto en estas condiciones puede estar muy contaminada, o estar adulterada con agua o sustancias alcalinas.

En caso de poseer una alta contaminación generada por la mala manipulación, por mantenerla al medio ambiente, o provenir de animales enfermos, se pueden producir enfermedades tales como Tuberculosis, brucelosis, y listeriosis, colibacilosis u otras enfermedades especialmente gastrointestinales.

En los casos anteriores los microorganismos responsables pueden ser excretados con la leche de los animales infectados.

La leche cruda puede contener peligros adicionales debido a la contaminación por bacterias patógenas, procedentes de fuentes externas o del medio ambiente.

Por otro lado cuando la leche es adulterada con agua, se corre el riesgo de que el agua utilizada no sea potable, contribuyendo a aumentar de esta forma la contaminación. La adulteración con agua se facilita ya que se mezcla muy bien con la leche, complicando su reconocimiento.

También es frecuente la adulteración de la leche con sustancias alcalinas. Este procedimiento se utiliza cuando la leche se mantiene al medio ambiente, favoreciendo como se dijo anteriormente el crecimiento bacteriano.

Al ocurrir el crecimiento bacteriano, la leche tiende a descomponerse rápidamente; Para evitar este inconveniente, el

vendedor recurre a métodos que le sirvan para disminuir la acidez. Dentro de los métodos se encuentran la adición de agua o de sustancias químicas como carbonatos, soda cáustica o bicarbonatos.

De esa forma se disminuye la acidez pero la contaminación de bacterias continúa. Al hervir la leche, algunas bacterias se destruyen pero otras permanecen, frecuentemente son las más patógenas. Por otra parte cuando la leche es sometida a ebullición, las sustancias alcalinas se mezclan con la grasa generando un proceso de saponificación, (formación de jabones), que dan a la leche un sabor a detergente, y como de todas maneras quedan residuos de esas sustancias, estas atacan la flora microbiana.

Los microorganismos pueden encontrarse en todo lugar: en los animales, en la gente, en el aire, en la tierra, en el agua y en la leche. Una leche de buena calidad, segura para consumo humano, es el resultado de reconocidas prácticas sanitarias observadas a lo largo de todas las etapas del proceso, desde la extracción de la leche hasta su comercialización.

El número de bacterias presentes en el producto final refleja las condiciones sanitarias bajo las cuales la leche ha sido procesada y permite determinar el periodo de preservación de ésta.

Los diferentes microorganismos alcanzan la leche por dos vías principales: la vía mamaria y el medio externo (PINZON, 2004).

Mamaria: los microorganismos que pueden alcanzar la ubre, igualmente pueden llegar a contaminar la leche antes o después del ordeño. Estos microorganismos pueden alcanzar la leche por vía mamaria ascendente o mamaria descendente. Por vía ascendente lo hacen bacterias que se adhieren a la piel de la ubre y posterior al

ordeño entran a través del esfínter del pezón (*Staphilococcus aureus*, *Streptococcus*, *Coliformes*). La vía descendente o hematológica la utilizan los microorganismos que pueden causar enfermedad sistémica o tienen la propiedad de moverse por la sangre y a través de los capilares mamarios llegar a infectar la ubre (*Salmonellas*, *Brucellas*, *Mycobacterium tuberculosis*) (PINZON, 2004).

Medio externo: la contaminación de la leche puede ocurrir una vez que esta ha sido extraída de la glándula mamaria. Los utensilios, tanques de almacenamiento, transportes e incluso el personal que manipula la leche, son fuentes de contaminación de microorganismos que utilizan esta vía, que en algunos casos son las más abundantes, causantes de grandes pérdidas en la calidad del producto (PINZON, 2004).

La leche constituye un excelente medio de cultivo para determinados organismos, 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.

Durante el manipuleo, las manos portan bacterias a la leche. Por ello, resulta sumamente importante lavar cuidadosamente las manos y las superficies con agua limpia. Las mejoras en las prácticas sanitarias durante el manipuleo y el procesamiento tradicional de la leche pueden no ser bien recibidas debido a las creencias culturales o, simplemente, a la falta de tiempo.

Debe tenerse presente que la leche es un producto biológico obtenido de animales y, por lo tanto, plantea problemas de origen en su contaminación ya que a la salida de la glándula mamaria este

producto trae presentes microorganismos por tal razón resulta de vital importancia las buenas practicas de manejo en cada uno de sus procesos (PINZON, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinación del índice de Bacterias Mesófilas Aerobias presentes en las leche cruda versus leche pasteurizada que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de Popayán

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinación del índice de Bacterias Mesófilas Aerobias presentes en la leche cruda que se comercializa en la zona urbana de la ciudad de Popayán.
- ❖ Determinación del índice de Bacterias Mesófilas Aerobias presentes en las leches pasteurizadas que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de Popayán.

4. JUSTIFICACIÓN

El mercado de la leche fresca en la ciudad de Popayán, es de unos 16.200.000 de litros anuales o unos 45.000 litros diarios. De los 16.200.000 anuales, se estima que unos 9.000.000 de litros, que corresponden a 25.000 litros diarios son vendidos como leche cruda por fuera de todas las normas legales o reglamentarias, esto representa poco más del 50% del total de la venta de leche fresca en la ciudad ya que el resto son vendidos legalmente por las empresas lácteas que tienen la autorización para comercializar la leche fresca pasteurizada (PINZON, 2004).

Si bien la venta de leche cruda siempre existió, ha habido un incremento importante en el volumen diario de leche cruda vendida en forma ilegal desde hace varios años, cuando se agudizó como consecuencia de la crisis económica y social del País.

Estos volúmenes de venta de leche que se manejan en la actualidad han llevado a que el negocio de la venta de leche cruda haya pasado de ser una forma de supervivencia de pequeños productores de tres a cuatro vacas, como ocurría anteriormente. a ser un negocio muy interesante para intermediarios de mayor volumen que hacen su reparto puerta a puerta, que pagando al contado pero a muy bajo precio la leche a productores pequeños, tienen montado un negocio de intermediación que les representa muy buenas ganancias diarias sin ningún tipo de control, riesgo o sacrificio.

En lo que refiere a los temas sanitarios, tan importantes en los últimos tiempos para el comercio de alimentos, también los

vendedores de leche cruda se encuentran en infracción ya que no cumplen ningún tipo de control sanitario (CONSTITUCION POLITICA DE COLOMBIA, Articulo 78.), lo que –agregado al hecho de que lo que venden no es leche pasteurizada— consumir leche cruda implica riesgos para la salud de la población, y representa un riesgo muy importante debido a que el producto que se expende en estas condiciones puede contener una alta carga microbiana, o estar adulterada con agua o sustancias alcalinas lo que no garantiza que estén libres de producir enfermedades, en cuyos casos los microorganismos responsables pueden ser excretados con la leche de los animales infectados, por tanto posibles de transmitirse al ser humano (PINZON,2004).

Tampoco se controla si existe adulteración en la materia prima, ya sea por parte del productor que ordeño la vaca o por el intermediario encargado de su reventa. En la medida que nadie controla la calidad del producto, es muy fácil agregar agua a los tarros de leche cruda, vender leche de vacas con mastitis (la ubre enferma), etcétera.

En síntesis, estamos ante un problema complejo, realmente complejo. A modo de conclusión podemos decir que la venta de leche cruda ha dejado de ser un mecanismo de subsistencia para pasar a ser un excelente negocio para intermediarios, y que es muy posible que ese mercado se siga incrementando si no se adopta ningún mecanismo de control.

La distribución de la leche cruda afecta la salud de los consumidores por ser un alimento de alto riesgo, ya que no puede cumplir con las condiciones adecuadas de conservación,

procesamiento y expendio exigidas, que garanticen el consumo de un producto seguro a la población.

Con referencia a la salud pública, son claros los riesgos que el consumo de leche cruda trae, lo cual –sumado a la inexistencia de mecanismos de control— puede traer problemas de salud en la población, pero, como muchas cosas en este país, comenzaremos a tomar medidas seguramente cuando ya sea muy tarde (PINZON,2004).

Ante estas situaciones se hace necesario un estudio que permita determinar el índice de bacterias mesofilas aerobias presentes en la leche con el fin de conocer sus grados de contaminación.

5. MARCO REFERENCIAL

5.1 MARCO TEORICO

5.1.1 NATURALEZA Y CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE

La secreción láctea de las glándulas mamarias de los mamíferos es un líquido de composición compleja, de color blanquecino y opaco, con un pH cercano al neutro y de sabor dulce. Su propósito natural es la alimentación de la cría durante sus primeros meses de vida.

Desde un punto de vista legal la leche de vaca puede definirse de la siguiente manera: Leche, sin otra denominación, es el producto fresco del ordeño completo de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exento de calostro y que cumpla con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas (CODEX ALIMENTARIO, 2002) Estas características pueden ser la densidad, el índice crioscópico, el índice de refracción, la acidez titulable, la materia grasa, los sólidos no grasos, el número de leucocitos, los microorganismos patógenos, la presencia de sustancias inhibidoras, etc.

Las características más importantes de la leche son su variabilidad, alterabilidad y complejidad. En cuanto a la variabilidad, desde un punto de vista composicional, no es posible hablar de una leche sino de leches debido a las diferencias naturales entre especies o para una misma especie según la región o lugar.

Los factores que influyen en la variabilidad son de tipo ambiental, fisiológico y genético. Dentro de los ambientales se reconoce a la alimentación, la época del año y la temperatura ambiente. En los fisiológicos encontramos el ciclo de lactancia, las enfermedades y

los hábitos de ordeño. En cuanto a los factores genéticos citaremos la raza, las características individuales dentro de una misma raza y la selección genética.

La propia leche de vaca varía según las diferentes razas del ganado, como lo muestra el siguiente cuadro.

Cuadro 1 composición de la leche de diferentes razas lecheras (porcentaje)

RAZA	GRASA	PROTEINA	LACTOSA	CENIZA	SNG *	ST**
Holstein	3.40	3.32	4.87	0.68	8.86	12.26
Jersey	5.37	3.92	4.93	0.71	9.54	14.91
Normando	4.00	3.53	4.67	0.68	8.90	12.90

FUENTE: PINZÓN CASTILLA V.1980

* Sólidos No Grasos

** Sólidos Totales

Respecto a la alterabilidad, por su composición, la leche es un adecuado medio para el desarrollo de microorganismos que provocan cambios en sus componentes.

Pero este producto no está exento de riesgos ya que puede contaminarse en cada uno de los múltiples pasos que van desde su secreción de la vaca hasta su consumo. Los dos grupos de riesgo principales a los que se expone la leche y por tanto el consumidor son: microbiológicos y químicos.

- ❖ contaminación y multiplicación de microorganismos,
- ❖ contaminación específica por gérmenes patógenos,
- ❖ alteración fisicoquímica de sus componentes,
- ❖ absorción de olores extraños,
- ❖ generación de malos sabores,
- ❖ contaminación con sustancias químicas (pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes).

❖ contaminación por partículas de suciedad.

Las principales fuentes de contaminación de leche cruda se da en el predio:

- ❖ animal (glándula mamaria, piel, heces),
- ❖ establo (moscas, aire, agua, forraje, paja, suelo, etc.),
- ❖ utensilios (equipo de ordeño, baldes, tarros, filtros, enfriadora, etc).

Finalmente, con relación a la complejidad, ésta se debe a las moléculas complejas que se encuentran en equilibrio químico, como por ejemplo el fosfocaseinato de calcio o el sistema del glóbulo graso.

Cuadro 2. Composición promedio de leches de varios mamíferos (porcentaje)

	MUJER	VACA	OVEJA	CABRA
Grasa	3.5	3.5	7.5	4.3
Calcio	32.2	119	193	133
Lactosa	6.5	4.7	4.5	4.7
Proteínas	1.4	3.5	6	4
Colesterol	13.9	13.6	27	11.4
Sales	0.25	0.8	1.1	0.8
Vitamina A	0.7	0.03	0.06	0.04
Vitamina B ₁	0.01	0.04	0.06	0.05
Vitamina C	5	1	3	2
Agua	87	87	82.4	86.3
Hidratos de carbono	7.6	4.8	4.3	4.6
Calorías	7.6	68	104	75

Calorías por cada 100 gramos. Proteínas, grasas, hidratos y agua, en %. Sales y Vitaminas, en miligramos por cada 100 gramos.

FUENTE: VEISSEYRE, ROGER.1998

Cuadro 3. Valores promedios de la composición de la leche

COMPONENTE	VALOR MEDIO (%)
Agua	86.9
Proteína	3.5
Grasa	4.0
Lactosa	4.9
Cenizas	0.7

FUENTE: DEMETER, K.1999.

-El agua es el componente más abundante y es en ella donde encontramos los otros componentes en estados diferentes. Es así que el cloro, sodio y potasio están en dispersión iónica, la lactosa y parte de la albúmina en dispersión molecular, la caseína y fosfatos en dispersión coloidal y la materia grasa en emulsión.

-Las proteínas de la leche están conformadas por tres grupos: la caseína en un 3%, la lacto albúmina en un 0,5% y la lacto globulina en un 0,05%. En ellas se encuentran presentes más de veinte aminoácidos dentro de los cuales están todos los esenciales. La caseína a su vez está compuesta por tres tipos de caseína, la k-caseína, la b-caseína y la a-caseína

-La materia grasa está compuesta de una mezcla de triglicéridos que contienen más de diecisiete ácidos grasos y substancias asociadas tales como las vitaminas A, D, E y K, y fosfolípidos como la cefalina y lecitina.

-La lactosa el componente más abundante entre los sólidos de la leche; es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa.

-Los minerales de la leche se determinan en sus cenizas. Los más importantes son el calcio, fósforo, sodio, potasio y cloro.

En pequeñas cantidades se encuentran presentes hierro, yodo, cobre, manganeso y zinc.

-Las vitaminas presentes en la leche, además de las liposolubles A, D, E y K, encontramos el complejo B y la vitamina C.

-Las enzimas más conocidas de la leche son la fosfatasa, lipasa, catalasa, galactasa y reductasa.

-La leche también tiene gases como el CO₂, el oxígeno y el nitrógeno.

La leche de buena calidad es aquella que cumple sin excepción con todas las características higiénicas, microbiológicas y composicionales y que en consecuencia concuerda con la definición legal y las expectativas nutricionales puestas en ella. Para fabricar productos lácteos de buena calidad es imprescindible contar con una materia prima de iguales características: el procesador no puede devolver o incorporar una calidad inexistente y solo podrá, en algunos casos, "disimular" la mala calidad y lograr que la leche o el derivado fabricado con ella pueda ser apto para el consumo (DEMETER, 1999)

5.1.2 Métodos de ordeño

Al hablar de los métodos de ordeño podemos decir que, existen desde lo más rústico y convencional que es de manera manual, y es

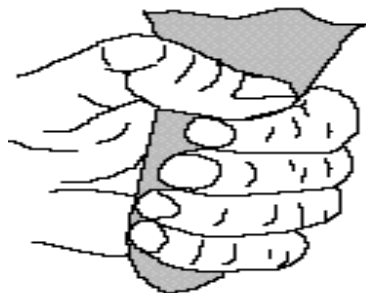


Figura 1.Ordeño Manual

usado generalmente por personas con poco ganado, hasta los sistemas altamente automatizados que llegan a ofrecer muchas ventajas como mayor higiene, velocidad y conservación de la leche,

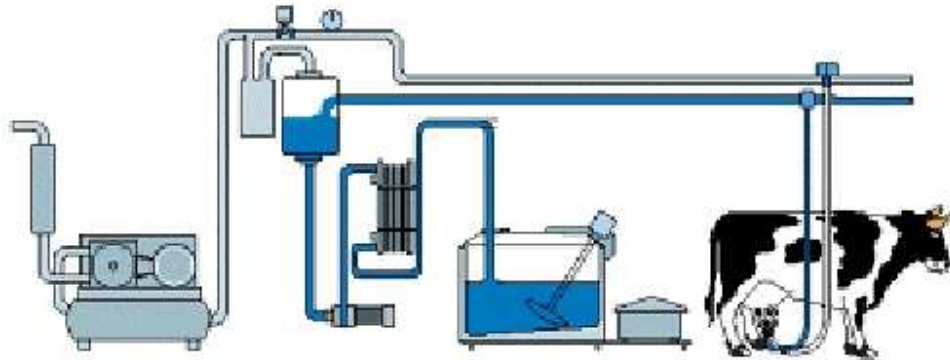


Figura 2.Ordeño Automático



Figura 3.Ordeño Automático de un puesto-Instalación de pezoneras ya que no se expone al ambiente, evitando así cualquier contacto con microorganismos u otro tipo de contaminación que pueda dañarla (PINZON, 2004).

Aquí encontramos el primer punto donde la informática se hace presente de forma directa en el campo de trabajo, pues los sistemas de ordeño automatizados cuentan con sensores y termostatos que trabajan de manera digital.

-Refrigeración

Una vez ordeñada la vaca, es importante refrigerar la leche por debajo de los 4° C, para evitar que los microorganismos que pudiera contener empiecen a degradarla y descomponerla. Para ello, se utilizan tanques enfriadores que cuentan con un agitador, el cual evita que se separe la grasa de la leche o capuchones aislantes cuando se deposita en tinas (PINZON, 2004).

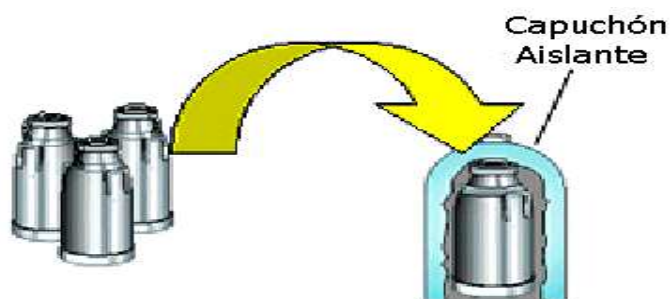


Figura 4. Método de Enfriamiento en tinas metálicas

5.1.3 Características de la leche

La leche cruda entera deberá tener las siguientes características físicas y químicas:

Cuadro 4. Características físico químicas de la leche

REQUISITOS	MÍNIMO	MÁXIMO
Densidad a 15° C (Gravedad específica)	1.0300	1.0330
Materia Grasa % m/m	3.0	-
Sólidos Totales % m/m	11.3	-
Sólidos no grasos % m/m	8.3	-
Acidez expresada como ácido láctico % (m/v)	0.13	0.16
PH	6.6	6.7
Leche para consumo directo	6.5	4.0
Leche para pasteurización	-	7.0

Impureza macroscópica (sedimentos) (mg/500 cm ³ norma o disco)	-	4.0
Índice crioscópico	-0.530 °C	-0.510 °C
(para recibos individuales por fincas)	(-0.550) °H	(-0.530) °H
Índice de refracción	nD ²⁰ 1.3420	-
Índice lactométrico	8.4 °L	-
Prueba de alcohol	No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol de 68 % en peso o 75 % en volumen	
Presencia de conservantes	Negativa	
Presencia de adulterantes	Negativa	
Presencia de neutralizantes	Negativa	

FUENTE: PEREZ GAVILAN ESCALANTE.1993.

5.1.4 Condiciones especiales

- Ausencia de sustancias tales como preservativos, sustancias tóxicas y residuos de drogas o medicamentos. Para residuos de plaguicidas se tendrán en cuenta normas oficiales de carácter nacional o en su defecto las normas internacionales (FAO 1991), y otras adoptadas por la entidad sanitaria competente.
- Ausencia de calostro, sangre u otros elementos extraños en suspensión.

Cuando se disponga de un termo lactodensímetro diferente al calibrado a 15° C se tendrán en cuenta las equivalencias de acuerdo con las tablas aprobadas al efecto por la autoridad competente (. LARRAÑAGA, 1999, CITADO POR PINZON, 2004).)

5.1.5 Características organolépticas

- ❖ Textura: La leche tiene una viscosidad de 1,5 a 2,0 centipoises a 20 °C, ligeramente superior al agua (1,005 cp. Esta viscosidad puede ser alterada por el desarrollo de ciertos microorganismos

capaces de producir polisacáridos que por la acción de adicionar agua aumentan la viscosidad de la leche (leche mastítica, leche hilante).

❖ Color: el color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato-fosfato-cálcico 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. Un color rosado puede ser el resultado de la presencia de sangre o crecimiento de ciertos microorganismos. Otros colores (amarillo, azul, etc.), pueden ser producto de contaminación con sustancias coloreadas o de crecimiento de ciertos microorganismos. Una leche adulterada con suero de quesería puede adquirir una coloración amarilla-verdosa debida a la presencia de riboflavina.

