

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA**



TESIS DE GRADO

**ESTUDIO DE LA CONTAMINACION MICROBIOLOGICA DE LA LECHE EN EL
AREA DE INFLUENCIA DE LA PLANTA PROCESADORA DE LOS DERIVADOS
LACTEOS CHOQUENAIRA-UMSA**

MIRIAN QUISPE TALLACAGUA

LA PAZ – BOLIVIA

2011

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA**

**ESTUDIO DE LA CONTAMINACION MICROBIOLOGICA DE LA LECHE EN EL
AREA DE INFLUENCIA DE LA PLANTA PROCESADORA DE LOS DERIVADOS
LACTEOS CHOQUENAIRA-UMSA**

Tesis de grado presentado como requisito
Parcial para optar el Título de
Ingeniería Agronómica

MIRIAN QUISPE TALLACAGUA

Asesores:

Lic. M.Sc. Edgar Ramón García Cárdenas

.....

Ph.D. Alberto Figueroa Soliz

.....

Tribunal Examinador:

Lic. Cynthia Lara Pizarroso

.....

Lic. Yolanda Soruco Miranda

.....

Ing. M.Sc. Rubén Trigo Riveros

.....

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

.....

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo a:

A mi familia que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera. A mis padres y mis hermanos por apoyo y confianza. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante. A mi padre por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre. A mi madre por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos enseñanzas y amor. A mis hermanos por estar siempre presentes.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la Universidad Mayor de San Andrés Facultad de Agronomía por darme la oportunidad de seguir mis estudios superiores. A todos los catedráticos que tomaron parte en formación profesional.

Agradecer a mis asesores por la cooperación que me brindaron durante la elaboración de este trabajo: Lic. Edgar García Cárdenas y al Dr. Alberto Figueroa Solíz.

Agradecer al Proyecto Cadena Productiva Lechera por la asignación de una beca tesis para la realización del presente estudio.

Agradecer al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, en especial al Dr. Remo Esteves quien tomo su tiempo en mi especialidad en el área de Microbiología.

De igual manera agradezco a mis tribunales por sus sugerencias que me brindaron: Ing. Rubén Trigo Riveros, Lic. Yolanda Soruco y a la Lic. Cyntia Lara Pizarroso.

Agradezco el apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera de mis padres: Rosendo Quispe y María Tallacagua.

Mil gracias

RESUMEN

Para producir una leche de alta calidad, es necesario tener en cuenta el estado de salud del animal del productor ya que la leche, así como puede ser un excelente alimento para el ser humano, también puede constituir un peligroso medio de difusión de enfermedades; debido a los métodos racionales empleados en la producción hacen de la leche un producto de alta higiene, la falta o imperfección de estos métodos puede dar lugar a una sustancia malsana y repugnante. Es por ello que generalmente se reconoce que, para ser aceptable, una leche debe tener buena conservación, estar exenta de agentes patógenos y tener buena apariencia, alto valor nutritivo y estar limpia y libre de materias extrañas y suciedades. Por tanto las empresas productoras de lácteos deben brindar una mayor calidad a los consumidores, ya que los productos que están elaboran pueden comprometer la salud de los mismos, razón por la cual es necesario llevar a cabo el análisis microbiológico para determinar la confiabilidad del producto y verificar si aprueban los niveles de calidad exigidos por el Instituto Boliviano de Normalización de Calidad (IBNORCA) para que dichos productos lácteos puedan ser comercializados.

SUMMARY

To produce high quality milk, it is necessary to take into account the animal health status of the producer and the milk and can be an excellent food for humans, can also be a means of spreading dangerous diseases due to the rational methods used in the production of milk make a high-sanitation, lack or inadequacy of these methods can lead to unhealthy and disgusting substance. That is why it is generally recognized that to be acceptable, a milk must be kept in good repair, be free of pathogens and have good appearance, high nutritional value and be clean and free of foreign material and dirt. For both dairy producers should provide a higher quality to consumers, and that products are produced may compromise the health of the same, which is why it is necessary to carry out microbiological analysis to determine the reliability of the product and verify if they pass the quality standards required by the Bolivian Institute of Standards of Quality (IBNORCA) for these dairy products can be marketed.

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1	Consumo de la Leche en Bolivia y Mundial.....	4
2.2	Situación de la Industria Lechera en el Departamento de La Paz	4
2.3	Microbiología de la Leche.....	4
2.3.1	Características Microbiológicas.....	5
2.3.2	Factores que afectan al Crecimiento Microbiano	5
2.3.2.1	Factores Intrínsecos.....	5
2.3.2.2	Factores Extrínsecos.....	7
2.4	Importancia de la Microbiología en la Industria Lechera.....	9
2.5	Contaminación de la Leche.....	9
2.5.1	Mamaria.....	9
2.5.2	Medio Externo.....	10
2.6	Fuentes de Contaminación de la Leche Cruda.....	10
2.6.1	El animal.....	10
2.6.2	Aire.....	10
2.6.3	Agua.....	10
2.6.4	Suelo.....	11
2.6.5	El ordeñador.....	11
2.6.6	Estiércol.....	12
2.6.7	Utensilios y Transporte.....	12
2.7	El ordeño.....	12
2.7.1	Métodos de Ordeño.....	12
2.8	Bacterias más Comunes en la Leche y en los Productos Lácteos.....	13

2.8.1	Bacterias Lácticas.....	13
2.8.2	Bacterias Esporuladas.....	13
2.8.3	Pseudomonas.....	14
2.8.4	Enterobacteriaceae.....	14
2.8.5	Coliformes.....	14
2.8.6	Bacterias Mesófilas.....	15
2.8.6.1	Bacterias Psicrófilas.....	15
2.8.6.2	Bacterias Termodúricas.....	15
2.8.6.3	Bacterias Termófilas.	15
2.9	Hongos.....	15
2.9.1	Levaduras.....	16
2.9.2	Moho.....	16
2.10	Virus.....	16
2.11	Acciones de los Microorganismos sobre los Componentes de la Leche.	17
2.11.1	Lactosa.....	17
2.11.2	Proteína.....	17
2.11.3	Grasa de la Leche.....	18
2.11.4	Cenizas.....	18
2.12	Infecciones e Intoxicaciones provocadas por Leches Contaminadas.....	18
2.12.1	Brucelosis.....	19
2.12.2	Intoxicación Estafilocócica.....	19
2.12.3	Salmonelosis.....	19
2.12.4	Difteria.....	19
2.12.5	Fiebre Q.....	20
2.12.6	Cólera.....	20
2.13	Definiciones de los Requisitos Microbiológicos de la Leche Cruda.	21

2.13.1 Bacteria coliformes.....	21
2.13.2 Escherichia coli.....	22
2.13.3 Mesofilos Aerobios.....	22
2.14.4 Estafilococos.....	22
2.14.5 Células Somáticas.....	23
2.14.6 Mohos y Levaduras.....	24
2.15 Mastitis.....	25
3. MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1 Localización.....	26
3.2 Ubicación Geográfica.....	26
3.2.1 Fisiografía.....	27
3.2.2 Clima.....	27
3.3 Materiales.....	27
3.3.1 Material biológico.....	27
3.3.2 Material de campo.....	28
3.3.3 Materiales de Laboratorio.....	28
3.3.4 Equipos.....	29
3.3.5 Reactivos.....	29
3.4 Metodología.....	30
3.4.1 Determinación del Tamaño de la Muestra.....	30
3.4.2 Toma de Muestras.....	31
3.4.3 Transporte de Muestras.....	31
3.3.4 Fase de Laboratorio.....	32