❖ Sabor: El sabor natural de la leche es difícil de definir, 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 (mastitis); otras veces el sabor se presenta ácido cuando el porcentaje de acidez en el producto es superior a 22-33 mL NaOH 0,1 N/100 mL (0,2 - 0,3 % de ácido láctico. Pero en general, el sabor de la leche fresca normal es agradable y puede describirse simplemente como característico.

❖ Olor: El olor de la leche es también característico y se debe a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso

molecular, entre ellos, ácidos, aldehídos, cetonas y trazas de sulfato de metilo. La leche puede adquirir, con cierta facilidad olores extraños, derivados de ciertos alimentos consumidos por la vaca antes del ordeño, de sustancia de olor penetrante o superficies metálicas con las cuales ha estado en contacto o bien de cambios químicos o microbiológicos que el producto puede experimentar durante su manipulación. (PINZON, 2004).

LERCHE, (1999), describió 17 diferentes sabores anormales y sugieren una metodología para clasificar la leche según su sabor con un valor máximo de 45 puntos (cuadro 5)

La técnica más común consiste en oler el contenido de un recipiente (tina o tanque) inmediatamente después de haber sido destapado.

Cuadro 5. Guía general para la clasificación de la leche según su sabor

CLASIFICACIÓN	PUNTAJE	DESCRIPCIÓN DEL SABOR ESPECIFICO
Excelente	40 - 45	Sin criticismo
Buena	38 - 39, 5	Sabor ligeramente astringente y salado, carente de frescura, sabor ligero o definido ha cocido, a pienso o sin sabor.
Regular	36 - 37,5	Sabor ligeramente a "establo" y oxidado; definitivamente astringente y salado carente totalmente de frescura, pronunciado sabor a cocido o sin sabor
Pobre	35,5 o menos	Sabor ligero o definido a ácido, rancio y sucio; ligero, definido o pronunciado a "establo", amargo, extraño, a ajo/cebolla, a malta, metálico; definido o pronunciado a establo y oxidado; pronunciado astringente, a pienso y salado.
Insalubre	Sin Puntaje	Sabor pronunciado ácido, rancio y a sucio

FUENTE: LERCHE.M.1999

5.1.6 El procesamiento de la leche

Por su carácter perecedero, la leche requiere de alguna forma de procesamiento para prolongar su periodo de conservación. Si bien los métodos simples que utilizan calor o pasteurización destruyen las bacterias patógenas, no liberan a la leche de los organismos causantes de la descomposición. En climas tropicales, después de uno o dos días a temperatura ambiente la leche no resultará apta para el consumo humano.

El procesamiento de la leche la vuelve más estable y la hace apta para mayores períodos de almacenado. En las zonas tropicales, donde se registran temperaturas muy elevadas y los sistemas de refrigeración no se hallan fácilmente disponibles, la leche puede concentrarse por medio del hervido o convertirse en mantequilla, manteca clarificada u otros productos que permitan un mayor grado de preservación a la temperatura ambiental. Allí donde el abastecimiento de productos lácteos es abundante, pueden no resultar prioritarios el almacenado y la comercialización, lo que necesariamente conducirá a una pérdida de los productos. El procesamiento contribuye a disminuir los niveles de desperdicio, además de proporcionar un valor agregado al alimento.

En muchas zonas tropicales existe poca disposición para el consumo de leche fresca, lo que probablemente se origina como una medida de seguridad. En África y Asia, la intolerancia a la lactosa (incapacidad para digerir las azúcares de la leche) es bastante común.

El consumo de queso fermentado y yogur, en los que la lactosa se convierte en ácido láctico, ha contribuido a reducir este problema. La dificultad de contar con un mercado limitado para el consumo de

leche puede remediarse incrementando la demanda por el consumo de productos lácteos. El procesamiento de productos lácteos en centros comunitarios representa una buena fuente generadora de empleo, mientras que la producción doméstica proporciona un ingreso adicional a la familia. (PINZON, 2004).

5.1.7 Métodos generales para el procesamiento de leche

Si bien existen muchos métodos para el procesamiento de la leche que difieren en los detalles, éstos pueden agruparse en tres, según sus características generales. Estos tres métodos pueden, a su vez, superponerse y, utilizando una combinación de dos de ellos, es posible obtener un producto con mayor grado de preservación.

El primer método involucra aumentar el grado de acidez: de la leche (o bajar su pH). Esto previene o disminuye el crecimiento de los microorganismos de la descomposición y la acción de las enzimas, (sustancias naturales que producen cambios en el sabor).

La acidez de la leche puede incrementarse mediante:

- La fermentación del ácido láctico: microorganismos beneficiosos fermentan las azúcares en la leche, convirtiendo la lactosa en ácido láctico.
- La adición de ácidos orgánicos: vinagre o jugo de limón.

El segundo método involucra disminuir su contenido de humedad a un nivel lo suficientemente bajo como para controlar el crecimiento de microorganismos y la acción de las enzimas, haciendo el producto más estable. El contenido de humedad puede reducirse de la siguiente manera:

- Por evaporación del agua utilizando calor.
- Por medio del cuajado de la leche, retirando el suero o la parte acuosa, como en el caso del queso.

- Separando mecánicamente la grasa, batiéndola para convertirla en mantequilla.
- Añadiendo sal o azúcar para concentrar parte del agua, como en la elaboración de los quesos o dulces de leche.
- Secando los productos al sol o al aire libre, como en el caso de la elaboración de quesos o la extracción de la caseína de la leche (proteína de la leche).
- Secando los productos mecánicamente, como en la producción de leche en polvo, utilizando secadoras a rodillo o atomizadores.

El tercer método simplemente involucra su calentamiento para producir leche pasteurizada o esterilizada. (PINZON, 2004).

5.1.8 La Pasteurización

El desarrollo de la industria lechera ha garantizado que al menos en los centros urbanos importantes la leche se consuma ya pasteurizada, a partir de este momento la pasteurización no solo es un procedimiento de conservación interesante para el comercio, sino, también, un procedimiento de higienización capaz de garantizar la seguridad a los consumidores frente al contagio de las enfermedades transmitidas por la leche contaminada. Este método consiste en la destrucción de la mayor parte de las formas vegetativas de los microorganismos capaces de alterar los alimentos o de interferir en el desarrollo de fermentaciones deseables, en el caso de la leche, sometiéndola primeramente al calor, sin llegar a los 100 grados centígrados (sólo a la temperatura necesaria para eliminar el bacilo transmisor de la Tuberculosis, el cual se destruye en 6 minutos a una temperatura de 63 ° C y en 6 segundos a 72° C).

5.1.8.1 Objetivo de la Pasteurización

En 1933 Charles Porcher definió exactamente el objeto de la pasteurización:

“Pasteurizar la leche es destruir en ella, por el empleo apropiado del calor, casi toda la flora banal y la totalidad de su flora patógena, procurando alterar lo menos posible la estructura física de la leche, su equilibrio químico y sus diastasas y vitaminas”.

Los progresos realizados durante los últimos cincuenta años en el campo de la nutrición y de la dietética permiten tratar la leche por pasteurización sin alterar sensiblemente su composición ni su estructura. (PINZON,2004).

5.1.8.2 Condiciones de la Pasteurización

5.1.8.2.1 Intensidad del tratamiento térmico

Primero hay que determinar la intensidad del tratamiento, es decir, fijar la temperatura y el tiempo durante el que debe aplicarse la temperatura aisladamente no significa nada. Tiene que ir acompañada de la duración.

La pasteurización de ninguna caso es capaz de transformar las leches de baja calidad en leches de superior calidad, por esta razón se comprende que no todas las leches crudas puedan ser pasteurizadas.

5.1.8.2.2 Condiciones que debe tener el calentamiento y el enfriamiento

Modificar lo menos posible la composición y estructura de la leche es la preocupación que debe dirigir la elección de las condiciones de calentamiento y refrigeración (PINZON,2004).

5.1.8.3 Métodos de Pasteurización

Se pueden distinguir dos grandes tipos de métodos.

5.1.8.3.1 La pasteurización baja. Se define por un calentamiento a 63° C durante 30 minutos un método lento y discontinuo, pero presenta la ventaja de no modificar las propiedades de la leche.

5.1.8.3.2 La pasteurización alta. Se define como el calentamiento a 72° C durante 15 segundos. El método es rápido y continuo, pero modifica ligeramente las propiedades de la leche, si bien los aparatos modernos reducen este inconveniente, la albúmina y las globulinas sufren una coagulación parcial.

La pasteurización alta esta hoy mundialmente extendida, es casi el único método empleado, se alcanzan temperaturas superiores a 80° C, dada la mediocre calidad de las leches crudas.

En esta fase ocurren dos fenómenos importantes, la coagulación de las proteínas y la reducción de la carga microbiana.

Luego la leche es sometida a un enfriamiento rápido. Si la refrigeración del contenido de los recipientes no se realiza rápidamente, puede producirse una alteración microbiana como resultado de la multiplicación de microorganismos termófilos. El enfriamiento debe realizarse según el método o proceso previamente definido, de forma que se evite el riesgo de germinación de las esporas que hayan sobrevivido al tratamiento térmico. (PINZON,2004).

Cuadro 6. Destrucción térmica de las bacterias patógenas

ESPECIE BACTERIANA	MARGEN MÍNIMO DE SEGURIDAD PARA LA PASTEURIZACIÓN A	
	72°C-10 s	72°C-20 s
Bacilo Tífico	6°C	6°C
Bacilo Paratífico A	7°C	10°C
Bacilo Paratífico B	8°C	8°C
Bacilo Paratífico C	7°C	9°C
Brucella melitensis	3°C	3°C
Bacilo de Bang	4°C	4°C
Bacilo de Koch humano		
-cultivo	4°C	4°C
-producto patológico	5°C	5°C
Bacilo de Koch bovino		
-cultivo	2°C	7°C
-producto patológico	4°C	4°C
Estafilococo patógeno	8°C	8°C
Estreptococo piogeno	9°C	9°C
Enterococo	Subsiste tras 72°C-60 s	
Bacilo diftérico	12°C	
Colibacilo	5°C	7°C
Klebsiella aerogenes	Inf.a 2°C	2°C
Bacilo de Friedlander	5°C	7°C
Proteus	Inf a 2°C	Inf a 2°C
Bacilo procianico	7°C	10°C
Estreptococos anaerobios	3°C	7°C

FUENTE: LERCHE.M.1999

5.1.9 Microbiología de la Leche

La leche es un alimento muy susceptible de sufrir cambios. Su composición resulta especialmente apta para el desarrollo de microorganismos, por lo que es importante tener un conocimiento básico de la microbiología de la leche cuando se planea introducir alguna mejora en su procesamiento.

Por su alto contenido de humedad, su abundante suministro de nutrientes combinados con un grado de acidez neutral (pH de 6,7)- y su temperatura, la leche cruda es un medio propicio para la proliferación de microorganismos, incluyendo los que causan intoxicación alimentaria y los que producen cambios enzimáticos, como aquellos que provocan la rancidez de la grasa de la leche.

Los microorganismos susceptibles de desarrollarse en la leche pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- Los que causan la descomposición de la leche.
- Los que originan infecciones en las personas, llamados patógenos.
- Los beneficiosos, como aquellos que causan la fermentación natural de la lactosa en ácido láctico. Éstos son utilizados por quienes procesan la leche para elaborar productos tales como queso o yogur (MOSSEL, 1995 ,CITADO POR PINZON,2004).).

5.1.10 Factores que afectan el crecimiento de microorganismos

Una vez que los microorganismos han alcanzado la leche comienza un periodo de adaptación de estos al medio circundante, la duración de este periodo así como la capacidad para multiplicarse esta condicionada al efecto de varios factores intrínsecos, extrínsecos e implícitos, los cuales serán discutidos brevemente en los apartes siguientes.

5.1.10.1 Factores Intrínsecos:

Los factores intrínsecos son aquellos que tienen que ver con el alimento en sí, su composición y características. Dentro de este grupo está el pH, actividad de agua, potencial de oxidación-reducción, cantidad de nutrientes y sistemas antimicrobianos.

5.1.10.1.1 PH: la gran mayoría de bacterias y hongos crecen a pH cercano a la neutralidad. El pH de la leche normal se encuentra entre 6.5 a 6.7, ligeramente ácido, esto favorece el crecimiento de una flora microbiana diversa. Sin embargo son las bacterias y de ellas el grupo de las ácido lácticas las que se ven favorecidas para crecer en la leche a pH normal.

Cuadro 7. Rangos de pH para el crecimiento de los microorganismos

GRUPO	RANGO	OPTIMO
Bacterias	4,5 - 9	6,5 - 7,5
Levaduras	2 - 11	4 - 6
Mohos	2 - 9	-

FUENTE: CASADO, P.; BLANCO, 1998.

5.1.10.1.2 Actividad del agua (aw): como actividad de agua se conoce la cantidad de agua libre disponible para el crecimiento microbiano y para los procesos químicos y enzimáticos. En los alimentos no toda el agua se encuentra en estado libre, una parte se puede encontrar ligada a las proteínas o formando parte de otros compuestos. El 87,5 % de la leche está constituido por agua, una parte está ligada a las caseínas y una mayor se encuentra en estado libre. La actividad de aw de la leche está estimada en 0,99, la del agua pura es 1,00. Los microorganismos así como todos los seres vivos necesitan presencia de agua para la mayoría de los procesos metabólicos. Sin embargo debido a la excesiva humedad de la leche algunos mohos y levaduras se les dificulta la

multiplicación de allí que sean considerados de mayor importancia en productos lácteos deshidratados que en leche fluida.

Cuadro 8. Actividad de agua (aw) a la cual crecen algunos Microorganismos

GRUPOS	aW
Bacterias G -	0,97
Bacterias G +	0,90
Levaduras	0,88
Hongos filamentosos	0,80
Bacterias halófilas	0,75
Hongos xerófilos	0,61

FUENTE: CASADO, P.; BLANCO, 1998

5.1.10.1.3 Potencial de Óxido-Reducción (Redox, Eh): el potencial redox de los alimentos esta determinado por la presencia de elementos reductores (que ganan oxígeno o pierden electrones) y oxidante (que pierden oxígeno o ganan electrones). El Eh puede tener valores positivos, cuando la sustancia o el alimento se comporta como oxidante o negativos cuando se comporta como reductor. El oxígeno disuelto en la leche contribuye a que la misma posea un Eh de +250 a +350 mV (milivoltios). Los microorganismos al multiplicarse, debido a su metabolismo liberan electrones y consumen oxígeno, lo cual hace que el Eh disminuya. En medios no "bufferados" una pequeña parte de microorganismos (10^5 /g) pueden causar cambios en el potencial, en cambio en alimentos bien amortiguados una población mayor (10^8 /g) apenas modificará el Eh.

Según las necesidades de oxígeno los microorganismos se clasifican en:

a. Aerobios Estrictos: los que necesitan oxígeno para desarrollarse, no se multiplican en ambientes anaeróbicos. Ejemplos: *Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus, mohos*.

b. Anaerobios Facultativos: Son microorganismos que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Ejemplo: *Enterobacterias, Staphilococcus*.

c. Anaerobios Estrictos: microorganismos que solo crecen en ausencia de oxígeno. Ejemplos: *Clostridium, Propionibacterium*

d. *Microaerofilos*: aquellos que para crecer necesitan solo una pequeña fracción de oxígeno en la atmósfera. Ejemplos: *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus*

Por lo general en ciertos alimentos el desarrollo inicial de los microorganismos es aeróbico y posteriormente al reducirse el Eh comienza el desarrollo de los anaeróbicos. En la leche las bacterias ácido lácticas se consiguen en abundancia y por ser varias de ellas anaerobias facultativas, pueden desarrollarse en ambos ambientes.

5.1.10.1.4 Contenido de Nutrientes: en la leche se encuentran gran variedad de vitaminas, además por poseer azúcares fácilmente fermentables, citratos, grasas y proteínas aportan un medio enriquecido para el crecimiento de microorganismo. Sin embargo es válido notar que se encuentran pocos aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular, de allí que las bacterias que no posean la capacidad de sintetizar enzimas proteolíticas se verán en mayor dificultad para crecer. Pero en la leche se dan diversas asociaciones de microorganismos que mediante relaciones simbióticas logran desarrollarse en el medio. Algunas de estas asociaciones se

aprovecha para la elaboración de productos lácteos, como ejemplo se puede citar el yogurt, donde se da una simbiosis entre el *Streptococcus* y el *Lactobacillus*.

5.1.10.1.5 Componentes y Sistemas antimicrobianos de la leche: en la leche se encuentran diversos sistemas antimicrobianos que pueden proteger a la glándula contra infecciones y a la leche de la contaminación. Desgraciadamente la protección es limitada y de poca duración posterior al ordeño. Entre estos sistemas tenemos:

a. Lactoferrina: es una glicoproteína que tiene la propiedad de unirse al hierro, similar a la transferrina de la sangre. Se encuentra en altas concentraciones en la leche de los animales que no se ordeñan y en la de aquellos afectados por mastitis. Inhibe la multiplicación de las bacterias al privarlas del hierro y puede proteger a la ubre seca de la infección por *Escherichia coli*. Se ha demostrado que altas concentraciones de citrato y bajas de bicarbonato reducen su capacidad de unión con el hierro, disminuyendo por lo tanto su acción inhibitoria. La concentración de lactoferrina está correlacionada positivamente con el número de PMN, ya que ésta es derivada de estas células durante la inflamación de la ubre. Además la acción de la lactoferrina es acelerada por la presencia de lisozima, derivada también de los PMN. En leche de búfala se han encontrado concentraciones de 0,320 mg/mL, mayores a las reportadas en leche de vaca (0,200 mg/mL). Actualmente se estudian derivados de lactoferrina bovina (apo-lactoferrina, holo-lactoferrina, lactoferrina B) con el fin de utilizarlas como biopreservadores en alimentos.

b. Inmunoglobulinas: en la leche se pueden encontrar anticuerpos que llegan desde el torrente sanguíneo (Ig G) o bien sintetizados en

la glándula mamaria (Ig A), cuya función es proteger al recién nacido por transferencia pasiva (inmunización pasiva. Pero también actúan a nivel local para evitar o reducir la severidad de las mastitis, causada por gérmenes susceptibles al sistema complemento-anticuerpo que opera en la glándula. Además pueden neutralizar toxinas o actuar como opsoninas para facilitar la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares.

c.Sistema Lactoperoxidasa – Tiocianato - Peróxido de hidrógeno (LP): la lactoperoxidasa es un enzima que se sintetiza en la ubre y está presente en altas concentraciones en la leche de vaca. Puede llegar a representar el 1% de las proteínas totales de esta. El tiocianato se encuentra en diferentes concentraciones dependiendo principalmente de la alimentación del animal; se ha reportado valores de 5,9 a 8,94 mg/L en leche cruda de búfala y de 1,2 a 14,5 mg/L en leche de vaca. El peróxido de hidrógeno, procede de los microorganismos que producen esta sustancia, (ejemplo los estreptococos) y de los PMN. El sistema LP, destruye los microorganismos por oxidación de sus sistemas enzimáticos, actuando como sustrato el peroxido de hidrógeno y como cofactor el tiocianato. Este sistema antimicrobiano solo inhibe temporalmente ciertas bacterias (estreptococos del grupo B y N), aunque tiene poder bactericida sobre otras. Bacterias catalasa positiva, Gram negativos como *Pseudomonas*, *Coliformes*, *Salmonella* y *Shigella*, son inhibidas por el sistema. La letalidad depende del pH, temperatura, tiempo de incubación y densidad celular. La activación del sistema LP puede incrementar la vida útil de la leche por inhibición microbiana, mejorar la calidad

microbiológica de la leche al ofrecer un efecto bacteriostático sobre la flora láctea y un efecto bactericida sobre coliformes.

d.Aglutininas: son anticuerpos capaces de aglutinar las bacterias sensibles de una manera específica, formando masas agrupadas que son arrastradas a la superficie por los glóbulos grasos o se depositan en el fondo en la leche desnatada. El resultado es una verdadera inhibición por separación física. Son activas sobre un gran número de estreptococos lácticos y lactobacilos. También actúan sobre enterobacterias. Son más abundantes en el calostro. Se destruyen fácilmente con el calentamiento sobre los 60 °C.

e.Fagocitosis: el principal mecanismo de defensa de la ubre lo constituyen los fagocitos polimorfonucleares (PMN). Una ubre sana puede excretar de 100.000 a 500.000 células por mL, de las cuales el 10% son PMN. En una ubre enferma, el número de células puede llegar a 10.000.000 por mL, siendo el 90 % PMN. La fagocitosis y la destrucción de bacterias por los PMN es menos eficiente en la leche que en la sangre, debido principalmente a que los mismos ingieren grandes cantidades de grasa y caseína, razón por la cual la ubre puede llegar a ser fácilmente infectada, aún con un pequeño número de patógenos.

f.Otros sistemas antimicrobianos descritos en la leche pero que aun no se conoce su modo de acción o bien son de menor importancia son la Vitamina B12, cierto factor descritos en vacas cercanas al secado. La lisozima enzima que se encuentra en mayor abundancia en la leche de madres humanas se encuentra en cantidades trazas en la leche de vaca y tiene la propiedad de producir la lisis de las bacterias. (CASADO, 1998).