3.4.5	Situación de Zona Lechera de la Estación Experimental de Choquenaira.....	32
3.4.6	Tamaño de la Muestra.....	32
3.4.7	Análisis Microbiológico.....	32
3.4.7.1	Recuento de Bacterias Mesofilos Aerobios.....	32
3.4.7.2	Recuento de bacterias coliformes totales	35
3.4.7.3	Recuento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> en (ufc/mL).....	37
3.4.7.4	Presencia de la bacteria <i>Estaphylococcus aureus</i> en ufc/mL... ..	38
3.4.7.4.1	Recuento en placa.....	38
3.4.7.4.2	Prueba de Coagulasa y Catalasa para la bacteria <i>Estaphylococcus aureus</i>	39
3.4.7.5	Recuento de Células somáticas.	42
3.4.7.6	Recuento de Mohos y Levaduras.....	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	46
4.1	Recuento de Bacterias Mesofilos Aerobios	46
4.2	Variable Coliformes Totales.....	50
3.4.6	Recuento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> en la leche.....	54
3.4.7	Recuento de la bacteria <i>Estaphylococcus aureus</i> en la leche.....	58
4.5	Determinación de Células somáticas en la leche cruda.....	63
4.6	Recuento de Mohos y Levaduras.....	67
5.	CONCLUSIONES.....	71
6.	RECOMENDACIONES.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de Estudio de la Estación Experimental de Choquenaira.....	26
Figura 2. Toma de muestras de leche de las Comunidades.....	31
Figura 3. Pasos en la determinación de bacterias Mesofilos aerobios en ufc/mL	34
Figura 4. Determinación de los pasos en la identificación de bacterias Coliformes.....	36
Figura 5. Recuento de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	37
Figura 6. Pasos para la determinación de <i>Estaphylococcus aureus</i> en ufc/mL	39
Figura 7. Identificación de la bacteria <i>Estaphylococcus aureus</i>	41
Figura 8. Colonias de la bacteria <i>Estaphylococcus aureus</i>	41
Figura 9. Pasos para la Determinación de Células Somáticas.....	43
Figura 10. Determinación de Mohos y Levaduras.....	45
Figura 11. Recuento Total de bacterias Mesofilos Aerobios en leche.	46
Figura 12. Recuento total de bacterias Coliformes totales en (NMP/mL)	50
Figura 13. Recuento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> en la leche.....	54
Figura 14. Recuento de la bacteria <i>Estaphylococcus aureus</i> en (ufc/mL).....	58
Figura 15. Prueba de Catalasa y Coagulasa para <i>Estaphylococcus aureus</i>	59
Figura 16. Recuento de células somáticas en (ufc/mL).....	63
Figura 17. Recuento total de Mohos y Levaduras en la leche cruda.....	67

INDICE DE CUADROS

Tabla 1. Tiempo de reducción de Azul de Metileno para Células Somáticas cel/mL.....	42
Tabla 2. Resultado de la prueba TRAM para la leche cruda.....	64

1. INTRODUCCION

Las empresas productoras de lácteos deben brindar una mayor calidad a los consumidores, ya que los productos que están elaboran pueden comprometer la salud de los mismos, razón por la cual es necesario llevar a cabo el análisis microbiológico para determinar la confiabilidad del producto y verificar si aprueban los niveles de calidad exigidos por el Instituto Boliviano de Normalización de Calidad (IBNORCA) para que dichos productos lácteos puedan ser comercializados.

Es por esta razón que se ha visto la necesidad de crear laboratorios de análisis de alimentos que lleven a cabo dichos análisis para determinar la calidad de los productos de las empresas o personas que los elaboran, y que además brinden asesoría en los respectivos análisis y en la implantación de un sistema de calidad en estas empresas productoras de lácteos.

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

Por eso, 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 contaminado por microorganismos patógenos como ser: bacterias *Mesofilos aerobios*, *Coliformes*, *Eescherichia coli*, Células somáticas, *Estaphylococcus aureus*, mohos y levaduras. En caso de poseer una alta contaminación generada por estos microorganismos se pueden producir enfermedades tales como Tuberculosis, intoxicaciones, brucelosis, y listeriosis, colibacilosis u otras enfermedades especialmente gastrointestinales.

Estos microorganismos patógenos pueden ser excretados con la leche de los animales infectados, pueden ingresar durante el ordeño a través del ordeñador o

pueden ingresar mediante el medio ambiente. Estos microorganismos patógenos continúan al hervir la leche, algunas bacterias se destruyen pero otras permanecen, frecuentemente son las más patógenas. 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.

Por esta razón los laboratorios se deben comprometer a realizar los respectivos análisis teniendo como objetivo principal proporcionar resultados altamente confiables, debe controlar y asegurar la calidad de sus resultados, emitiéndose calidad como el grado en el que un conjunto de características inherentes cumplen con los requisitos, lo cual radica principalmente en la alineación con parámetros nacionales e internacionales.

Es por ello que, para quienes trabajan en el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche sino, también, de alta calidad higiénica, y para ello debe contemplarse un aspecto fundamental, que es la higiene microbiológica, así poder contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero de nuestro país.

Para producir una leche de alta calidad, es necesario tener en cuenta el estado de salud del animal del productor ya que la leche, así como puede ser un excelente alimento para el ser humano, también puede constituir un peligroso medio de difusión de enfermedades; debido a los métodos racionales empleados en la producción hacen de la leche un producto de alta higiene, la falta o imperfección de estos métodos puede dar lugar a una sustancia malsana y repugnante. Es por ello que generalmente se reconoce que, para ser aceptable, una leche debe tener buena conservación, estar exenta de agentes patógenos y tener buena apariencia, alto valor nutritivo y estar limpia y libre de materias extrañas y suciedades.

El presente trabajo se realizó con el objeto de determinar el control microbiológico de la leche que será utilizada en la planta de transformación de productos lácteos de

la Estación Experimental de Choquenaira. La leche se obtendrá de la estación experimental y de las cuatro comunidades aledañas a esta; Choquenaira Copalacaya, Canaviri y Callisaya para cubrir la capacidad de operación de la misma que es de 1000 L / día.

Por tal motivo, el presente trabajo de investigación pretendió alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Estudiar la contaminación microbiológica de la leche en el área de influencia de la planta procesadora de los derivados lácteos Choquenaira- UMSA.

Objetivos Específicos

- Determinar el recuento total de las bacterias *mesofilas aerobias* en (ufc/mL) en la leche cruda de la vaca.
- Evaluar la presencia de microorganismos coliformes totales y *Escherichia coli* en número más probable (NMP) mediante la prueba confirmativa.
- Evaluar la presencia microbiológica del microorganismo *Staphylococcus aureus* en (ufc/mL) en la leche cruda de la vaca.
- Realizar el recuento total de los microorganismos Mohos y levaduras en (ufc/mL) la leche cruda de la vaca.
- Comprobar la presencia de células somáticas en la leche cruda de la vaca mediante reducción del azul de metileno (TRAM).

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Consumo de la Leche en Bolivia y Mundial

El consumo de la leche en Bolivia se encuentra entre 35 a 40 litros anuales por persona, el promedio en Latinoamérica es de 100 litros por persona anual. La organización de las naciones unidas para la alimentación (FAO) recomienda entre 150 a 180 litros que cada persona debe consumir, entre leche y sus derivados al año. Es posible que la intolerancia a la lactosa y la reducida tradición lechera del país sean factores que influyan en el hábito de consumo de leche incluyendo el grado de educación y el factor económica de la población (Roque, 2000).

2.2 Situación de la Industria Lechera en el Departamento de La Paz

La industria lechera, es la actividad que provee mayor cantidad de ingresos permanentes a la población del altiplano paceño; en 2003, La Paz producía más de 17 millones de litros de leche representando el 6 % de la producción nacional; el departamento de Santa Cruz fue el mayor productor de leche, alcanzando aproximadamente el 62% del total nacional. Le sigue en importancia, el departamento de Cochabamba con 66.8 millones que representa casi el 23%; y finalmente los departamentos de Oruro, Tarija, Chuquisaca y Beni, que en su conjunto, producen aproximadamente el 9% de la producción (SOBOCE, 2009).

2.3 Microbiología de la Leche

Según Frazier (1962), la leche es un excelente medio de cultivo para numerosos microorganismos por su elevado contenido de agua, su pH casi neutro y su riqueza en alimentos microbianos. Posee una gran cantidad de alimentos energéticos en forma de azúcares (lactosa), grasa, citratos y compuestos nitrogenados. La presencia de azúcares fermentables, en condiciones ordinarias provoca que las bacterias produzcan una fermentación ácida, si no existen gérmenes formadores de ácido o si las condiciones son desfavorables para su actividad, pueden sufrir otros tipos de alteración.

2.3.1 Características Microbiológicas

FAO (1998), señala que es sumamente importante que las muestras de leche que se tomen para el análisis microbiológico reflejen con exactitud las condiciones higiénicas-sanitarias existentes en el momento del muestreo, asépticamente utilizando recipientes e instrumentos estériles, y protegiendo las muestras contra la contaminación exógena. Además deben mantenerse en condiciones tales que la microflora original que contiene la leche no mueran ni se multipliquen.

2.3.2 Factores que afectan al Crecimiento Microbiano

Las bacterias, como todo ser vivo, necesitan unas condiciones especiales del medio que las rodea para poder desarrollarse adecuadamente. Es preciso distinguir entre las variaciones de las condiciones externas que pueden soportar y las condiciones óptimas para su desarrollo. Las condiciones de medio más relevantes para la reproducción de los microorganismos son la disponibilidad de nutrientes y la humedad, por ello la leche es un medio ideal (Madrid, 1996).

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 de la leche se conserva cuando se aplica una refrigeración oportuna y que tenga una temperatura entre 4y 6 °C (Madrid, 1996).