5.1.10.2 Factores Extrínsecos

Los factores extrínsecos son los que tienen que ver con el ambiente donde se almacenan los alimentos. Entre ellos están la temperatura, la humedad relativa y los gases atmosféricos.

5.1.10.2.1 Temperatura: no todos los microorganismos crecen a la misma temperatura. Según la temperatura óptima de crecimiento se pueden distinguir tres grupos: los mesófilos, los psicrófilos y los termófilos. Al grupo de las bacterias Mesófilas pertenece la mayoría de la flora que se encuentra con mayor frecuencia en la leche, principalmente las bacterias lácticas. Bacterias Psicrófilas son las que crecen a temperaturas de refrigeración. Son bacterias psicrófilas los miembros del género *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*. Bacterias Termófilas son aquellas que crecen bien a temperaturas entre 45 a 55 °C, en este grupo están el *Lactobacillus bulgaricus*, *L. fermenti*, *L. Lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus termophilus*. Otro grupo que merece ser descrito lo constituyen las Bacterias Termoturificas que son bacterias en su mayoría mesófilas que resisten temperaturas de pasteurización; algunas de ellas son termófilas. Se encuentran en este grupo los *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Esporas de Bacillus* y *Clostridium*.

Los microorganismos psicrotrofos y los termotrofos, son microorganismos mesófilos pero que igualmente pueden crecer a temperaturas bajas o altas, respectivamente (Cuadros 9 y 10)

Cuadro 9. Rangos de temperatura (°c) para el crecimiento de los microorganismos

GRUPOS	MIN	OPTIMA	MAX
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Termotrofos	15-20	30-40	45-50
Mesófilos	5-15	30-40	40-47
Psicrófilos	-5 - +5	12-15	15-20
Psicrotrofos	-5 - +5	25-30	30-35

FUENTE: ROBINSON, R. K. 1997.

Cuadro 10. Microorganismos psicrófilos y termodúricos de la leche cruda

GÉNEROS TERMODURICOS	GÉNEROS PSICROTROFOS
Microbacterium	Acinetobacter
Micrococcus	Flavobacterium
Esporos de Bacillus	Aerobacter
Esporos de Clostridium	Alcaligenes
Alcaligenes	Bacillus
Pseudomonas	Arthrobacter

FUENTE: ROBINSON, R. K. 1997.

La temperatura a la cual se encuentra la leche después del ordeño favorece la rápida multiplicación microbiana. La mayor proporción de la flora bacteriana presente, son microorganismos mesófilos, es por ello que la inmediata refrigeración a temperaturas de 4 a 5 °C se hace fundamental para asegurar la calidad de la leche. Pero su almacenamiento no debe ser prolongado (máximo 24 horas) ya que entonces se favorecería el aumento en número de la flora psicrotrofa. Cuando la leche no vaya a ser procesada el mismo día de recepción debe ser sometida a un proceso de termización.

Cuadro 11. Efectos de la temperatura en la multiplicación microbiana en la leche producida en diferentes condiciones

CONDICIONES DE PRODUCCIÓN	TEMP.. DE ALMACENAMIENTO	RECUENTOS TOTALES DE BACTERIAS POR ML			
		Fresca	24 H	48 H	72 H
Vacas, medio ambiente y utensilios limpios	4.4. C°	4.295	4.138	4.566	8.427
	10.0 C°	4.295	13.695	127.727	5.725.277
	15.5.C°	4.295	1.587.333	33.011.111	326.500.000
Vacas limpias, medio ambiente y utensilios sucios	4.4. C°	39.082	88.028	121.864	186.254
	10.0 C°	39.082	177.437	831.615	1.761.548
	15.5.C°	39.082	4.461.111	99.120.000	633.375
Vacas, medio ambiente y utensilios sucios	4.4. C°	136.533	281.546	538.775	749.030
	10.0 C°	136.533	1.170.540	13.662.115	25.687.541
	15.5.C°	136.533	24.673.571	639884615	2407083333

FUENTE: ROBINSON, R. K. 1997.

5.1.10.2.2 Humedad relativa: la humedad de la atmósfera influye en la humedad de las capas superficiales de los alimentos en almacenamiento. En leche fluida no juega un papel importante, contrario al que puede jugar en quesos en almacenamiento o en cavas de maduración.

5.1.10.2.3 Gases Atmosféricos: al igual que la humedad relativa, los gases atmosféricos no influyen marcadamente en la calidad microbiológica de la leche cruda, salvo que la misma sea sometida a procesos de agitación fuerte donde el oxígeno del aire pueda ser incorporado al alimento y favorecer el crecimiento microbiano aeróbico. Este factor debe ser considerado en el almacenamiento de ciertos derivados lácteos los cuales pueden verse alterados por una

alta presión de oxígeno en la atmósfera (leche en polvo, leche evaporada, quesos, etc).

5.1.10.3 Factores implícitos

Dentro de los factores implícitos se describen los relacionados directamente con las especies microbianas, su metabolismo y las relaciones que establecen. No todas las bacterias tienen la capacidad de crecer en la leche, aún cuando encuentren condiciones óptimas. Esto es debido al estado como se encuentran los diferentes componentes. Por ejemplo, no todas las especies tienen la capacidad de metabolizar la lactosa, si no que necesitan que esta este hidrolizada para así poder utilizar la glucosa o galactosa. De manera que aquellas que estén capacitadas para producir las enzimas necesarias se verán más favorecidas en crecer. Así mismo pasa con las proteínas, muchos microorganismos no tienen poder proteolítico, por lo que dependen de otros que metabolizan las proteínas y así poder utilizar las aminoácidos libres. De esa manera en la leche y productos lácteos se pueden observar varios ejemplos de relaciones simbióticas, siendo la más destacada la que se da entre el *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus*, durante la elaboración del yogurt. En estos el primero se favorece de la capacidad proteolítica del segundo, a la vez que este incrementa su desarrollo a medida que el estreptococo produce ácido fórmico y baja el pH de la leche (ROBINSON, 1997).

5.1.11 Microorganismos de importancia en leche cruda

A continuación se presenta una breve descripción de los principales microorganismos que pueden encontrarse en leche cruda.

5.1.11.1 Bacterias

Dada las características de la leche cruda, los microorganismos predominantes y que se ven favorecidos para su crecimiento son las bacterias. En la leche se pueden encontrar diverso géneros y especies bacterianas. Aquellas de mayor importancia en la industria láctea son las llamadas bacterias lácticas y las bacterias coliformes.

5.1.11.1.1 Bacterias Gram positivas:

-Bacterias lácticas: son un grupo de 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 desdobladas, vitaminas y poco oxígeno. Son Gram positivas y su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide. Algunas tienen forma bifida (*Bifidobacterium*). Soportan pH 4 en leche. Son anaeróbicas facultativas, mesófilas y termófilas y de crecimiento exigente. Pueden ser homofermentativas (más del 90% de su metabolismo resulta en ácido láctico) o heterofermentativas (producen además del ácido láctico, otros ácidos y gases). Los principales géneros de bacterias ácido lácticas son: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragonococcus*, *Alloiococcus* y *Bifidobacterium*.

Su estudio en el ámbito tecnológico es importante por lo siguiente: Son formadoras de textura y ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos. Por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH iso-eléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos. En la elaboración de crema y

mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumentar el rendimiento. Algunas especies producen polisacáridos (gomas, mucina), que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura (*S. termophilus*, *Lb. bulgacicus*, *Lc. cremoris*).

Aportan sabor y aroma, ya que como parte de su metabolismo fermentativo se da la producción de acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. El diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla. La acetoina lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados. Además la producción de enzimas que intervienen en el afinado de los quesos por degradación de las proteínas y las grasas afectan notablemente las características organolépticas de los mismos.

Ejercen efecto biopreservador manifestado en la prolongación de la vida útil de los productos elaborados con sus cultivos. Este efecto se lleva a cabo por varios mecanismos: a) ciertas especies producen bacteriocinas (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus*) las cuales son proteínas que se comportan como antibióticos y que inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con estas; b) con la producción de ácido y descenso del pH se logra la inhibición de otras especies bacterianas y la conservación de los alimentos; c) el efecto biopreservador también se cumple gracias a la competencia por nutrientes que se da entre las diversas especies bacterianas.

Aportan beneficios para la salud de los consumidores, el cual se ha descrito como efecto probiótico. Este puede manifestarse de manera específica en la prevención y reducción de los síntomas en

los cuadros diarreicos. Además se le han atribuido a las BAL, efecto preventivo de tumores, anticolesterolemico y modulador del sistema inmunológico.

❖ *Micrococcus*: débilmente fermentadores, forman parte de la flora inocua que contamina la leche cruda. Tienen poca actividad enzimática, por lo tanto son de muy poca importancia como agentes de adulteración en la leche. Sin embargo por ser la flora más abundante en leche cruda y tener cierta capacidad proteolítica pueden llegar a ser causante de alteraciones en leches pasteurizadas mal almacenadas.

❖ *Estafilococos*: son anaerobios facultativos, fuertemente fermentadores. Son de gran importancia desde el punto de vista sanitario. Causan mastitis y pueden provocar enfermedades o intoxicaciones en los humanos. *Staphilococcus aureus* produce una exotoxina que causa fuertes trastornos intestinales en los humanos, la cual es termorresistente, por lo cual no es destruida con la pasteurización. El *Staphilococcus epidermidis* se ve implicado en algunos casos de mastitis, por lo cual puede llegar a contaminar la leche.

❖ *Bacterias esporuladas*: los *Bacillus* son bacterias aeróbicas con actividad enzimática variada producen acidificación, coagulación y proteolisis. Los *Clostridium* son anaerobios estrictos, producen gas. Algunos producen toxinas patógenas (*Clostridium botulinum*). Ambos géneros son de poca importancia en leche cruda, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas. Cobran importancia en productos lácteos como en leche pasteurizadas, quesos fundidos, leches concentradas, quesos de pasta cocida.

Resisten la pasteurización por su capacidad de producir esporas, las cuales solo se destruyen a temperaturas por encima de 100 °C.

❖ Otras bacterias Gram + que pueden encontrarse en la leche son *Corynebacterium*, bacterias *propionicas*, *Brevibacterium* estos últimos se encuentran en las cortezas de algunos quesos madurados almacenados en condiciones húmedas.

5.1.11.1.2 Bacterias Gram negativas

❖ Enterobacterias: los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto su presencia en el agua y la leche se relaciona con contaminación de origen fecal. Las enterobacterias son menos abundantes en la leche que otras bacterias gram negativas, sin embargo, tienen una gran importancia desde dos puntos de vista, higiénico: ya que varias de estas especies tienen poder patógeno, de las cuales la más temible es la *Salmonella* y otras que pueden provocar trastornos gastrointestinales (*Yersinia*, *E. Coli*, *Shigella*); y tecnológico: ya que son bacterias heterofermentativas, grandes productoras de gas (carbónico e hidrogeno) además producen sustancias viscosas y de sabor desagradable, todo lo cual conduce a la alteración de la leche o subproductos. De las enterobacterias las más comunes encontradas en los productos lácteos son las del grupo Coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*). La determinación de su presencia indica calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada.

Enterobacterias más comunes de la leche cruda: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerógenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Serratia*. Los últimos dos géneros se consiguen

poco frecuentes, son microorganismos inocuos pero por su poder proteolítico pueden provocar alteraciones en la leche.

❖ *Pseudomonas*: más del 50% de la flora Gram negativa de la leche cruda esta representada por este género. Juegan un papel importante en la conservación de productos lácteos, ya que además de ser psicrófilas, varias especies tienen un gran poder proteolítico y lipolítico. Además se ha descrito que algunas de estas enzimas resisten temperaturas por encima de los 80 °C, por lo cual pueden causar alteraciones aún en productos elaborados con leches pasteurizadas,

❖ *Acromobacteriaceae*: este grupo de bacterias no fermentan la lactosa, no son proteolíticas ni patógenas, pero representan las bacterias psicrófilas que crecen en las leches conservadas a baja temperaturas, algunas pueden producir sustancias viscosas y pigmentos. Se han descritos los géneros *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter*.

❖ Bacterias gran negativas diversas: Las Brucellas son bacterias patógenas para los animales y para el hombre, aunque poco frecuente, pueden llegar a causar cuadros de mastitis. Se destruyen con la pasteurización.

5.1.11.2 Mohos y levaduras:

No tienen importancia en leche fluida, si no más bien en los productos. Algunas especies son utilizadas como cultivos lácteos para el afinado de los quesos madurados como el *Penicillium candidum* y *Penicillium camemberti* en los quesos de corteza blanca como el *Camembert* y el *Penicillium roqueforti* en los quesos de pasta azul (Roquefort).

Las levaduras al igual que los mohos son de poca importancia en la leche líquida y son fácilmente destruidos a temperaturas de pasteurización. En la leche se encuentran las especies *Cándida cremoris*, *Sacharomices lactis*, *Sacharomices kefir*. *Torula kefir* se encuentra en los granos de kefir utilizados para producir esta bebida láctea, caracterizada por su sabor ácido-alcohólico, producto de la fermentación de la lactosa por estas especies.

5.1.11.3 Virus:

La leche se puede contaminar con los virus causantes de la Fiebre Aftosa, Estomatitis Vesicular. Los más importantes para la industria láctea son los Bacteriófagos virus que infectan a las bacterias produciendo su muerte, por lo cual pueden afectar la producción de derivados lácteos causando lisis de los cultivos añadidos para la producción de sabor y aroma (WALSTRA,1994).

5.1.12 Control de la contaminación

Las principales fuentes de contaminación en la leche cruda por presencia de microorganismos están constituidas por superficies tales como las ubres del animal y los utensilios.

A través de campañas de educación se puede reducir la contaminación por parte del personal, así como una supervisión cercana para evitar que personas enfermas participen en la labor diaria de ordeño.

Deben ejecutarse programas sanitarios preventivos, con lo cual no solo se logra un producto de buena calidad sino que también se incrementa la productividad. Además debe evitarse ordeñar animales enfermos o bajo tratamiento medicinal.

En fin, tomando en cuenta las principales fuentes de contaminación, pueden tomarse diversas medidas encaminadas a evitar el contacto de estas con la leche y mejorar su calidad sanitaria final.

Durante el manipuleo, las manos también portan bacterias a la leche. Por ello, resulta sumamente importante lavar cuidadosamente las manos y las superficies con agua limpia. Las mejoras en las prácticas sanitarias durante el manipuleo y el procesamiento tradicional de la leche pueden no ser bien recibidas debido a las creencias culturales o, simplemente, a la falta de tiempo. Se requiere desarrollar talleres de capacitación para demostrar en la práctica el efecto de las buenas técnicas sanitarias en la calidad del producto final.

Una vez que los microorganismos encuentran la forma de introducirse en la leche, se desarrollan con facilidad y se multiplican muy rápidamente. Los microorganismos se reproducen mejor a la temperatura del ambiente, de manera que mantener la leche fría disminuye sus posibilidades de crecimiento. Calentar la leche en un proceso conocido como pasteurización permite destruir un gran número de microorganismos.

Del mismo modo, incrementando la acidez de la leche, ya sea por fermentación natural o por adición de un ácido, se inhibe el crecimiento de organismos patógenos.

Debido a esto, no es conveniente guardar el producto por períodos muy prolongados; además, a temperaturas más bajas, se favorece el desarrollo de la flora psicrófila que en nada beneficia al producto, existiendo, como agravante, cepas resistentes a los tratamientos térmicos.

La estrategia para prevenir la contaminación de la leche, aúna el control integral de varios factores que pueden resumirse en unos pocos principios fundamentales, en función del origen de los microorganismos.

Aplicando estos principios en la operación de la manipulación de la leche es factible producir, en forma constante, leche de buena calidad.

Es importante tener presente que la importancia de la calidad microbiana de la leche, debe ser vista bajo tres aspectos fundamentales: sanitarios, ya que puede resultar en un vehículo de transmisión de enfermedades zoonóticas, tecnológico y económico.

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, muy especialmente en lo que a mastitis se refiere. El origen de la contaminación microbiana de la leche puede provenir tanto de la ubre como del medio ambiente y equipo de ordeño (ALAIX,1994,CITADO POR PINZON,2004).).

5.1.12.1 Contaminación de la leche en el interior de la ubre

Aún en el caso de que la glándula mamaria se encuentre sana, se reconoce que las primeras porciones de leche ordeñada contienen microorganismos, disminuyendo su número a medida que el ordeño avanza.

Esto se explica porque el canal del pezón se encuentra colonizado por muchos microorganismos, como por ejemplo *Staphilococcus*, *Corinebacterium*, *Coliformes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.

Lo anterior puede verse reflejado en el ejemplo siguiente:

Leche primeras porciones	6 500 gérmenes/ml
Leche a mitad del ordeño	1 350 gérmenes/ml
Leche al final del ordeño	709 gérmenes/ml

FUENTE: TETRA PAK 1996

Esta contaminación se ve acrecentada por el reflujo producido por la ordeñadora de tipo convencional, arrastrando con esto microorganismos que colonizan la punta del pezón, hacia el interior de la ubre (PINZON,2004).

Cuando la glándula mamaria se encuentra contaminada, especialmente en los casos de mastitis de tipo agudo, los recuentos de microorganismos pueden ser muy elevados, alcanzando valores de varios millones.

5.1.12.2 Contaminación en el exterior de la glándula mamaria

En la parte externa de la ubre y pezones, es posible detectar estiércol, barro, paja u otros residuos de la cama del animal. Si bien la flora microbiana del interior de la ubre es, casi en su totalidad, de tipo mesófilo, en el exterior se suman microorganismos psicrófilos y termófilos, de los cuales los formadores de esporas, tanto aerobios como anaerobios, provocan serios problemas en la industria.(THOMAS,1991).

Entre los microorganismos que pueden llegar a la leche por la vía externa, son importantes de señalar aquellos que son patógenos para el hombre, como el *Bacillus cereus* que tiene la capacidad de generar esporas con cierta termorresistencia y que produce cuadros tóxicos en el hombre, debido a la producción de enterotoxinas.

Cuadro 12. Valores promedio del contenido de gérmenes en diferentes sustancias

Aire del establo	79/l
Leche recién ordeñada	300/ml
Leche a la recepción en planta	500,000 a varios millones/ml
Leche pasteurizada (reciente)	50/ml
Leche pasteurizada (24 horas)	hasta un millón/ml
Leche ácida	más de 10 millones/ml
Agua potable (manantial)	10-290/ml
Agua sin filtrar	6,000-290,000/ml
Polvo de la calle	78 millones/g
Hierba	2-200 millones/g
Excremento de vaca	40 millones/g

FUENTE: THOMAS, S.B..1994.

El *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.

Otras bacterias, como *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Streptococcus A* y *Corynebacterium diphtheriae*, pueden llegar a la leche a través del hombre.

Por otra parte, no se debe descartar la posibilidad de que algunos virus procedentes del hombre lleguen a través de la leche a otros individuos, como también otros microorganismos que no tienen el carácter de zoonosis como *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Coliformes*, *Pseudomonas*, *Pro-teus* y *Corynebacterium*.

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 el *Mycobacterium bovis*, microorganismo que

puede habitar en la leche; *Brucella abortus*, que se localizan en los ganglios linfáticos mamarios, liberándose a través de la leche por períodos de tiempo muy prolongados; *Coxiella burnetti*, *rickettsia* que provoca la Fiebre Q y que se libera durante meses en la leche de vacas enfermas; *Pseudomonas aeruginosa*, muy resistente a los antibióticos y desinfectantes, presente en la glándula mamaria y que afecta a la salud pública en asociación con ciertos *Staphilococcus*; *Staphilococcus aureus*, agente causal de numerosos casos de mastitis de carácter subclínico, produce toxinas resistentes al calor; *Streptococcus agalactiae*, típico de mastitis, presentándose por lo general el de tipo B, provoca enfermedades en el hombre, principalmente en los recién nacidos, debido a que el aparato urogenital femenino constituye un reservorio; las enterobacterias, como E. coli capaz de producir mastitis, pueden originar gastroenteritis debido a la producción de enterotoxinas.