2.3.2.1 Factores Intrínsecos

Los factores intrínsecos son aquellos que tienen que ver con el alimento en sí, su composición y características:

a) 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 los ácidos lácticos las que se ven favorecidos para crecer en la leche a pH normal.

b) Actividad del agua. 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 del agua 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 la leche fluida (Casado, 1998).

c) Potencial de oxido-reducción. El potencial redox de los alimentos está determinado por la presencia de elementos reductores (que ganan oxígeno o pierden electrones) y oxidante (que pierden oxígeno o ganan electrones). El potencial redox 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 valores de +250 a +350 mV (milivoltios). Los microorganismos al multiplicarse, debido a su metabolismo liberan electrones y consumen oxígeno, lo cual hace que el potencial disminuya (Casado, 1998).

d) Oxígeno. Según Ellner (2000), otro factor importante en el desarrollo de las bacterias, es el oxígeno. De acuerdo a este parámetro se pueden clasificar en aeróbicas y anaeróbicas, sin embargo existe un tercer grupo llamadas anaeróbicas facultativas.

e) 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 diversa asociaciones de microorganismos que mediante relaciones simbióticas logran desarrollarse en el medio. Algunas de estas asociaciones se aprovechan para la elaboración de productos lácteos, como ejemplo se puede citar el yogurt, donde se da una simbiosis entre el *Streptococcus* y el *Lactobacillus* (Pisabarro, 2007).

2.3.2.2 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.

a) 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 70 °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 termoduricas 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*, *bacillus* y *Clostridium* Yabar (2005).

Los microorganismos psicrotrofos y los termotrofos, son microorganismos mesófilos pero que igualmente pueden crecer a temperaturas bajas o altas.

Con referencia a la temperatura tenemos que, para el crecimiento de cada especie de microorganismo existe una temperatura mínima, óptima y máxima. Según la temperatura óptima éstos se clasifican en psicrófilos, mesófilos y termófilos. También existen grupos termodiúricos, los que resisten altas temperaturas y grupos psicrótrofos que pueden reproducirse a 7°C o menos independientemente de su temperatura óptima (Revilla, 1985)

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

c) 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 (Pisabarro, 2007).

d) 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 (Robinzón, 1997).

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 vulgaricus*, 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 (Robinzón, 1997).

2.4 Importancia de la Microbiología en la Industria Lechera

Según Heer (2007), el estudio microbiológico está basado en tres aspectos muy importantes:

- Los microorganismos pueden producir 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 afectando la calidad de sus subproductos.

2.5 Contaminación de la Leche

Según Matyos (1969), indica que los diferentes microorganismos alcanzan la leche por dos vías principales: la vía mamaria y el medio externo.

2.5.1 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). Y por la vía descendente la utilizan los microorganismos que pueden causar enfermedad sistémica o tienen la propiedad de movilizarse por la sangre y a

través de los capilares mamarios llegar a infectar la ubre como las bacterias *Salmonellas*, *Brucellas*, *Mycobacterium* (Matyos, 1969).

2.5.2 Medio Externo

Según Matyos (1969), indica que la contaminación de la leche puede ocurrir una vez que esta ha sido extraída de la glándula mamaria. Los utensilios, tanques de almacenamientos, 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.

2.6 Fuentes de Contaminación de la Leche Cruda

2.6.1 El animal

Teóricamente la leche al salir del pezón debería ser estéril, pero siempre contiene de 100 a 10.000 bacterias/mL, una baja carga microbiana que puede no llegar a multiplicarse si la leche es manipulada adecuadamente. Los microorganismos pueden entrar por vía mamaria ascendente a través del esfínter del pezón, es por ello que cualquier lesión que afecte la integridad del mismo, facilitara un aumento en la contaminación. La leche puede también contaminarse al salir por medio de pelos o sucio que se desprenden de los animales. La ubre está en contacto con el suelo, heno, y cualquier superficie donde las vacas se echen, de allí que los pezones sean considerados como una fuente importante de esporas bacterianas. En animales enfermos, (vacas con mastitis) aumenta el número de microorganismos en leche (AMIOT, 1991).

2.6.2 Aire

El aire representa uno de los medios más hostiles para la supervivencia de los microorganismos debido a la constante exposición al oxígeno, cambios de temperatura y humedad relativa, radiación solar, etc. Es por ello que solo aquellos microorganismos resistentes podrán ser capaces de permanecer en el aire y llegar a

contaminar los alimentos. Los microorganismos Gram negativos mueren rápidamente mientras que los Gram positivos y aquellos esporulados pueden persistir por largo tiempo. En el aire se pueden encontrar *Micrococcus*, *Streptomyces* y esporas de mohos como *Penicillium* y *Aspergillus*. Las levaduras raramente se encuentran en suspensiones aéreas (AMIOT, 1991).

2.6.3 Agua

El agua utilizada para la limpieza de los equipos y utensilios de ordeño, la higiene del animal y del personal, debe ser lo más limpia posible. El agua puede ser una fuente importante de microorganismos psicrófilos (*Pseudomonas*) y por contaminación de esta, de bacterias coliformes (Hayes, 1993).

2.6.4 Suelo

El suelo es la principal fuente de microorganismos *termodúricos* y *termófilos*. La leche nunca entra en contacto con el suelo pero si los animales, utensilios y personal, de manera que es a través de ellos que los microorganismos telúricos (*Clostridium*) pueden alcanzar a contaminar la leche (ICMSF, 200).

2.6.5 El ordeñador

El ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación de la leche, sobre todo cuando el ordeño es manual. En nuestro medio es frecuente observar como el personal encargado del ordeño no se lava las manos y peor aún se las humedece en la misma leche para lograr lubricación que facilite el ordeño. Se ha señalado al ordeñador como responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos (*S. aureus*, *Leptospiras*, *E. coli*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus*, etc.). Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuentes de algunos de estos microorganismos (ICMSF, 2000).

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. 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 (Pinzón, 2004).

2.6.6 Estiércol

El estiércol es la fuente principal de microorganismos coliformes. Estos pueden alcanzar la leche a través del animal o del ordeñador así como también por medio de los utensilios mal higienizados.

2.6.7 Utensilios y Transporte

El contacto de la leche con el material de ordeño y su permanencia en los tanques y transporte puede multiplicar por un factor de 2 a 50 la flora microbiana presente. De allí que la higiene adecuada de estos, por medio de agentes desinfectantes, afecta significativamente la calidad sanitaria de la leche. La flora microbiana proveniente de esta fuente puede ser diversa, pero la más frecuente es flora termorresistente, razón más que suficiente para exigir al máximo la higiene (Pinzón, 2004).

2.7 El ordeño

El ordeño es extraer la leche exprimiendo la ubre de la vaca.

2.7.1 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 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, ya que no se expone al ambiente, evitando así cualquier contacto con microorganismos u otro tipo de contaminación que pueda dañarla (Pinzón, 2004).

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 (Pinzón, 2004).

Una vez en la central lechera, la leche cruda que se recibe se trata para obtener leche de consumo o derivados lácteos. El tipo de tratamiento que se le aplica depende del producto a elaborar. Sin embargo, antes de su procesado la leche siempre se somete a unos tratamientos generales que tienen por objeto destruir los microorganismos patógenos y adecuar su composición a los tratamientos de elaboración a los que será sometida (Pinzón, 2004).

2.8 Bacterias más Comunes en la Leche y en los Productos Lácteos

En la leche y productos lácteos se encuentran gran número de bacterias, entre las que podemos destacar las siguientes:

2.8.1 Bacterias Lácticas

Según Madrid (1996), indica que las bacterias lácticas en la naturaleza y en los alimentos, se llaman así porque entre sus productos metabólicos figura el ácido láctico. Son tanto bacilos como cocos, pero no tienen la propiedad de formar esporas. Son anaeróbicas facultativas y son destruidas por el calor a temperatura de 72-75°C durante 15 segundos. Entre las más destacadas tenemos a *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que se utilizan para la elaboración del yogur. Por otra parte tenemos los utilizados en la elaboración de queso *Streptococcus diacetilactis* y *Leuconostoc citrovorum*.

2.8.2 Bacterias Esporuladas

Según Madrid (1996), indica los *Bacillus* son bacterias aeróbicas con actividad enzimática variada producen acidificación, coagulación y proteólisis. 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 pasteurizada, 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.

2.8.3 Pseudomonas

Según Madrid (1996), indica que más del 50% de la flora Gram negativa de la leche cruda está 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.

2.8.4 Enterobacteriaceae

Restos de materia fecal pueden contaminar los alimentos con patógenos fecales.

Antiguamente se asoció el hallazgo de *Enterobacterias* en leche con una contaminación con materia fecal. Hoy se sabe que muchas *Enterobacterias* se multiplican fuera del intestino y su relación con una contaminación fecal se reduce solamente a una sospecha (Cruz, 1989).

2.8.5 Coliformes

Se entiende como coliformes todos los representantes de la familia *Enterobacteriaceae* que desdoblan la lactosa produciendo ácido y gas. Géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.