También existen otros agentes que provocan mastitis, como otras especies de *staphilococcus*, *streptococcus*, *bacilos*, *mycoplasmas*, *corinebacterium*, hongos, levaduras, etc. que, por supuesto, contribuyen a la contaminación de la leche (PEREZ,1993, CITADO POR PINZON,2004).

5.1.13 Infecciones e intoxicaciones provocadas por leches contaminadas

Dentro de las denominadas infecciones alimentarias, tenemos aquellas de origen bacteriano, virales y aquellas provocadas por *rickettsias*.

En cuanto a las intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano, cabe citar el botulismo y aquellas debidas a la presencia de *enterotoxina estafilocócica*.

También deben señalarse aquellas enfermedades que se producen debido a una intensa contaminación de la leche por determinadas bacterias, como es el caso del *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, etc.

Finalmente, deben considerarse aquellas enfermedades de etiología incierta, como es el caso de algunas cepas de *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc.

5.1.13.1 Carbunco

La infección carbuncosa del hombre por vía oral, se debe casi siempre a la ingestión de carne poco cocida proveniente de animales infectados, y rara vez al consumo de leche. Ciertamente es que el *Bacillus anthracis* puede pasar de la sangre a la leche, pero ese paso exige que la bacilemia sea muy elevada.

No obstante lo anterior, siempre preexiste el peligro que los bacilos carbuncosos procedentes de las secreciones de los animales enfermos o del establo penetren en la leche.

La forma vegetativa del bacilo es tan sensible al tratamiento térmico como las bacterias no esporógenas; el calor las destruye al mismo tiempo que la fosfatasa, por lo que la leche correctamente pasteurizada no debe contener esta forma de *B. anthracis*. La forma esporulada en cambio, es mucho más resistente.

5.1.13.2 Shigelosis (Disentería Bacilar)

Infección alimentaria típica provocada por las shigelas, gérmenes que pueden ser transmitidos por la leche. Los brotes por lo general aparecen en instituciones y colectividades pequeñas.

Las Shigelas que contaminan la leche proceden de las manos de los operadores o, bien, de las heces, siendo transportadas por el agua y las moscas.

5.1.13.3 Brucelosis

La brucelosis constituye un ejemplo clásico de zoonosis transmitida por la leche. El hombre puede contraer esta enfermedad a través del consumo de leche cruda. Además de esta vía puede contraerla directamente por el contacto con tejidos y secreciones de animales infectados o por la inhalación de productos secos infectados, mecanismo que en algunas zonas parece tener más importancia que la infección mediante la leche.

Cualquiera de los tres tipos de brucelas (*melitensis*, *abortus* y *suis*) puede provocar la infección en el hombre, resultando ser la más virulenta para el ser humano, la *melitensis*.

La *Brucella abortus* predomina en todos los países, con excepción de los escandinavos, donde ha sido posible su erradicación.

Se ha calculado que la proporción de vacas no vacunadas que eliminan por la leche un número apreciable de bacilos, oscila entre un 15 y un 35%.

Por otra parte, la cantidad de leche infectada por brucela que llega a las industrias lecheras suele ser mayor que la contaminada con bacilos tuberculosos. La causa de esto se explica por el hecho de que la brucelosis produce lesiones en las ubres con mayor frecuencia que la tuberculosis.

Si bien la acidificación de la leche inhibe a las brucella, son necesarios varios días para eliminarlas por completo.

En general, es posible afirmar que la leche cruda, crema y mantequilla preparadas a partir de leches no fermentadas ni

tratadas térmicamente, así como quesos frescos no fermentados, constituyen productos muy peligrosos desde el punto de vista de la transmisión de brucelosis.

5.1.13.4 Cólera

En algunos casos la leche actúa como vehículo del vibrión colérico. Este germen puede llegar a ella por las manos sucias de un enfermo o de un portador convaleciente, aunque es más frecuente que llegue a través de aguas contaminadas.

El vibrión se mantiene viable en la leche durante 1 a 3 días en condiciones normales.

En leches que antes de contaminarse se han sometido a hervor y refrigeración, el período de viabilidad es más prolongado, pudiendo llegar a los 9 días. El tratamiento térmico destruye con facilidad al vibrión.

5.1.13.5 Difteria

Los brotes de difteria son comunes en colectividades que consumen leche sin pasteurizar.

El *Corynebacterium Diphtheriae*, germen de especial afinidad por el hombre, suele encontrarse en la nasofaringe de los enfermos o portadores sanos. Algunas veces se descubre en la vaca (heridas de los pezones o de la ubre) pero incluso en esos casos el origen de la infección reside por lo general en un portador humano.

La contaminación de la leche puede proceder de la ubre o de los portadores humanos, pero casi siempre, parte de estos últimos (estornudos, tos o dedos sucios de secreciones nasales). El *Corynebacterium* puede desarrollarse en la leche a la temperatura ambiente.

5.1.13.6 Fiebres Tifoidea y Paratifoidea

Constituyen las clásicas fiebres intestinales de transmisión hídrica o alimentaria.

La leche constituye probablemente el principal vehículo de esas infecciones, sobre todo en las zonas donde no se somete a este producto a un tratamiento térmico eficaz.

El origen de la infección, suele ser un portador humano o un enfermo ambulatorio, que trabaja posiblemente en una lechería o planta elaboradora de productos lácteos. Los bacilos tífico y paratífico A (*S. typhosa* y *paratyphi*) no son patógenos naturales del ganado lechero, en cambio, la *S. shottmulleri*, ha sido aislada en vacas portadoras de infección natural.

Estos gérmenes se multiplican en la leche a temperatura ambiente (> 15 °C) y una contaminación inicial pequeña, puede dar lugar a concentraciones de gérmenes muy peligrosas.

La crema, mantequilla, el queso y otros productos lácteos, parecen haber sido la causa de algunos brotes de tifoidea.

La *S. typhosa* sobrevive durante períodos muy prolongados en los productos lácteos conservados a temperaturas de congelación.

5.1.13.7 Otras Salmonelosis

Las salmonelosis son infecciones corrientes en los ganados de todos los países. Se han identificado más de 600 tipos de *salmonellas*.

La leche puede desempeñar un importante papel en la transmisión de esta enfermedad por dos motivos: primero, la infección del hombre para cualquier tipo de *salmonella* exige un número bastante grande de microorganismos y es dificultoso que un contagio directo del animal al hombre, se produzca una contaminación tan intensa; segundo, la leche es un buen medio de

cultivo para las *salmonellas* procedentes del ganado o de portadores humanos y constituye un excelente vehículo de transmisión en que los organismos, en presencia de ciertas combinaciones de tiempo y temperatura, alcanzan con rapidez el número indicado para provocar una infección.

La lucha contra la salmonelosis transmitida por la leche, requiere de un conocimiento exacto de la vía infecciosa animal leche- hombre y la manera de cortarla en la parte más conveniente.

5.1.13.8 Estreptococias

Los estreptococos del grupo A pueden provocar en el hombre diversas enfermedades agudas: anginas, otitis media, escarlatina, erisipela, etc.

La leche puede contaminarse con gérmenes procedentes de personas que se encuentran en el período de incubación de una infección estreptocócica, así como de convalecientes y de portadores asintomáticos. En algunos casos, las personas que diseminan el m.o. infectan al ganado lechero provocando en él mastitis subclínicas o clínicas que determinan el paso a la leche de gran número de estreptococos.

La leche que se consume cruda o sometida a tratamientos térmicos insuficientes puede ser causa de infecciones humanas de tipo esporádicos o epidémicos.

Los estreptococos del grupo B (*Str. agalactiae*) son una causa corriente de mastitis en los países templados, pero su acción patógena para el hombre es poco acusada y sólo proliferan en tejidos muy susceptibles, como son los del útero después del parto y los del recién nacido.

La lucha contra las estreptococias transmitidas por la leche se basa en las medidas siguientes: vigilancia médica estricta de los operarios de las granjas y plantas, eliminación de la leche procedente de cuartos mamarios infectados o que presenten anomalías, enfriamiento adecuado de la leche y, sobre todo, tratamiento térmico correcto de toda la leche, comprendida la destinada a la preparación de mantequilla, queso y otros productos.

5.1.13.9 Tuberculosis

El consumo de leche cruda representa el vehículo principal por el que los bacilos tuberculosos pasan del animal al hombre.

Las vacas lecheras infectadas son con mucho el reservorio más importante de bacilos tuberculosos. La incidencia de tuberculosis bovina en el hombre depende sobre todo de su presencia en el ganado vacuno y de la cantidad de leche cruda o insuficiente tratada que consume la población.

Los bacilos tuberculosos de la leche proceden unas veces del medio exterior contaminado (estiércol, polvo, etc.) y otras, las más, de las ubres afectadas; se ha observado, sin embargo, que los bacilos pueden pasar de la sangre a la leche a través de la ubre sin lesiones clínicas perceptibles. En términos generales puede decirse que el 4% aproximadamente de las vacas tuberculinas positivas eliminan bacilos tuberculosos en la leche, pero que sólo el 25% de los animales que excretan bacilos presentan lesiones evidentes de la ubre.

El bacilo tuberculoso de la variedad humana puede contaminar directamente la leche a partir de los ordeñadores y otros operarios, y llegar al consumidor del mismo modo que tantos otros gérmenes

patógenos transmitidos por la leche, a menos que se destruya a tiempo con un tratamiento térmico adecuado.

5.1.13.10 Adenovirus

Este grupo está integrado por unos veinte tipos diferentes de virus, aunque solamente algunos tienen carácter patógeno.

La vía común de transmisión parece ser la respiratoria; encontrándose algunos tipos en las heces. Es probable que la leche intervenga en la transmisión de los adenovirus.

5.1.13.11 Hepatitis Infecciosa

El virus se transmite por vía oral, los convalecientes y las personas clínicamente sanas pueden intervenir en la difusión.

La hepatitis infecciosa debe considerarse como una de las virosis más graves que puede transmitir la leche.

Ni siquiera el agua clorada puede frenar la proliferación de virus. Por consiguiente, dejando aparte la contaminación directa por las manos sucias, la infección puede propagarse por agua de mala calidad.

5.1.13.12 Fiebre Q

Enfermedad producida por una *rickettsia*, la *Coxiella burnetti* y se halla muy difundida en todo el mundo. En lo que a la infección humana se refiere, los principales reservorios se encuentran principalmente en tres especies de animales lecheros: la vaca, la oveja y la cabra. La infección humana se produce sobre todo por inhalación del polvo contaminado con líquido amniótico o con membranas fetales de animales infectados, pero también se observan casos causados por la ingestión de leche cruda contaminada.

El ganado infectado elimina *Coxiella burnetti* por la leche durante períodos prolongados (más de 200 días) aunque en cantidad variable de un día a otro.

La *Coxiella burnetti* pasa de la leche cruda a los productos lácteos, si antes no se efectúa una pasteurización adecuada.

5.1.13.13 Encefalitis transmitidas por las Garrapatas

En sus focos naturales el virus encefalítico pasa de unos vertebrados a otros a través de garrapatas y los ácaros, las infecciones del hombre pueden producirse por picadura de garrapata o por vía oral, sobre todo por la ingestión de leche no tratada y procedente de animales infectados.

5.1.13.14 Botulismo

El *Clostridium botulinum* y el *C1. parobotulinum* tienen esporas resistentes que se encuentran muy difundidas en el suelo y frecuentemente contaminan la leche y los productos lácteos, los tratamientos térmicos ordinarios no suelen destruirlo se han encontrado esporas viables en el queso, aunque generalmente sin las toxinas.

Aunque no se sabe con exactitud cuales son los factores que provocan la inhibición de estos microorganismos en la leche y el queso, es posible que la acidez de la leche y de algunos productos lácteos desarrollen un importante papel.

5.1.13.15 Gastroenteritis Enterotóxica Estafilocócica

El peligro mayor que tiene la contaminación de la leche con estafilococos, reside en que algunas cepas de estos microorganismos, pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas. Esta enterotoxina es termoestable y los estafilococos que la producen se encuentran con

mucha frecuencia en operarios aparentemente sanos y en el ganado lechero.

Sólo algunas cepas de estafilococos son toxígenas. La proporción de portadores de estafilococos potencialmente patógenos (coagulasa positivos) en la población general, varía según las zonas y las épocas; pudiéndose afirmar, sin embargo, que un 30-50% de las personas transportan estos estafilococos en las fosas nasales o en la piel, sobre todo si presentan forúnculos, heridas o ántrax.

Otra importante fuente de infección son las ubres y la piel de las vacas lecheras, infectada en ocasiones, por el contacto con portadores humanos.

El estafilococo no es termo resistente. Las combinaciones de tiempo y temperatura empleados normalmente en la pasteurización, destruyen la mayor parte de las especies de Micrococos.

Se han dado casos en los que, después de destruir todos los estafilococos mediante tratamiento térmico correcto de la leche, infectada, la enterotoxina conservaba potencia suficiente para producir gastroenteritis y otros trastornos.

La lucha contra la gastroenteritis producidas por la enterotoxina estafilocócica plantea un problema sumamente difícil.

No es nada fácil eliminar completamente todos los estafilococos existentes en la leche, que proceden algunas veces de infecciones latentes de las ubres, otras del propio personal de las lecherías y de las plantas elaboradoras.

Los operarios con heridas, forúnculos u otras lesiones estafilocócicas en las manos, no deberán manipular en ningún caso la leche ni los productos lácteos. Sin embargo, lo fundamental, es

impedir la multiplicación de los estafilococos, evitando de este modo la formación de enterotoxina.

La leche recién ordeñada debe enfriarse con la mayor rapidez posible hasta 10 °C por lo menos, conservándola así hasta su tratamiento térmico. Una vez realizado el tratamiento térmico correcto, es preciso evitar la recontaminación y multiplicación de los estafilococos. Bajo ningún concepto se debe permitir, por ejemplo, que la leche sometida a un tratamiento térmico parcial, permanezca a una temperatura favorable a la rápida multiplicación.

5.1.13.16 Infección por *Clostridium Perfringens* (Welchii)

El *Clostridium perfringens*, aparece con mucha frecuencia en las heces de las personas, animales e insectos. Sus esporas son muy resistentes y se encuentran muy difundidas en los establos y granjas.

Bajo ciertas condiciones, este germen puede multiplicarse rápidamente en los alimentos almacenados luego de la cocción o de un calentamiento previo, provocando gastroenteritis en los consumidores.

La única medida realmente eficaz para combatir a este microorganismo es el enfriamiento rápido y la conservación de la leche a una temperatura inferior a 15°C antes y después de la pasteurización.

5.1.13.17 Infección por Gérmenes Coliformes

Se han atribuido, no pocos trastornos gastrointestinales a la acción de las bacterias coliformes de los géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Proteus*, generalmente sobre la base de información heterogénea e insuficiente. Lo que se ha demostrado claramente es que algunos *Escherichia coli* de los

grupos 0, son causantes de la aparición de gastroenteritis agudas en niños y en adultos, actuando solos o en asociación con enterovirus.

Estudios efectuados , han mostrado que el 1% de las leches remitidas por los productores o centrales lecheras contiene *E. coli* enteropatógenos de los grupos 0, gérmenes que generalmente están implicados en la aparición de gastroenteritis.

Se ha observado que en las mastitis del ganado vacuno, se encuentran a veces *E. coli* enteropatógenos de los tipos que provocan con frecuencia gastroenteritis infantiles.

La investigación microbiológica de los gérmenes coliformes forma parte de los exámenes de leche cruda y pasteurizada en la mayor parte de los laboratorios de análisis de leche. Los resultados que se obtienen demuestran que estos gérmenes nunca aparecen en la leche correctamente pasteurizada, que ha dado prueba de fosfatasa negativa, excluyendo la recontaminación.

5.1.14 Toma de muestras para el análisis microbiológico

Cuando las muestras de leche se destinan a análisis de tipo microbiológicos, es necesario tomar una serie de precauciones que además de garantizar la obtención de muestras verdaderamente representativas, eviten la contaminación por fuentes externas y la proliferación de la carga bacteriana ya presente en los productos.

Entre esas precauciones destacan las siguientes:

a) Todos los equipos empleados en la toma de muestras deben encontrarse estériles y desinfectados antes de cada recolección. Por ejemplo, para el caso de los frascos para tomar muestras de leche cruda puede esterilizarse en una solución que contenga 250 a 500 ppm de cloro residual ("esterilización química") cuyo exceso se

elimina por enjuague en agua estéril a fin de evitar que el desinfectante contamine el producto, donde actuaría como inhibidor microbiano.

b) Recolectar porciones representativas (no menos de 500 ml) directamente de tanques, recipientes de transporte , envases al por menor.

c) Tomar además las precauciones señaladas para muestras destinada al análisis físico o químico (1:1) con el propósito de obtener, conservar e identificar muestras representativas, excepto en lo que se refiere a la adición de preservativos, los cuales solo pueden adicionarse para recuentos bacterianos por el método microscópico directo (0,08 % de formaldehído para un análisis a efectuarse dentro de las 36 horas que siguen a la recolección) pero nunca para otros exámenes microbiológicos (ROBINSON,1997).

5.1.15 Determinación de la calidad microbiológica en la leche cruda PINZON, 1995. en su trabajo anota que para el análisis de la leche cruda existen diferentes métodos que permiten medir de manera indirecta o directa su calidad sanitaria.

5.1.15.1 Método indirecto

Se fundamentan en la modificación de algunas propiedades por parte de los microorganismos. Dentro de este grupo están la determinación del sedimento (lacto filtración), temperatura, pH, acidez titulable, lacto fermentación y las pruebas de reducción de colorantes (azul de metileno, resazurina)

5.1.15.1.1 Sedimento: el sedimento obtenido por el método de lacto filtración mide la calidad sanitaria. La presencia de abundante partículas de sucio y su tipo (heces, insectos, tierra, restos de

alimentos), puede indicar el cuidado que se ha tenido durante el ordeño y almacenamiento de la leche cruda.

5.1.15.1.2 Lacto fermentación: esta prueba permite observar las características del coagulo obtenido de la fermentación de una muestra de leche incubada a temperatura ambiente (35-37 °C) por 24 horas. Según las características observadas se puede presumir acerca del tipo de bacterias predominantes, ya que un coagulo homogéneo sin o con pequeñas burbujas de gas, indicara predominio de bacterias lácticas homo fermentativas, por el contrario un coagulo grumoso con abundante gas puede indicar la presencia de bacterias coliformes.

5.1.15.1.3 Acidez Titulable y pH: ya se ha estudiado estas dos propiedades de la leche en el tema de físico químico. Esta claro que la fermentación microbiana modifica estos valores, aumentando la acidez y reduciendo el pH. Sin embargo hay que tener en cuenta que ciertos microorganismos proteo líticos pueden causar la coagulación dulce de la leche, es decir, sin acidez o con alcalinización de la leche.

5.1.15.1.4 Tiempo de reducción-TRAM-:esta prueba se fundamenta en como por el metabolismo microbiano hace variar el potencial de óxido reducción de la leche,para ello se utiliza como indicador el azul de metileno.

5.1.15.2 Método directo

Se fundamentan en determinar la presencia y/o el número de microorganismo en los alimentos. En el análisis de la leche cruda se emplean los siguientes:

5.1.15.2.1 Recuento Microscópico Directo: el recuento microscópico directo es una técnica que tiene poco uso en el análisis de la leche

cruda. En el se analiza un frotis de una muestra diluida la cual se colorea con un colorante especial (Newman Lambert), y se hace recuento de las células bacterianas observadas en varios campos. El promedio del conteo se multiplica con el factor del microscopio (valor relacionado al área del frotis, el diámetro del objetivo y la dilución de la muestra) para obtener el número de bacterias por mililitro de muestra. Se debe tener en cuenta que en el conteo intervienen las células vivas y las muertas.

5.1.15.2.2 Recuento Estándar en Placa (REP): también conocido como recuento de aerobios mesófilos, es el análisis directo mayormente empleado para determinar la calidad microbiológica de la leche y otros alimentos. El método consiste en hacer diluciones de la muestra y sembrar en placas de petri con agar estándar; luego de 24 a 48 horas de incubación a $37 \pm$ se cuentan las colonias observadas las cuales permiten obtener el número de unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo de muestra (ufc/mL o ufc/g). Los resultados obtenidos siempre son inferiores a los reportados con el recuento directo, ya que aquí solo intervienen microorganismos vivos capaces de formar colonias, además una colonia puede estar originada por uno o más de una unidad formadora de colonias.

5.1.15.2.3 Recuento de Bacterias Termodúricas, Termófilas, Psicrófilas: cuando se desea determinar los tipos microbianos presentes en la leche se utilizan análisis específicos. Usando el método del REP pero variando la temperatura de incubación se pueden seleccionar los diferentes grupos de bacterias según su temperatura optima de crecimiento.