Son indicadores de falta de higiene en la rutina de ordeño.

Los coliformes se determinan con medios líquidos y sólidos debido a su acción sobre la lactosa formando ácido o gas (Cruz, 1989).

2.8.6 Bacterias Mesófilas

Revilla (1985), indica que las bacterias mesófilas son un grupo de bacterias que se desarrollan a temperaturas entre 30-40 °C, e incluye a varios grupos.

2.8.6.1 Bacterias Psicrófilas

El grupo de bacterias que tienen la capacidad de desarrollarse a bajas temperaturas, entre 5 a 20 °C. Siendo su temperatura óptima entre los 12 a 15 °C.

2.8.6.2 Bacterias Termodúricas

En la industria lechera se denominan así a las bacterias que son resistentes a la pasteurización (30 minutos a 63-65°C). Estas bacterias se pueden originar del suelo, forrajes, silaje, barro, bosta, equipamiento (Revilla, 1985).

2.8.6.3 Bacterias Termófilas

Se denominan bacterias termófilas aquellas que tienen su temperatura óptima de desarrollo por encima de 40°C. A ese grupo de bacterias pertenecen algunos géneros de *Bacillus* y *Streptococcus*, que se utiliza para la determinación biológica de inhibidores en leche. Estas bacterias sometidas a temperaturas durante un tiempo prolongado tienen un crecimiento acelerado (Revilla, 1985).

2.9 Hongos

Según Cruz (1989), indica que los hongos son un grupo de microorganismos que se encuentran frecuentemente entre las plantas, animales y seres humanos. Las distintas especies de hongos varían en cuanto a su estructura y método de reproducción. Los hongos pueden ser redondos, ovales o filiformes. Los filiformes forman una red, visible a simple vista. Los hongos se dividen en levaduras y mohos.

2.9.1 Levaduras

Según Madigan (1999), indica que las levaduras son simples organismos unicelulares de forma esférica o cilíndrica y el tamaño de las células de las levaduras varía considerablemente. Por ejemplo, las levaduras cerveceras, *Saccharomyces cerevisiae*, tienen un diámetro de 2 – 8 μm , y una longitud de 5 μm . Las células de las levaduras de otras ciertas especies pueden ser tan largas como de 100 μm .

2.9.2 Moho

Mohos pertenecen a un grupo bastante diferente de los hongos. Consisten en células como hebras llamadas *mycellium*. El moho hongo tiene muchas bifurcaciones del cuerpo llamados *Mycellium*, los cuales pueden ser microscópicamente pequeños, o suficientemente largos a simple vista (Medigan, 1999).

Hay muchas familias diferentes de mohos. Grupos que son importantes para la industria láctea incluyendo la *penicillium* y el moho de la leche, *geotrichum candidum*.

- Humedad: los mohos pueden crecer en materiales con muy poca agua contenida y pueden extraer del aire agua.
- Acidez: Los mohos pueden crecer con un rango de pH de entre 3 y 8.5.
- Temperatura: La temperatura óptima es normalmente entre los 20 y 30°C.
- Oxígeno: Los mohos usualmente crecen en condiciones aeróbicas.

2.10 Virus

Los virus y parásitos bacteriales, pueden sobrevivir por si solos, pero ellos solo pueden crecer o replicarse dentro de células bacteriales. Ellos tienen huéspedes específicos, y especies individuales de variedades de bacterias. Los virus pueden verse solo por medio de un microscopio electrónico (Medigán, 1999).

2.11 Acciones de los Microorganismos sobre los Componentes de la Leche

2.11.1 Lactosa

La lactosa parece ser el componente de la leche más susceptible a la acción de los microorganismos. Inicialmente se forma ácido láctico por este ataque. Mientras las condiciones lo permitan, la formación de ácido láctico puede proseguir hasta que su misma concentración sea excesiva para que los microorganismos continúen en actividad. *Streptococcus lactis* puede seguir reproduciéndose en la leche hasta que la acidez valorable de la leche, expresada como ácido láctico, alcance el 1,00 %. *Bacillus bulgaricus* puede incrementar la acidez valorable de la leche hasta 2,25 % antes de que se inhiba. *Torula lactis* (una levadura), puede producir una acidez valorable en la leche de 1,5 % antes de que deje de crecer. Tales niveles de acidez no destruyen a los organismos, sólo inhiben su actividad. Unos cuantos mohos producen pequeñas cantidades de ácido láctico en la leche y productos lácteos (Warner, 1980).