5.1.15.2.4 Coliformes Totales, Coliformes Fecales, Número mas Probable (NMP): en los apartes anteriores ya se discutió la importancia del estudio de las bacterias del grupo coliforme. Su determinación puede hacerse en placas con agar rojo bilis cristal violeta (coliformes totales) o en tubos con caldo verde brillante (NMP), donde además se puede observar la acumulación de gas.

5.1.15.3 Pruebas Específicas (Determinación de *Salmonelas*, *Staphylococcus*): ciertas especies bacterianas tienen especial interés en alimentos, especialmente por su poder patógeno. En leche en polvo se exige la determinación de Salmoneras y en productos lácteos es conveniente hacer determinaciones de estafilococos específicamente *Staphylococcus aureus*.

Además de los análisis mencionados anteriormente existen otros especiales que se relacionan con la calidad sanitaria.

5.1.16 Tiempo de Reducción de Azul de Metileno

Continuando con las pruebas para evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda, se analizará el tiempo de reducción de azul de metileno "TRAM" antiguamente llamado Reductasa.

Para explicar mejor los fundamentos de esta prueba, se inicia con el procedimiento que se usa para su montaje:

En un tubo se vierten 10 c.c de leche a examinar y se agrega 1 c.c. de una solución estandarizada de Azul de metileno. Inmediatamente la mezcla se torna azul, el tubo se coloca en un baño de agua a 37 °C y se inicia el control del tiempo con lecturas cada 30 minutos; cuando el tubo cambie de color a blanco. Anotando el tiempo que demoró este cambio y el resultado se expresa en horas o fracción de media

Cada media hora se revisan los tubos y cuando haya cambiado de color de azul a blanco se determina el tiempo que demoró este cambio y se expresa en horas o fracción de media.

Para explicar esta reacción es necesario hacer las siguientes consideraciones:

* El colorante azul de metileno el cual es un indicador de oxido-reducción, es azul cuando está oxidado e incoloro cuando está reducido.

* Varias especies de bacterias, no todas las que pueden contaminar la leche, tienen la capacidad de secuestrar el oxígeno presente en el medio y por lo tanto generar la reducción del azul de metileno con la consecuente pérdida del tono azul.

* Básicamente la velocidad con la cual se reduce el azul de metileno depende del número de microorganismos que tienen el efecto reductor, es decir que a mayor número de bacterias con esa propiedad, menor será el tiempo necesario para que se produzca el cambio de color en el tubo. Esto es lo que comúnmente se describe en bacteriología como un recuento metabólico indirecto.

Internacionalmente la tabla de interpretación del TRAM se relaciona con las siguientes recuentos de bacterias /mL.

Tabla 1. Interpretación del TRAM

TRAM (minutos)	No Bacterias /mL.
< 30 minutos	20 - 30 millones
30 min - 2 horas	4 - 20 millones
2 - 6 horas	0,5 - 4 millones
> 6 horas	< 500.000

Como se puede ver en la tabla las variaciones pueden ser de número de bacterias para determinado rango de variación es muy variable, razón por la cual la prueba a nivel mundial ha perdido aplicación como elemento para medir el número de bacterias.

A lo anterior se suma el hecho de que un gran número de bacterias que hacen parte de la contaminación de la leche durante el ordeño tienen poca actividad reductora del azul de metileno y los números de bacterias para un determinado TRAM se ven incrementado en forma muy significativa, en aquellos ordeños donde las practicas de higiene son deficientes.

En la investigación consignada en la tesis de grado de la Universidad Javeriana "Actividad de microorganismos en leches crudas de la sabana de Bogotá y su relación con la prueba TRAM" bajo la dirección de Blanca Cecilia Gaviria, donde se examinaron 397 muestras de leche para prueba de acidez , TRAM , Recuento de bacterias mesófilas Aerobias y Recuento de Termodúricos, que llegaron a una planta pasteurizadora en la sabana de Bogotá se muestran variaciones mas amplias con relación a la tabla estandarizada . Los hallazgos en esta investigación muestran la siguiente tabla:

TRAM (minutos)	Rcto. Mesófilos aeróbios (UFC)
< 30 min	> 600 millones
30 min - 1 hora	100 - 600 millones
1 - 2 horas	25 - 100 millones
2 - 3 horas	10 - 25 millones
3 - 4 horas	5 - 10 millones
4 - 5 horas	3 - 5 millones
5 - 6 horas	2 - 3 millones
6 - 7 horas	1.5 - 2 millones
7 - 8 horas	1 - 1.5 millones
8 - 9 horas	800.000 - 1 millón

Como se puede observar mientras que en la tabla internacional, 6 horas de TRAM significan menos de 500.000, en nuestro medio ese

mismo tiempo corresponde aproximadamente a 2 millones de bacterias. Estas grandes diferencias se originan en la diversidad de fuentes de contaminación a que se ve sometida la leche cuando fallan las prácticas de higiene y se facilita la contaminación con microorganismos provenientes del intestino de los animales, que en general tienen muy poca actividad reductora, comparativamente con bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* que son habitantes normales de la glándula mamaria y que a través de ella pueden llegar a la leche.

Basados en la actividad metabólica de los diferentes microorganismos que pueden contaminar la leche, la prueba TRAM puede castigar leches que tienen poca contaminación ambiental pero con presencia de bacterias con gran capacidad reductora, como las mencionadas, y de otra parte favorecer al leches con alto número de bacterias contaminantes ambientales producto de ordeños antihigiénicos pero que demoran mucho en reducir el azul de metileno.

Otra razón para tener largo tiempo de TRAM frente a un alto número de bacterias es, que la leche examinada contenga sustancias que inhiban el crecimiento bacteriano, por ejemplo, preservantes químicos o antibióticos, compuestos que cuando se está haciendo el Recuento en Placa, por el factor de dilución a que se somete la muestra, pierden actividad o capacidad inhibitoria.

El hecho de tener cortos tiempos de TRAM y Recuentos bajos de bacterias, es posible cuando varias células bacterianas se encuentran agrupadas y una Colonia (UFC) es el resultado de uno de estos grupos o de una sola célula. Por esto en los recuentos de Bacterias Mesófilas se usa el término Unidades Formadoras de

Colonia (UFC). En la Prueba de TRAM el hecho de que las bacterias estén agrupadas o separadas no influye porque independientemente cada célula cumple su acción metabólica.

Por todas las razones que se han comentado, la prueba TRAM tiene muy poca capacidad para evaluar el número real de microorganismos presentes en leche cruda, y es así como cada día es menos utilizada en la industria para tal efecto. Si el Acuerdo de Competitividad existente en Colombia contempló esta posibilidad como criterio de calidad higiénica, se debe a las limitantes que existen en muchas regiones del país para implementar los Recuento de Bacterias viables, pero como el mismo Acuerdo lo contempla se hace necesario que en poco tiempo se cambie a los recuentos viables como ya se hace por parte de muchas plantas procesadoras en diferentes partes del país. Ojalá que este tránsito se haga en el menor tiempo posible.

5.2 MARCO LEGAL

Para la realización de este trabajo se tomaron como referentes para el análisis de los resultados, los Decretos números 616 del 28 de febrero de 2006 y el 2838 del 24 de agosto del 2006 emanados por el Ministerio de la Protección Social. en los cuales se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, expendia, importe o exporte en el País.

6. METODOLOGÍA

6.1. LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA

El proyecto de investigación se realizó en la zona urbana del municipio de Popayán, con una altura sobre el nivel del mar de 1750 mts. en terrenos con topografía suave. La temperatura anual promedio varía entre 16° y 20° C y la precipitación entre 2000 y 2300 mm. (POT. Municipio de Popayán, 2002).



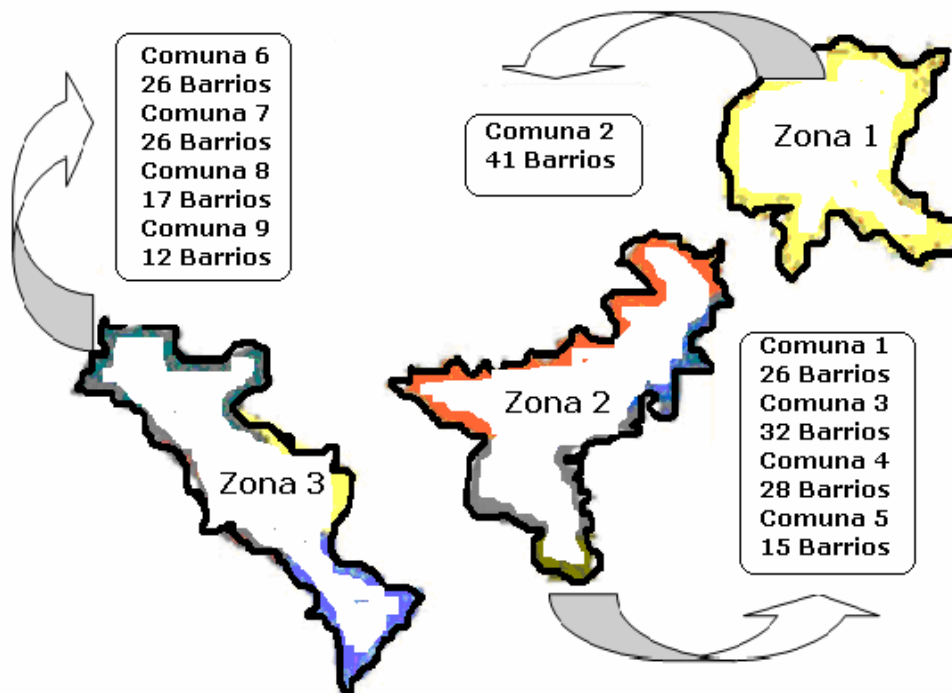
FUENTE: P.O.T. 2002

Mapa 1. Zona Urbana del Municipio de Popayán

6.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para este estudio y determinar realmente las condiciones en particular que se encuentra la leche en el momento de la comercialización al consumidor, se tomaron aleatoriamente 30 muestras de leche cruda esto en razón de que no es fácil determinar el total de minoristas que existen en la ciudad, ya que los mayoristas venden la leche a todo aquel que llega con una tina o recipiente sea cliente frecuente o no el cual recorre la ciudad vendiendo el producto en bicicletas, motos, triciclos o en forma ambulante, así mismo y al azar en tiendas expendios autorizados de las diferentes leches pasterizadas mas representativas para un total de 10 muestras en dos muestreos.

6.3. ZONAS DE MUESTREO



Mapa 2. Zonas por comunas para toma de muestras

Teniendo en cuenta que la zona urbana del municipio de Popayán, esta dividida en 9 comunas se han determinado 3 zonas definidas de acuerdo al tamaño de las mismas por barrios y numero de habitantes. (POT 2002)

El trabajo de campo se realizo durante mes de agosto del 2006, con el fin de evaluar la carga bacteriana se tomaron muestras de leche cruda en horas diferentes para este caso entre las 8 y 10 de la mañana, para la leche pasteurizada en tiendas y puntos de venta autorizados determinando en estos la cadena de frío.

Para recolectar muestras de leche cruda se tomaron directamente de los recipientes que en forma minoritaria se vende a los consumidores.

Para leches pasteurizadas se tomo la muestra de la bolsa, con el fin de diferenciarlas de las muestras de leche cruda se determino marcar estas muestras con letras.(A,B,C,D,E) Cualquiera que sea el caso, una vez obtenida la muestra se transfiere a un frasco estéril y se conserva de acuerdo a lo indicado en las instrucciones generales.

6.4.DETERMINACIÓN DE BACTERIAS MESOFILAS EN LA LECHE

Cuando se habla del tema de cómo determinar la Calidad Microbiológica de la Leche Cruda, se trata las diferentes clases de Recuentos de Bacterias haciendo énfasis en el Recuento de *Bacterias Mesófilas Aerobias*, el cual es considerado como la "prueba de oro" para evaluar la calidad higiénica de la leche.

La leche tiene múltiples fuentes de contaminación:

- ☛ La ubre sana que en condiciones normales puede aportar hasta 1.000 microorganismos / ml

☛ La ubre con mastitis donde dependiendo del microorganismo que la cause, un solo cuarto afectado mezclado con la leche de 99 sanos, puede incrementar el recuento hasta de 100.000 bacterias en la leche del hato.

☛ La contaminación ambiental durante el ordeño, producto de deficientes prácticas de manejo, permite que microorganismos de la piel de los pezones, manos del ordeñador, pezoneras, equipos de ordeño, baldes y todo el entorno del ordeño, lleguen a la leche. Esta es la fuente de contaminación más importante y variable, ya que aporta un gran número de microorganismos con diferentes propiedades microbiológicas.

A la contaminación inicial de la leche debe sumarse la multiplicación que sufren las bacterias, debido a que esta es un excelente Medio de Cultivo para la mayoría de los microorganismos.

Algunos ejemplos en el siguiente cuadro permiten explicarlo:

Cuadro 13. Tiempos de duplicación de bacterias presentes en la leche cruda

GRADOS CENTIGRADOS	TIEMPO
30° C	30 minutos
20° C	50 minutos
10° c	4 horas
3° C	12 horas

FUENTE: THOMAS, S.B..1994.

Esto explica y justifica, la importancia que tiene la refrigeración entre 3 y 5 °C para la conservación de la leche cruda.

En la leche cruda se encuentran microorganismos con diversas características metabólicas donde los grupos más importantes son las *Bacterias Mesófilas Aerobias* las cuales conforman el grupo más amplio y es el que se aplica como criterio de calidad en la leche cruda y se usa como base para las bonificaciones o sanciones.

Provee la mayor información sobre la calidad higiénica de un producto. Es mal llamado, Recuento Total de Bacterias, ya que muchos otros tipos de bacterias no quedan incluidas, porque sus rangos de temperatura óptima de crecimiento son diferentes o el oxígeno les es inhibitorio. Como la lectura se hace contando el número de colonias que aparece en la placa, como producto de la multiplicación a partir de una sola célula bacteriana o de un grupo de ellas, el resultado se expresa en unidades formadoras de colonia U.F.C. / ml.

Aunque las normas internacionales fijan que la leche cruda debe tener menos de 100.000 UFC/ml de este grupo, la Industria quiere y bonifica leches con un menor número de bacterias y es así como los mejores precios están para leches que tienen menos de 30.000 UFC/ml.

Parecería utópico pensar que leches con estas cifras, fueran posibles en el mercado colombiano, pero existen hatos que entregan leches con menos de 20.000 y aún menos de 10.000 UFC/ml, indicando que es factible hacerlo cuando se aplican unas buenas prácticas de manejo en el proceso de ordeño y acopio de la leche.

6.4.1. Recuento estándar en placas de agar (Recuento de aerobios Mesófilos)

El recuento estándar en placas (REP) o recuento de aerobios mesófilos, es un método macroscópico, empírico, universalmente utilizado para determinar en forma aproximada la carga bacteriana. Esencialmente consiste en determinar el número de colonias que se desarrollan cuando se siembra una cantidad medida o pesada de muestras, en placas de agar de composición estándar preparadas

bajo condiciones estipuladas, a objeto de obtener reproductividad en los resultados en diferentes laboratorios.

Antes de la siembra, la muestra se prepara para asegurar su homogeneidad, dispersar los grumos de bacterias y distribuirlas uniformemente. Esto se logra por agitación bajo condiciones especiales. Luego, la muestra se diluye por lo menos dos veces (1:10 y 1:1000) con agua amortiguada (amortiguador de fosfato) en botella especiales que se agitan con la muestra. Seguidamente, con pipetas esterilizadas de 1,1 mL, se transfieren 0,1 y 1,0 mL de cada dilución a placas de Petri estériles, donde se mezclan con 10-12 mL de agar estándar fundido a 45°C. Una vez solidificado el agar, las placas se incuban invertidas a 32 o 35°C por 48 ± 3 horas y finalmente se cuentan aquellas placas que presentan entre 30 y 300 colonias (25 a 250 según las nuevas normas de la APHA). Multiplicando el número de colonias de una placa, aproximadamente hasta el segundo dígito, por la dilución correspondiente, se obtiene el número aproximado de bacterias que se desarrollan a partir de 1 mL o g de muestra, el cual se expresa como recuento total en placas.

Los resultados obtenidos por este método permiten establecer la calidad sanitaria de la leche.

Este método puede aplicarse tanto a la leche y derivados fluidos como a los productos lácteos semisólidos o sólidos, variando fundamentalmente el procedimiento de preparación de las diferentes muestras y de la primera dilución. Particularmente en los productos sólidos es necesario pesar la muestra directamente sobre una botella de dilución bajo condiciones asépticas.

6.5 MATERIALES Y EQUIPOS

- ❖ Pipetas de 1,1 y 11 mL.
- ❖ Botellas de dilución (180 mL) graduadas a 99 ± 1 mL con tapas de rosca.
- ❖ Mechero de Bunsen.
- ❖ Placas de Petri 100 * 15 mm, de vidrio o plástico.
- ❖ Baño termoregulado ($45 \pm 1^\circ\text{C}$).
- ❖ Estufa de incubación 32 o $35 \pm 1^\circ\text{C}$.
- ❖ Contador de colonias, tipo Québec, de campo oscuro.
- ❖ Balanza 500g, de sensibilidad recíproca de 53g.
- ❖ Equipos comunes para preparación de medios de cultivo

6.5.1 Reactivos y medios de cultivo

- ❖ ("Estándar Methods AHPA").
- ❖ Glucosa (Dextrosa).1 g.
- ❖ Agar, grado de bacteriológico 15 g.
- ❖ Agua destilada.1000 mL PH 7,0 +/- 0,1
- ❖ Azul de metileno grado bacteriológico

6.5.2 Muestras

- ❖ Leche cruda
- ❖ Leches pasteurizadas de diversas marcas

6.5.3.Procedimiento

6.5.3.1 Limpieza y esterilización del materia de vidrio.

a)Limpiar las botellas de dilución, tubos de ensayo, placas de Petri, pipetas y demás material de vidrio sucesivamente con agua jabonosa tibia, agua del grifo y agua destilada. El material de vidrio, específicamente las pipetas, deben mantenerse sumergidos en agua de grifo hasta el momento de la limpieza y periódicamente

debe sumergirse en mezcla sulfocromica. Después del lavado, el material debe escurrirse, secarse y protegerse del polvo.

b) Esterilizar el material de vidrio limpio y seco. Para ello las pipetas se colocan en estuches metálicos que se llenan solamente hasta 2/3 de su capacidad, o bien se envuelven en papel. La boca de los frascos de vidrio se tapan con algodón y encima se recubren con papel que se fija al cuello con hilo o liga. El horno no debe llenarse en forma excesiva y su temperatura debe mantenerse por encima de 160°C . La esterilización se obtiene por calentamiento a 170°C durante 2 horas. El material esterilizado debe conservarse en gabinetes adecuados, protegidos del polvo y la humedad.

6.5.3.2 Preparación y esterilización del medio de cultivo en autoclave:

a) Disolver el medio deshidratado o los ingredientes del mismo, en 500 mL de agua en un recipiente de vidrio o acero inoxidable. Aplicar agitación ocasional durante 3-5 minutos, seguida de calentamiento. Ajustar el pH, si es necesario, a 7,0 +/- 0,1, haciendo las mediciones con un potenciómetro a 45°C.

b) Diluir hasta 1000 mL a 20°C.

c) Distribuir el medio en frascos (120 mL) o en tubos (10-12 mL) y taparlos con algodón.

d) Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos y conservar al abrigo del polvo y humedad.

6.5.3.3 Identificación de las diluciones y placas:

a) Antes de hacer las diluciones de la (s) muestra (s) se deben colocar en orden sobre el mesón perfectamente horizontal y cerca del mechero encendido, se requieren de 2 blancos de dilución y 4

placas de Petri por cada muestra a analizar. A veces se utilizan una quinta placa para sembrar la muestra no diluida.

b). Rotular las botellas con la dilución a obtener, por ejemplo 1:10 (1:10¹ o 10⁻¹) y 1:1000 (1:10³ o 10⁻³). Rotular las placas indicando el número de la muestra, la dilución que se ha de sembrar, la fecha y hora de la siembra.

6.5.3.4 Preparación de la muestra y diluciones:

a). El tiempo empleado entre la dilución de la primera muestra y la siembra de la última placa de una serie, no debe ser superior a 20 minutos. Por lo tanto, el trabajo debe planificarse de modo que se ajuste a esta condición.

b). Mezclar la muestra en forma completa y vigorosa hasta homogeneizarla bien. Además, inmediatamente antes de transferir un volumen de muestra o dilución, agitar el frasco 25 veces en 7 segundos, con movimientos de vaivén vertical de aproximadamente 30 cm.

c). Preparar una dilución 1:10 (10⁻¹). Para ello, con pipeta estéril, transferir 11 mL de leche a un blanco de dilución (99 mL). La operación debe hacerse introduciendo la punta de la pipeta en la muestra no más de 1,5-2,5 cm para evitar succionar aire o espuma, tocando con ella la parte inferior interna del frasco y ajustando el volumen a medir hasta la señal (11 mL) de manera que se mantengan un ángulo de 45° entre la pipeta y la normal. Descargar el volumen medido en el blanco de dilución rotulado, tocando con la punta la parte inferior del cuello, dejando caer el líquido durante 2-3 segundos y tocando luego una sola vez un punto seco en el vidrio, sin soplar la última gota.

d). Preparar una dilución 1:1000 (10-3) transfiriendo, con pipeta estéril, 1 mL de la dilución 1:10 (10-1) a un segundo blanco de dilución rotulado, siguiendo la misma técnica anterior.

e). Si es necesario, se pueden continuar haciendo diluciones en la misma forma anterior.

6.5.3.5 Siembra e incubación de las placas:

a). Colocar los frascos o tubos conteniendo el medio de cultivo en un baño María hirviendo para fundirlo. Esta operación debe hacerse sin emplear más medio del que pueda utilizar en un espacio de 3 horas, evitando su exposición prolongada a temperaturas excesivamente altas durante y después de la fusión. Una vez fundido el medio, mantenerlo en baño María o incubadora a $45 \pm 1^\circ\text{C}$, controlando la temperatura con un termómetro que se introduce en un frasco o tubo similar a los del medio, pero conteniendo agua.

b). Utilizando una pipeta estéril de 1,1 mL, transferir 0,1 mL y 1 mL de la primera dilución (10-1) a las placas correspondientes, debidamente rotuladas (10-2 y 10-1). Esta operación debe hacerse manteniendo la pipeta de manera que forme un ángulo de 45° , levantando la tapa de la placa solo lo suficiente para introducir la punta de la pipeta, tocando el fondo de la placa durante la descarga y luego levantando la pipeta sin tocar otra área seca de la placa.

c). Con una nueva pipeta estéril, repetir la operación anterior transfiriendo 0,1 y 1,0 mL de la siguiente dilución (10-3) a las placas rotuladas (10-4 y 10-3). Continuar con las siguientes diluciones en la misma forma, en caso de que se hayan preparado.

d). Verter 10-12 mL del medio de cultivo fundido ($45 \pm 1^\circ\text{C}$) en cada placa de Petri, flameando la boca del recipiente antes de la adición. En cada caso mezclar completamente el medio con las

porciones líquidas previamente colocadas, haciendo girar la placa primero en una dirección y luego en la opuesta, evitando derramar la mezcla por los bordes y dejando solidificarse sobre una superficie nivelada (5-10 minutos).

e). Es conveniente preparar un control de esterilidad utilizando 1 mL de agua de dilución a fin de verificar la asepsia del proceso y la esterilidad del medio y demás materiales empleados.

f). Llevar las placas solidificadas a la incubadora (35°C) en forma invertida, donde deben distribuirse en pilas de no más de 6 placas, separadas entre sí por lo menos 2,5 cm. Mantener la incubación durante 48 ± 3 horas en condiciones de humedad relativa normal. La pérdida de peso del medio durante las 48 horas de incubación no debe ser superior al 15 %.

6.5.3.6 Selección de las placas y recuento de las colonias:

a). Después del periodo de incubación, seleccionar aquellas que presentan de 30 a 300 colonias no difusas.

b) Contar las colonias con ayuda de amplificación, preferiblemente con un contador de colonias tipo Québec de campo oscuro, provisto de una placa guía marcada en centímetros cuadrados. Deben contarse las colonias incluyendo las puntiformes, que no deben confundirse con partículas de medio no disueltas o sustancias precipitadas.

c). Multiplicar el número total de colonias por el recíproco de la dilución correspondiente, haciendo la aproximación hasta el segundo dígito que se sigue de tantos ceros como sean necesarios para indicar la dilución correcta. Por ejemplo, si el conteo de una placa cuya dilución es de 10^{-3} muestra el desarrollo de 128 colonias, el resultado se expresará "Recuento estándar en placas

por mL = 130.000". No deben expresarse los resultados como "numero de bacterias por mL".(PINZON,1995)

d). Cuando se preparan placas de la misma dilución en duplicado, se debe tomar el promedio de los recuentos obtenidos. Si solo una de las placas presenta 30-300 colonias, debe promediarse ese resultado con el otro aunque se salga de dichos valores.

e) .Cuando se observa ausencia de placas con 30-300 colonias, se debe contar aquella cuyo recuento se aproximan más a 300 colonias.

f).Si él número de colonias observado es excesivamente alto y por lo tanto difícil de contar, se puede calcular contando solamente 13 cuadros (centímetros cuadrados) representativos diferentes y multiplicando el resultado por el factor 5. Si él número de colonias por centímetros cuadrados es mayor de 10, se pueden contar solamente las colonias presentes en 5 cuadros y multiplicar el resultado por 13.

g).Cuando ninguna placa presenta mas de 30 colonias, se debe contar aquellas de menor dilución señalándose como menos de 30 veces la dilución correspondiente; así, en el caso de la dilución 10-2, el resultado se expresará "Recuento estándar en placas = menos de 3.000".

h) Si se observan colonias difusas, el recuento total puede estimarse contando áreas representativas bien distribuidas pero libres de dichas colonias. Sin embargo esto solo puede hacerse cuando el área cubierta por esas colonias no es superior a la mitad de la placa.

6.6 OBSERVACIONES

Existen diferentes métodos menos costosos y más rápidos que el recuento estándar en placas para la determinación del número de gérmenes viables en la leche y derivados. Estos métodos, aunque relativamente menos exactos, entre ellos se encuentran el método del tubo ovalado, el método de la siembra en placa con asa calibradas, el método de la microplaca y el método del tubo rotatorio. Pueden emplearse técnicas aun más sencillas pero que permiten obtener cierta información cualitativa, como son el método de la tira de papel impregnada con medio de cultivos ("Bactostrip"). (PINZON,1995)

7.RESULTADOS

De acuerdo a los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados podemos determinar a grandes rasgos las condiciones en que al llegar a los consumidores se encuentran las leches cruda y pasteurizada que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de Popayán.

Para un mejor interpretación de los de los mismos a través de los siguientes gráficos vamos a reflejar los resultados teniendo en cuenta las tablas con valores determinados en el Decreto 616 del 28 de Febrero del año 2006 y el Decreto 2838 del 24 de Agosto de 2006 expedidos por el Gobierno Nacional y así como la revisión de literatura.

Tabla 2. Características de la leche cruda

PARÁMETRO/UNIDAD	LECHE CRUDA	
Grasa % m / v mínimo	3.00	
Extracto seco total % m / m mínimo	11.30	
Extracto seco desengrasado % m / m mínimo	8.30	
	Min.	Max.
Densidad 15/15°C g/ml	1.030	1.033
Índice Lactométrico	8.40	
Acidez expresado como ácido láctico %m/v	0.13	0.17
Índice °C crioscópico °H	-0.530	-0.510

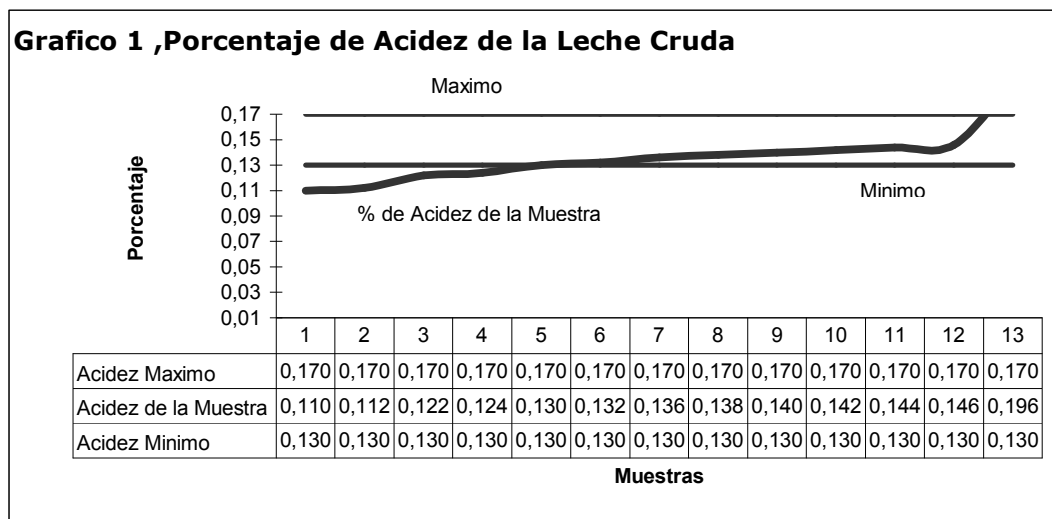
FUENTE:DECRETO 616 DE 2006

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la leche entera

Parámetros	Pasteurizada		Ultrapasteurizada		UTH	
Grasa % m/v mínimo	3.0		3.0		3.0	
Extracto seco total % m/m mínimo	11.30		11.20		11.20	
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8.30		8.20		8.20	
Peroxidasa	Positiva		Negativa		Negativa	
Fosfatasa	Negativa		Negativa		Negativa	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Densidad 15/15°C g/ml	1.030	1.033	1.0295	1.0330	1.0295	1.0330
Acidez expresado como ácido láctico %m/v	0.13	0.17	0.13	0.17	0.13	0.17

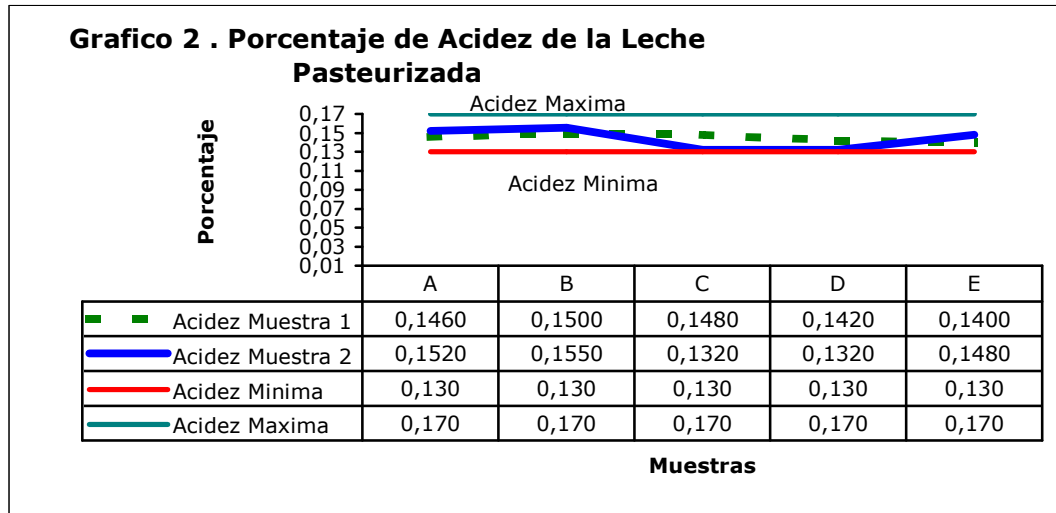
FUENTE: DECRETO 616 DE 2006

1. Acidez de la leche



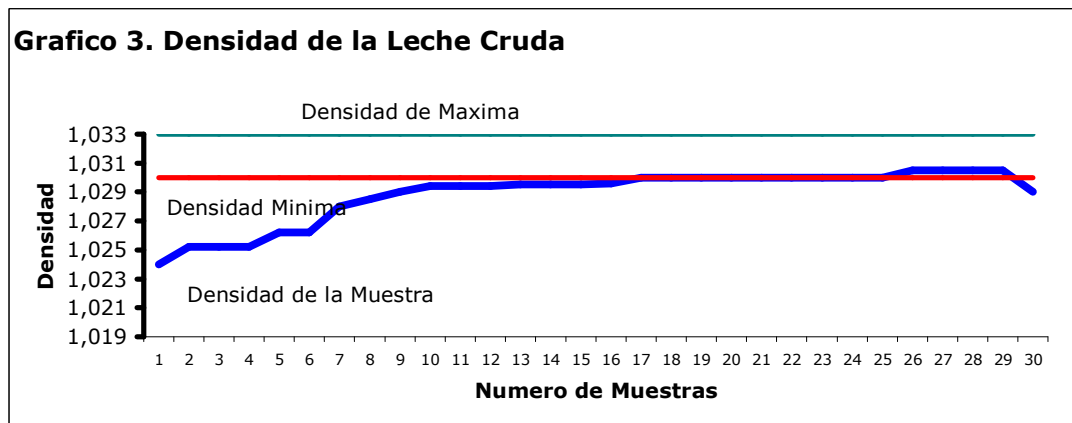
En el estudio se determinaron 13 rangos de acidez iguales en las 30 muestras analizadas, de las cuales 10 estaban debajo del rango

mínimo de Acidez el cual esta establecido en 0.130,19 dentro del rango promedio de 0.130 y 0.170 y solo 1 muestra estuvo fuera del rango máximo de 0.170



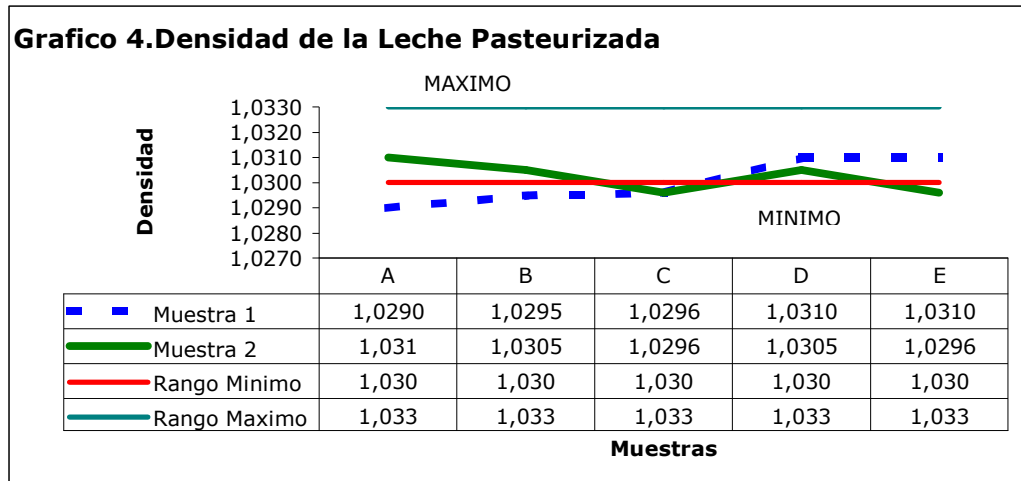
A diferencia de la leche cruda se pudo determinar que para la leche pasteurizada los valores que arrojaron las muestras se encontraron dentro de los rangos establecidos en la norma.

2.Densidad



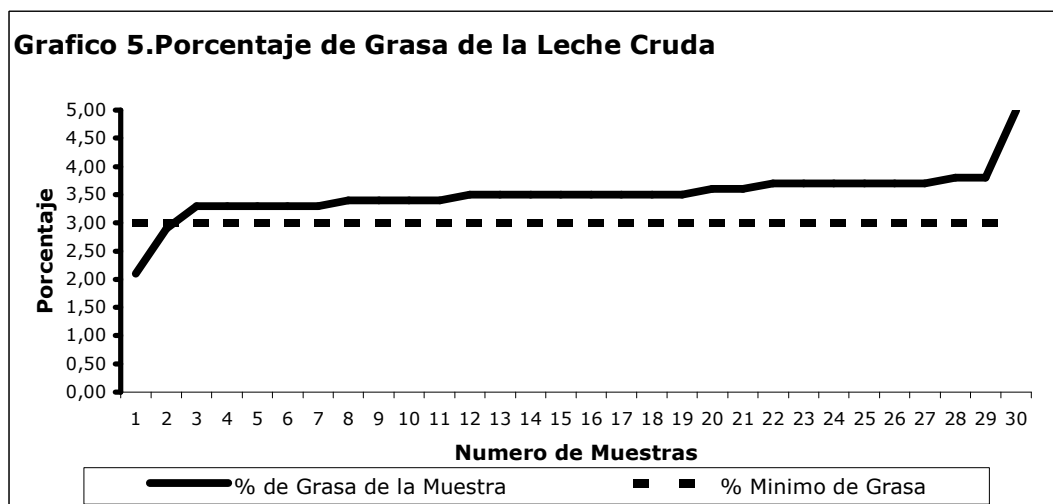
Como se puede observar en el grafico anterior la densidad de la leche cruda de acuerdo a los parámetros establecidos 13 muestras

están por debajo de los mismos que la norma establece que es de 1.030 mínimo a 1.033 máximo y 17 muestras están dentro del rango establecido para tal fin.



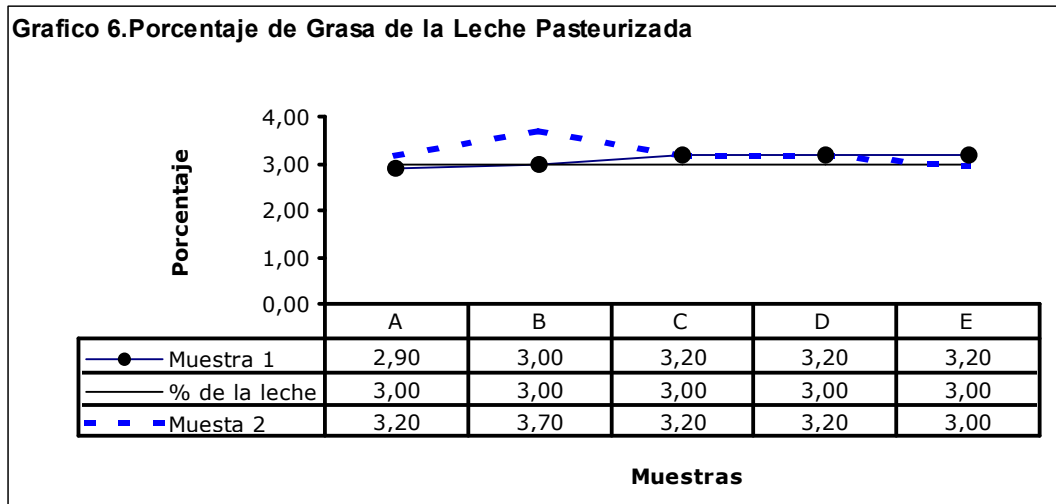
En cuanto a la leche pasteurizada se puede notar que se aproxima en la mayoría de las muestras a lo requerido en la norma

3. Materia Grasa



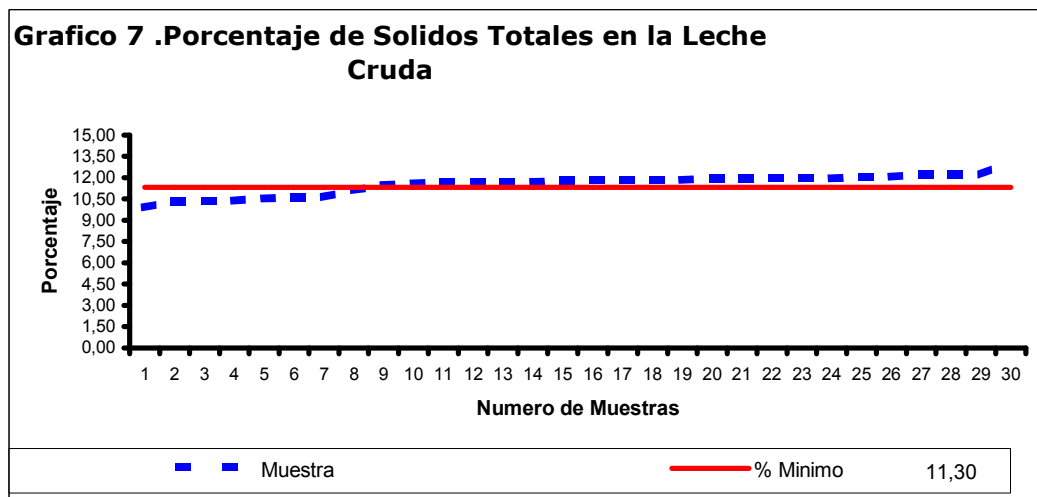
En este grafico puede apreciar que un total de 2 muestras no tienen el porcentaje de grasa mínimo para las leches crudas que es de 3.00, pero también puede observarse que hay una muestra cuyo

valor es de 5.00, para las demás cumplen con el requerimiento mínimo



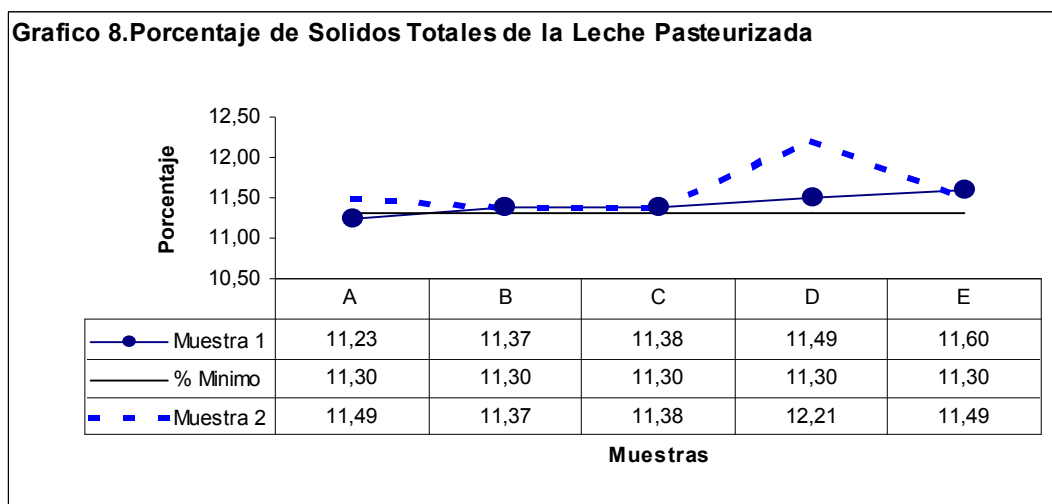
Como se puede notar el porcentaje de grasa de la mayoría de las muestras de leche pasteurizada esta por encima del limite requerido por la norma solo la muestra 1A no cumple con el mínimo solicitado que es del 3 %

4. Sólidos Totales (Extracto Seco Total)



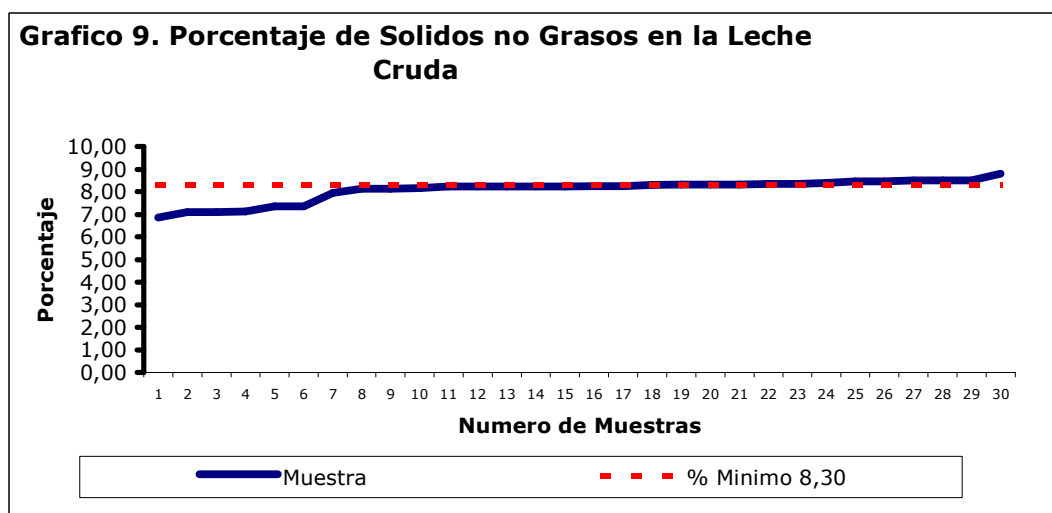
Teniendo en cuenta que el porcentaje de sólidos totales requeridos para la leche cruda es de 11.30 %, en este resultado , de un total de

30 muestras solo 8 de las mismas no cumplieron con el valor mínimo requerido en la norma.

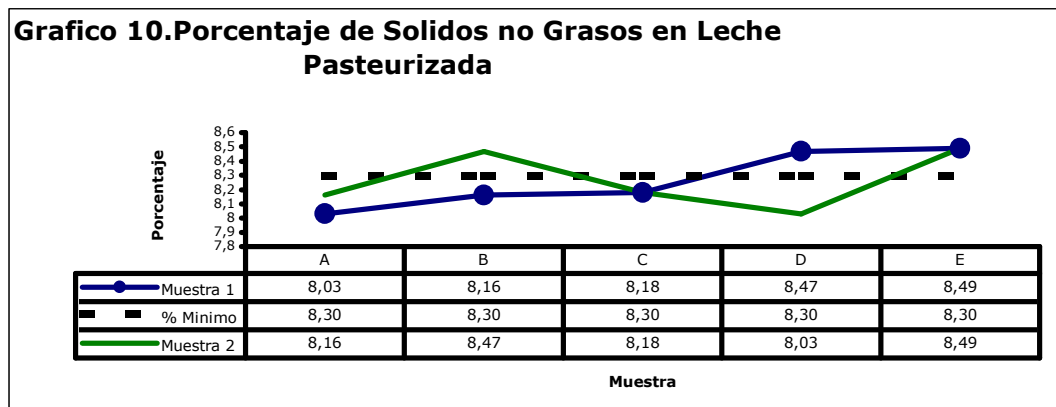


El total de sólidos totales en cuanto a la leche pasterizada solo la muestra 1A no cumple con porcentaje mínimo requerido para esta determinación.

5. Sólidos no grasos (Extracto seco desengrasado)



Como se puede notar la línea de tendencia esta de la muestra esta casi paralela lo que denota que estas leches están en el límite exigido por la norma en cuanto a la grasa se refiere, 7 muestras analizadas arrojaron un valor menor a 8.30.



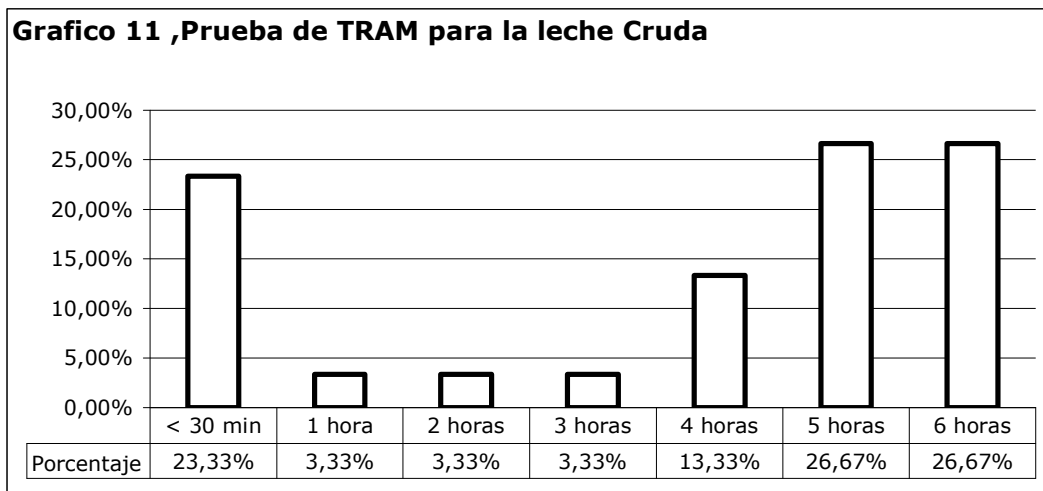
Para este caso el número de muestras del total analizado más del 50% no arrojaron el resultado del 8.30 que considera la norma deben tener las leches pasteurizadas.

6. Tiempo de Reducción de Azul de Metileno-TRAM

Teniendo en cuenta los tiempos resultantes de la prueba se recomienda de acuerdo a normas internacionales clasificar el producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables, en base a los siguientes valores:

Tabla 4. Clasificación de la leche de acuerdo a la prueba TRAM

Buena a excelente	más de 8 horas
Regular a buena	6 - 8 horas
Aceptable	2 - 6 horas
Mala	menos de 2 horas

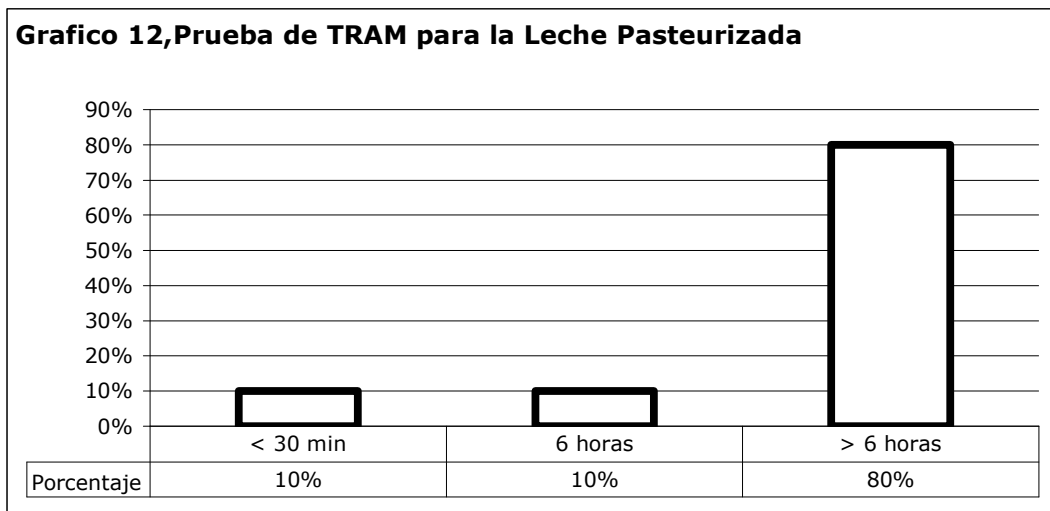


De acuerdo a resultados de una de las pruebas que ayudan a determinar la Calidad Higiénica de la leche cruda y en concordancia a la tabla 5 podemos determinar que:

Tabla 5.Resultado de la prueba TRAM para leche Cruda

Característica	Tiempo	Cantidad de Muestras	Porcentaje
Buena a excelente	más de 8 horas	0	0
Regular a buena	6 - 8 horas	0	0
Aceptable	2 - 6 horas	22	73.34 %
Mala	menos de 2 horas	8	26.66 %

De acuerdo al análisis anterior podemos decir que el 73.34% de las muestras son aceptables, esto no determina en ningún caso que el producto sea recomendable consumir ya de acuerdo a la Tabla 1 de Interpretación del TRAM estas leches pueden contener de 500.000 a 4.000.000 millones de bacterias por mililitro.



El los resultados de la prueba TRAM para las leches pasteurizadas podemos determinar lo siguiente.

Tabla 6. Resultado de la prueba TRAM para leche Pasteurizada

Característica	Tiempo	Cantidad de Muestras	Porcentaje
Buena a excelente	más de 8 horas	8	80%
Regular a buena	6 - 8 horas	1	10%
Aceptable	2 - 6 horas	0	0
Mala	menos de 2 horas	1	10%

Con los resultados anteriores podemos determinar que el 80% de las muestras de leches pasteurizadas son aptas para su consumo.

7. Recuento Total Mesofilos (UFC)

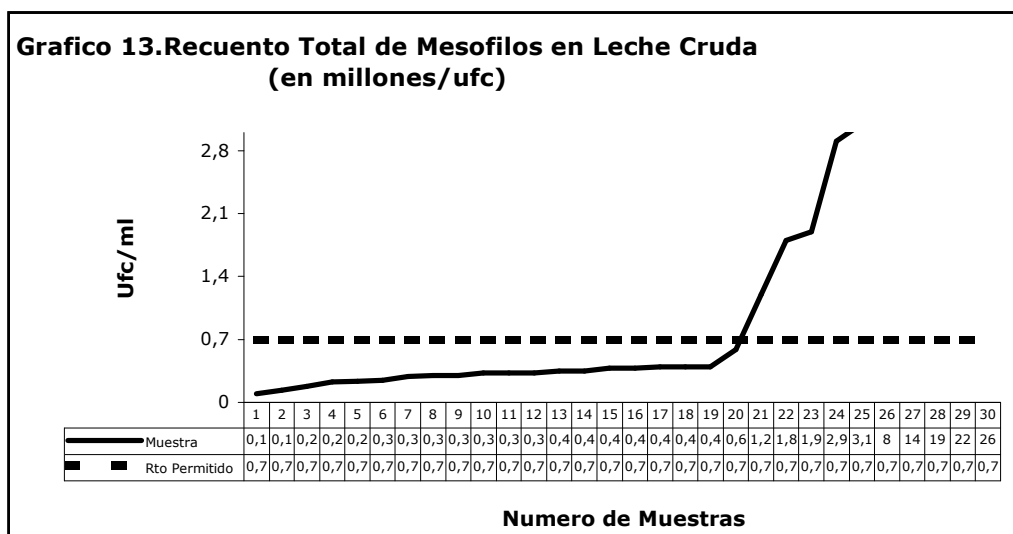
El Gobierno Nacional expidió del Decreto 2838 de fecha 24 de agosto de 2006 en donde fijo el recuento de mesofilos para la leche cruda así:

El Artículo 12 fija las siguientes características para la leche cruda para consumo humano la cual debe cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos

Tabla 7.requisitos microbiológicos

INDICE PERMISIBLE	UNIDADES
Recuento de mesófilos aeróbios ufc/ ml	700.000

FUENTE:DECRETO 2838 DE 2006

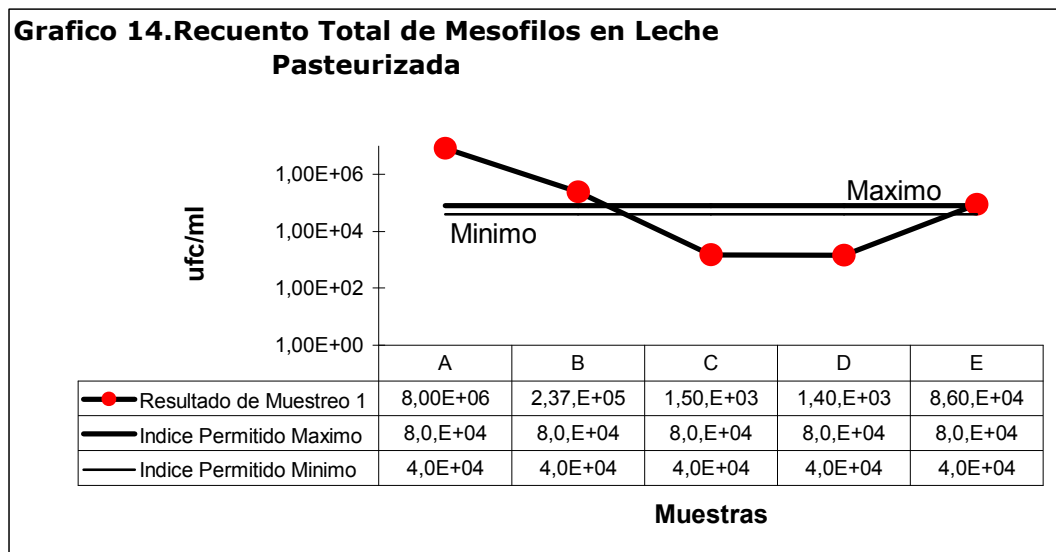


De acuerdo al grafico anterior podemos notar que el Recuento Total de Mesofilos esta dentro de la norma para 21 muestras para un total en porcentaje del 70%, lo que no garantiza que hasta terminar la venta de leche que en casos es pasado del medio día la carga permanezca igual, la tendencia es que esta aumente, pero es preocupante que ese 30% restante tenga índices que llegan hasta 26.000.000 de UFC, lo que puede denotar el estado de esas muestras y lo que esa leche puede causar a quien la consume.

Tabla 8. Características microbiológicas de la leche pasteurizada

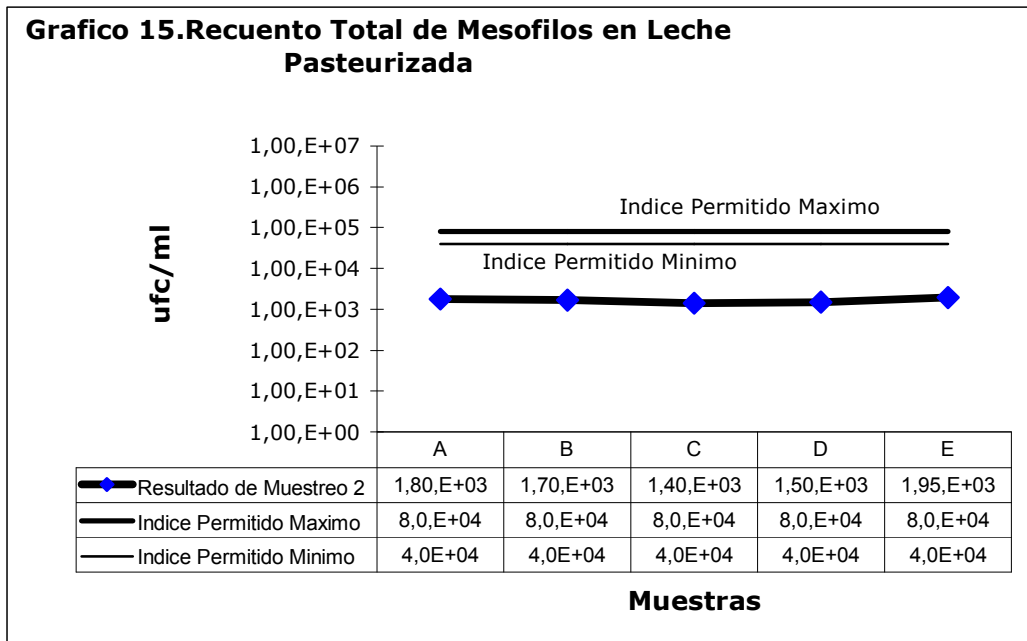
índices permisibles	n	m	M	c
Rto. Microorganismos mesófilos ufc/ ml	3	40000	80000	1
Rto. Coliformes ufc/ml	3	Menor de 1	10	1
Rto. Coliformes fecales ufc/ml	3	Menor de 1	-	0

FUENTE: DECRETO 616 DE 2006



De acuerdo al grafico anterior podemos establecer que para la leche pasteurizada se han encontrado índices más altos de los permitidos para las leches A y B en el primer muestreo, lo que puede obedecer a una mala pasteurización o bien a un mal manejo de la cadena de frío.

Para el segundo muestreo se tomo como parámetro inicial para la recolección de la muestra que en el punto de venta se hiciera un buen manejo de la cadena de frío.



Los análisis en este segundo muestreo determinaron que para las leches pasteurizadas los índices resultantes están por debajo de los mínimos permitidos en la norma concluyendo así la importancia de la cadena de frío para la conservación de estas leches y evitar así el aumento de las Bacterias Mesofilas.

8. DISCUSIÓN

Es preocupante la determinación del gobierno nacional en la expedición del Decreto 2838 del 2006, al determinar que el índice permitido en Recuento de mesófilos aeróbios es de 700.000 ufc/ ml cuando en el ámbito de calidad higiénica en los países productores de leche proponen clasificar las leches sin tratar de la siguiente manera:

Grado A: Con parámetros internacionales, es decir, Recuento de Bacterias: menos de 100.000 UFC/mL; Recuento de Células Somáticas: Menos de 450.000/ml, Punto Crioscópico de -0.540, y Ausencia de Residuos de Antibióticos

Grado B: Recuento de Mesófilos: Menor de 1.000.000 UFC/mL, RCS menos de 750.000/mL. Punto Crioscópico y Residuos de Antibióticos: Igual a Grado A.

Grado C: Mas de 4 horas de TRAM o menos de 5.000.000 de bacterias mesófilas por mL; Menos de 1.000.000 de Células Somáticas. Parámetros iguales a Grado A, para Residuos de antibióticos y Punto Crioscópico.

Teniendo en cuenta la clasificación anterior podemos pensar que el Decreto 2838 del 24 de agosto de 2006 es bastante elástico y permisivo en cuanto a temas de salud se trata ya que considera aceptables las leches que en el ámbito internacional están determinadas como Grado B lo que no garantiza ni la calidad ni la higiene de la misma y menos que su consumo no produzca alteraciones en el organismo de quien la toma.

Es claro que las leches crudas al someterlas a un proceso de choque térmico o pasteurización bajan sus niveles de bacterias mesofilas, pero también se debe tener en cuenta que un deficiente manejo de la cadena de frío las aumenta.

La leche recién ordeñada es peligrosa de por sí, y mucho más si proviene de un lugar sin las necesarias condiciones de higiene, o manipulada por intermediarios inescrupulosos que pueden adulterarla para obtener un rendimiento mayor.

Nuestra ciudad no es ajena a que ha proliferado la comercialización de leche cruda, la Alcaldía a través de la Secretaria de Salud Municipal no ha tenido ninguna manifestación acerca del problema, ya que no ha informado sobre controles, inspecciones y constataciones de infracciones, ni tampoco ha salido -frente a una realidad social que podría arrasar en los hechos con cualquier intento de prohibición- con campañas educativas, preventivas y asistenciales tendientes a eliminar o disminuir el riesgo de contraer enfermedades a través del consumo de leche contaminada.

Sería importante que las autoridades dieran a conocer cuál es su política sobre esta problemática en la que está en juego la salud de la población, acosada por el hambre y la desnutrición por un lado, y el riesgo de enfermar por el otro.

Es determinante crear la conciencia de consumo de leche higienizadas así como el seguimiento que deben hacer las empresas comercializadoras de la forma como sus distribuidores manejan la cadena de frío además de dar incentivos al productor primario para que realice unas buenas prácticas de manejo en su producción.

9. CONCLUSIONES

El Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias es la prueba que realmente mide la calidad higiénica de la leche.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos determinar la desventaja del consumo de leche cruda por las siguientes razones:

► Los índices de bacterias mesófilas aerobias con respecto al acuerdo marco de competitividad y de calidad higiénica de la leche cruda internacional sobrepasan los permitidos, así:

RANGO (EN UFC/ml)	CANTIDAD DE MUESTRAS	CLASIFICACION	PORCENTAJE
Menos de 100.000	2	A	6.67%
Menos de 700.000	19	B	63.33%
Menos de 5.000.000	5	C	16.67%
Mas de 5.000.000	4	C	13.33%
TOTAL	30		100%

Por lo anterior y teniendo en cuenta que para las leches crudas el índice de UFC/ml no debe sobrepasar las 100.000 UFC/ml, solo un 6.67% de las 30 muestras analizadas serian las aceptadas para su consumo.

► Como el análisis se realizo aplicando la normatividad del Decreto 2838 del 2006, emanado del Ministerio de la Protección Social en el cual determina que el índice permitido es de 700.000 UFC/ml podemos concluir lo siguiente:

RANGO (EN UFC/ml)	CANTIDAD DE MUESTRAS	PORCENTAJE
Menor de 700.000	21	70%
Mas de 700.000	9	30%
TOTAL	30	100%

En el Recuento Total de Mesófilos 21 muestras están dentro del límite permitido para un total en porcentaje del 70%, lo que no garantiza que hasta terminar la venta de leche que en casos es pasado del medio día la carga bacteriana permanezca igual, la tendencia es que por efectos de la temperatura se incremente, pero es preocupante que ese 30% restante tenga índices que lleguen hasta 26.000.000 UFC/ml.

► Para las leches pasteurizadas podemos concluir que el Decreto 616 del 28 de febrero del 2006, determina que los índices permitidos están de 40.000 UCF/ml a 80.000 UFC/ml los rangos obtenidos son los siguientes:

RANGO (EN UFC/ml)	CANTIDAD DE MUESTRAS	PORCENTAJE
Menor a 40.000	8	80%
De 40.000 a 80.000	0	0
Mas de 80.000	2	20%
TOTAL	10	100%

Con los resultados obtenidos se podría afirmar que el 80% cumplen con la norma lo que indica que es apta para su consumo, ese 20% con índices mayores a los permitidos obedeció a una mala refrigeración por parte del expendedor, el mal manejo de la cadena de frío en los expendios de venta de leche pasteurizada hace que las bacterias mesofilas aumenten su carga bacteriana afectando así a quien en forma posterior la consuma.

► Debido a la diversidad de marcas de leche pasteurizada que se comercializan, a la hora de comprar es importante fijarse en el manejo a que está sometido este producto como es la forma de almacenamiento (cadena de frío) así como su fecha de vencimiento.

10. RECOMENDACIONES

Desde el punto de vista de Salud Pública, no es recomendable el consumo de leche cruda debido a que no se le hacen controles de calidad además de la ausencia de cadena de frío, ya que quienes hacen la venta o comercialización de la misma no cuentan con equipos ni recipiente para que la leche se conserve a temperaturas adecuadas, lo hace que sea una fuente para la multiplicación de bacterias entre las que están determinadas las bacterias mesofilas aerobias, La calidad se conserva cuando se aplica una refrigeración oportuna y que tenga una temperatura entre 3 y 5 °C.

Teniendo en cuenta que la leche pasteurizada no se puede considerar como un producto de larga duración, se debe mantener siempre en refrigeración y conviene consumirla en el plazo de 2-3 días

Se recomienda que para trabajos posteriores relacionados con este tema que y compromete la salud de una comunidad hacer un seguimiento de los Decretos 616 y 2838 del 2006, además de desarrollar una estrategia que lleve a la elaboración de un MANUAL DE HIGIENE DE LA LECHE CRUDA donde estén comprometidos todos y cada uno de los eslabones de la cadena así como los que directa e indirectamente están relacionados con la producción de la misma.

Es importante que para aquellos quienes están en la parte de venta y comercialización de la leche cruda cumplan con todas y cada una de las condiciones de higiene.

Además deben tener en cuenta que el Decreto 2838 es muy claro cuando anota en su Artículo 3°. "*Plan de reconversión*. Para el cumplimiento de lo establecido en el artículo anterior del presente decreto, todo comercializador de leche cruda y de leche cruda enfriada, deberá presentar dentro de los seis (6) meses siguientes a la expedición de este decreto, ante la alcaldía de su jurisdicción, un plan de reconversión conforme a la guía técnica que para el efecto expidan los Ministerios de Agricultura y Desarrollo Rural y de la Protección Social"

BIBLIOGRAFÍA

- ALAIX, CH.Ciencia de la Leche.Editorial continental.5ta Edición.México DF, México.1994
- AMITO; JEAN.Ciencia y Tecnología de la Leche.Principios y Aplicaciones.Editorial Acribia.Zaragoza, España 1991.
- CASADO, P.; BLANCO, Métodos Instrumentales para el Análisis de la leche. Madrid.Asociación Nacional de Químicos de España.1998.
- CODEX ALIMENTARIO.FAO, Madrid, 2002
- DEMETER,K. Lactobacteriología. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1999.
- FAO.Modulo I.Higiene y Manejo de la Leche. Equipo Regional de Fomento y Capacitacion en Lechería para América Latina.Santiago de Chile.1991.
- LARRAÑAGA,I.;CARBALLO,J;RODRGUEZ,M.;FERNÁNDEZ,J.;Control e Higiene de los Alimentos.Grado Superior.Editorial McGraw Hill/Interamericana de España S.A.1999.
- LERCHE;M.Inspeccion Veterinaria de la Leche. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1999.
- LESSER,A.Instalaciones y Equipos de Ordeño.Editorial Hemisferio Sur.Buenos Aires.1999.
- MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL Decreto 616 de 2006, Bogota D.C.28 de Febrero de 2006.
- MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL Decreto 2838 de 2006, Bogota D.C.Agosto 24 de 2006

MOSSEL,D.Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1995.

MUNICIPIO DE POPAYÁN.P.O.T.Plan de Ordenamiento Territorial.2002

PASCUAL ANDERSON,Ma.Microbiología Alimentaria, Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas.Editorial Diaz de Santos.Madrid 1992.

PEREZ GAVILAN ESCALANTE,J.Bioquímica y Microbiología de la Leche.Editorial Limusa.México 1993.

PINZON CASTILLA,V.Evaluación de las Razas Lecheras en la Meseta de Popayán,Trabajo de Investigación.1980.

PINZON FERNÁNDEZ A.Montaje de una Planta piloto para la producción y comercialización de leche pasteurizada en empaque biodegradable en la meseta de Popayán.Trabajo para optar el título de Tecnólogo en Producción Animal.UNAD.2004.

PINZON FERNÁNDEZ M.V.Recuento Microbiano de la Leche.Trabajo de Investigación Universidad Javeriana.1995.

ROBINSON,R.K.Microbiología Lactologica.Vol I. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1997.

TETRAPAK.Manual de Industrias Lacteas.Editorial Madrid.Madrid 1998.

THOMAS S.B.Técnicas Bacteriológicas para el control Bacteriológico. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1991.

VEISSERE,R.Lactologia Técnica. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1992.

WALSTRA,P. Y JANNES,R.Química y Física Lactologica. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1997.

ANEXOS

ANEXO A
HOJA DE TRABAJO
RELACION DE TOMA DE MUESTRAS

Muestra Numero	Fecha	Zona	Hora	Tipo de Vehículo/ Sitio	Tipo de leche	
					Cruda	Pasteur.
1	Ago-8-06	1	8:05	Bicicleta	X	
2	Ago-8-06	1	8:15	Moto	X	
3	Ago-8-06	1	8:30	Casa	X	
4	Ago-8-06	1	8:45	Galería	X	
5	Ago-8-06	1	8:50	Triciclo	X	
6	Ago-10-06	2	8:10	Camión	X	
7	Ago-10-06	2	8:25	Moto	X	
8	Ago-10-06	2	8:40	Bicicleta	X	
9	Ago-10-06	2	8:50	Camioneta	X	
10	Ago-10-06	2	8:55	Galería	X	
11	Ago-11-06	3	8:10	Moto	X	
12	Ago-11-06	3	8:25	Galería	X	
13	Anulada					
14	Ago-11-06	3	8:50	Moto	X	
15	Ago-12-06	3	8:20	Bicicleta	X	
16	Ago-12-06	3	8:30	Moto	X	
17	Ago-12-06	1	8:55	Moto	X	
18	Ago-15-06	1	9:05	Triciclo	X	
19	Ago-15-06	1	9:15	Galería	X	
20	Ago-15-06	1	9:25	Campero	X	
21	Ago-15-06	1	9:35	Campero	X	
22	Ago-15-06	2	9:45	Renault 6	X	
23	Ago-17-06	2	9:10	Casa	X	
24	Ago-17-06	2	9:15	Casa	X	
25	Ago-17-06	2	9:20	Tienda	X	

Muestra Numero	Fecha	Zona	Hora	Tipo de Vehículo/ Sitio	Tipo de leche	
					Cruda	Pasteur.
26	Ago-17-06	2	9:35	Galería	X	
27	Ago-17-06	3	9:55	Bicicleta	X	
28	Ago-19-06	3	9:05	Campero	X	
29	Ago-19-06	3	9:15	Moto	X	
30	Ago-19-06	3	9:25	Bicicleta	X	
31	Ago-19-06	3	8:40	Tienda	X	
A	Ago-22-06	1	8:30	Tienda		X
B	Ago-22-06	1	8:45	Tienda		X
C	Ago-22-06	2	9:10	Supermercado		X
D	Ago-22-06	3	9:25	Minimercado		X
E	Ago-22-06	3	9:45	Tienda		X
A	Ago-25-06	1	8:05	Punto de Venta		X
B	Ago-25-06	1	8:15	Punto de Venta		X
C	Ago-25-06	2	9:10	Punto de Venta		X
D	Ago-25-06	3	9:25	Punto de Venta		X
E	Ago-25-06	3	9:50	Punto de Venta		X

ANEXO B
RESULTADOS DE MUESTRAS

No	% ACIDEZ	DENSIDAD	% MATERIA GRASA	% SOLIDOS TOTALES	% SOLIDOS NO GRASOS	TRAM REDUCTASA	RECUENTO TOTAL MESOFILOS (UFC)	RECUENTO TOTAL MESOFILOS (UFC)
1	0.144	1.030	3.50	11.84	8.34	< 30 min	1.200.000	12 x 10 ⁵
2	0.144	1.030	3.50	11.84	8.34	< 30 min	1.800.000	18 x 10 ⁵
3	0.142	1.030	3.50	11.96	8.46	< 30 min	3.100.000	31 x 10 ⁵
4	0.142	1.030	3.40	11.72	8.32	< 30 min	19.000.000	19 x 10 ⁶
5	0.142	1.0305	3.40	11.72	8.32	< 30 min	1.900.000	19 x 10 ⁵
6	0.112	1.0262	3.30	10.65	7.35	6 horas	400.000	40 x 10 ⁴
7	0.112	1.0262	3.30	10.65	7.35	6 horas	300.000	30 x 10 ⁴
8	0.112	1.0252	3.40	10.52	7.12	6 horas	400.000	40 x 10 ⁴
9	0.112	1.0252	3.30	10.40	7.10	6 horas	350.000	35 x 10 ⁴
10	0.112	1.0252	3.30	10.40	7.10	6 horas	330.000	33 x 10 ⁴
11	0.124	1.0294	3.70	11.93	8.23	5 horas	300.000	30 x 10 ⁴
12	0.124	1.0294	3.70	11.93	8.23	5 horas	290.000	29 x 10 ⁴
13	ANULADA							
14	0.124	1.029	3.80	12.05	8.25	5 horas	250.000	25 x 10 ⁴
15	0.11	1.024	3.50	10.34	6.84	6 horas	230.000	23 x 10 ⁴
16	0.124	1.030	3.70	12.21	8.51	1 hora	2.900.000	29 x 10 ⁵
17	0.13	1.028	5.00	13.14	8.14	< 30 min	22.000.000	22 x 10 ⁶
18	0.138	1.028	3.50	11.47	7.96	5 horas	400.000	40 x 10 ⁴
19	0.136	1.029	3.80	11.95	8.15	5 horas	350.000	35 x 10 ⁴
20	0.146	1.030	3.70	12.08	8.38	2 horas	14.000.000	14 x 10 ⁶
21	0.14	1.029	3.60	11.84	8.24	4 horas	330.000	33 x 10 ⁴
22	0.14	1.030	3.50	11.97	8.46	4 horas	180.000	18 x 10 ⁴

No	% ACIDEZ	DENSIDAD	% MATERIA GRASA	% SOLIDOS TOTALES	% SOLIDOS NO GRASOS	TRAM REDUCTASA	RECUENTO TOTAL MESOFILOS (UFC)	RECUENTO TOTAL MESOFILOS (UFC)
23	0.13	1.029	3.60	11.86	8.26	4 horas	380.000	38 x 10 ⁴
24	0.13	1.030	3.40	11.72	8.32	4 horas	590.000	59 x 10 ⁴
25	0.13	1.030	3.30	11.60	8.3	3 horas	100.000	10 x 10 ⁴
26	0.13	1.029	2.10	9.91	7.81	5 horas	140.000	14 x 10 ⁴
27	0.196	1.030	2.90	11.12	8.22	< 30 min	26.000.000	26 x 10 ⁶
28	0.138	1.0295	3.50	11.72	8.22	6 horas	380.000	38 x 10 ⁴
29	0.138	1.0295	3.50	11.72	8.22	6 horas	330.000	33 x 10 ⁴
30	0.132	1.0305	3.70	12.21	8.51	5 horas	80.000	80 x 10 ³
31	0.132	1.0305	3.70	12.21	8.51	5 horas	80.000	80 x 10 ³
A	0.146	1.029	3.20	11.23	8.03	< 30 min	8.000.000	80 x 10 ⁵
B	0.15	1.0296	3.20	11.38	8.18	6 horas	237.000	24 x 10 ⁴
C	0.148	1.031	2.90	11.37	8.47	> 6 horas	1.500	15 x 10 ²
D	0.142	1.031	3.00	11.49	8.49	> 6 horas	1.400	14 x 10 ²
E	0.14	1.0295	3.20	11.36	8.16	> 6 horas	86.000	86 x 10 ³
A	0.152	1.031	3.20	11.49	8.16	> 6 horas	1.800	1.8 10 ²
B	0.155	1.0305	3.70	11.37	8.47	> 6 horas	1.700	1.7 10 ²
C	0.132	1.0296	3.20	11.38	8.18	> 6 horas	1.900	1.9 10 ²
D	0.132	1.0305	3.20	12.21	8.03	> 6 horas	1.500	1.5 10 ²
E	0.148	1.0296	3.00	11.49	8.49	> 6 horas	1.400	1.4 10 ²

ANEXO C

VENTA DE LECHE Y TOMA DE MUESTRAS



Foto 1. Tinas de leche



Foto 2.Venta de leche directa de camión



Foto 3.Camión mayorista de leche



Foto 4.Venta de leche



Foto 5. Entrega de leche



Foto 6.Venta de leche en triciclo



Foto 7.Venta de leche en Moto



Foto 8.Venta de leche en Moto con Remolque



Foto 9.Venta de leche en Bicicleta



Foto 10.Venta de leche puerta a puerta



Foto 11.Frasco esteril para toma de muestra



Foto 12.Toma directa de leche cruda



Foto 13. Empaque de las muestras



Foto 14. Empaque de la muestra con gel refrigerante



Foto 15. Muestras debidamente empacadas

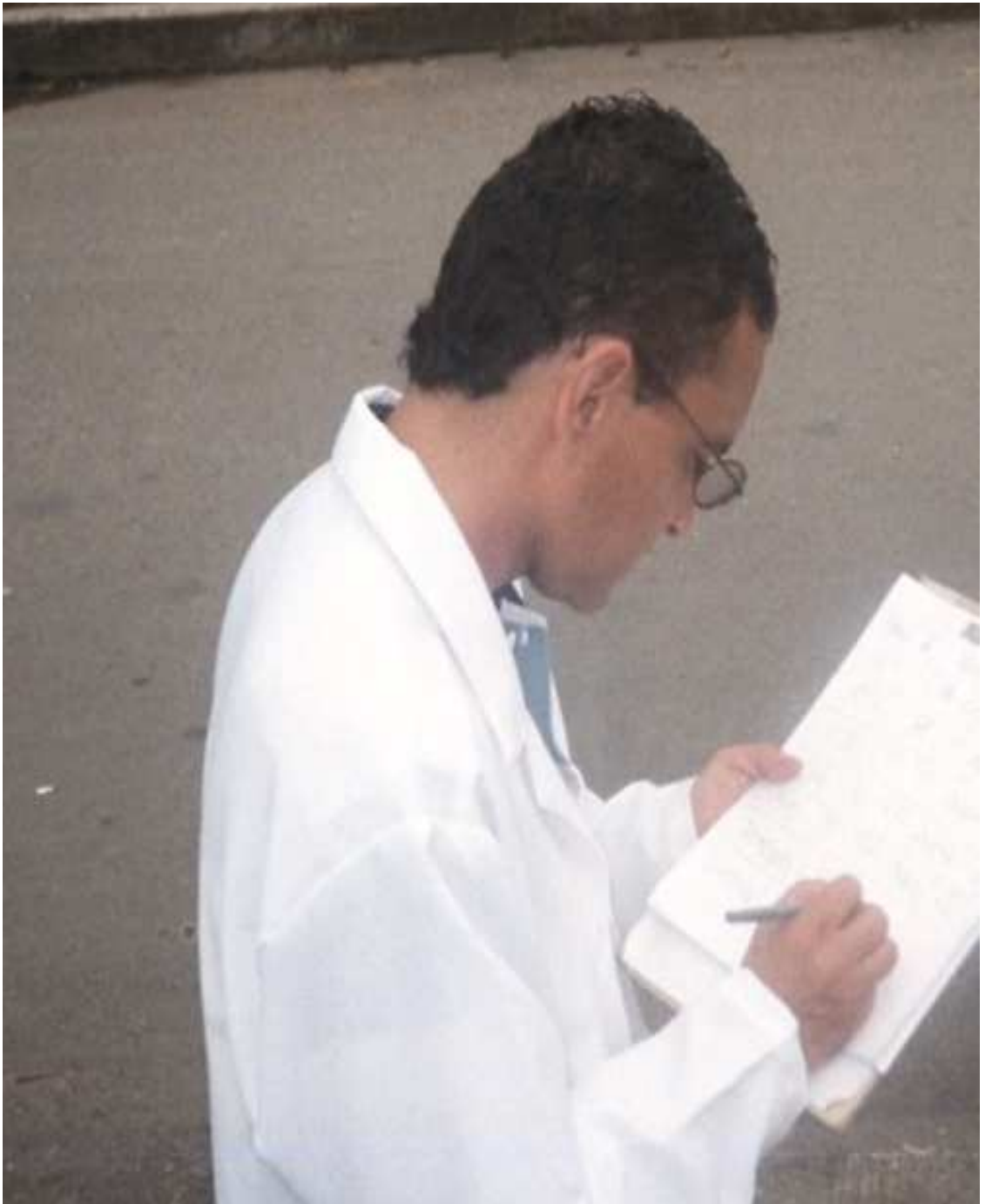


Foto 16.Revisión de la Hoja de trabajo



Foto 17. Transporte de la muestra a Laboratorio