2.11.2 Proteína

La proteína, especialmente la caseína, es probablemente la que siga en frecuencia y grado de implicación en la acción de los microorganismos más comunes de la leche. La proteína, por lo común, se coagula en presencia de una cantidad adecuada de ácido. La leche se coagula a temperatura ambiente con una acidez valorable de 0,51 % a 0,65 %. La proteína se cuaja cuando actúan sobre ella ciertas enzimas bacterianas. La proteólisis es el resultado de la acción de cualquiera de varios microorganismos. Inicialmente la proteína se altera, liberando algunos de sus aminoácidos. Finalmente estos se rompen dando amidas y amoníaco. Este paso trastorna o perturba las fuerzas que mantienen a las partículas o micelas de caseína en suspensión, transformando a la proteína en sustancias solubles. La proteólisis, generalmente, aunque no siempre, involucra coagulación (Warner, 1980).

2.11.3 Grasa de la Leche

Según Warner (1980), las acciones microbianas no son tan rápidas sobre la grasa como sobre la lactosa y la proteína. Aparte de la acción lipolítica de la lipasa que normalmente se encuentra presente en la leche, puede ocurrir una lipólisis como resultado de la acción de las lipasas que producen ciertas bacterias como *Pseudomonas fluorescens* algunas levaduras y ciertos mohos. La lipólisis provoca la hidrólisis de la grasa, y libera glicerina y ácidos grasos. El efecto organoléptico dependerá de cuales ácidos quedan en libertad. Los ácidos butíricos y cúpricos, por ejemplo, producen sustancias que no son las normales en los productos lácteos y generalmente olores y sabores que resultan objetables.

2.11.4 Cenizas

Las cenizas o componentes minerales de la leche rara vez son atacados directamente por los microorganismos. Algunos son liberados de la combinación en la que están en la caseína durante la formación de ácido y proteólisis. Las bacterias como *Streptococcus citrovorum* convierten los citratos de la leche en diacetilo. El diacetilo es el responsable del aroma de la mantequilla (Warner, 1980).

2.12 Infecciones e Intoxicaciones provocadas por Leches Contaminadas

Cabrera et. al., (1987), establecen que la leche es un excelente alimento tanto para el ser humano como para los animales. Sin embargo, al mismo tiempo puede poseer toda una serie de gérmenes capaces de enfermar tanto a unos como a otros. Estos gérmenes pueden llegar a la leche desde el medio ambiente como de la sangre, producto de la enfermedad que padece el animal.

También afirman que se ha comprobado la transmisión de un número considerable de enfermedades por la leche que, aunque no se ha podido aislar el germen causal, los datos epidemiológicos hacen sospechar de esta vía.

2.12.1 Brucelosis

Henneberg (1971), afirma que la *Brucella* puede infectar al hombre causando en éste la enfermedad conocida como Brucelosis, Fiebre Ondulante o Fiebre de Malta. El período de incubación en el hombre es de 1 a 6 semanas y los síntomas pueden ser diversos, según el tipo de órgano afectado. El hombre puede contraer esta enfermedad a través del consumo de leche cruda. Además de esta vía puede contraerla directamente por el contacto.

2.12.2 Intoxicación Estafilocócica

Brock y Madigan (1999), afirman que el envenenamiento por alimentos más común es el causado por *Staphylococcus aureus*. Este organismo produce varias enterotóxicas que se liberan al medio circundante. Si se ingiere el alimento que contiene la toxina se observa reacciones graves dentro de una a seis horas, que incluyen náuseas con vómito y diarreas.

2.12.3 Salmonelosis

Cabrera *et. al.*, (1987), indican que la leche contenedora de las bacterias *Salmonellas* es capaz de alterar la salud del ser humano. Por lo tanto, si en la leche se demuestra la presencia de *Salmonellas* o *Colibacilus*, solamente se podrá utilizar para el consumo animal o humano, después de haberse sometido a la acción del calor por hervido durante 15 minutos.

Brock y Madigan (1999), señalan que los síntomas de la salmonelosis incluyen la aparición súbita de dolor de cabeza, escalofrío, vómito y diarrea seguidos de fiebre que persiste pocos días.

2.12.4 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 las ubres 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 (Brock y Madigan, 1999).

2.12.5 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 por la ingestión de leche cruda contaminada este microorganismo patógeno. 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 (Brock y Madigan, 1999).

2.12.6 Cólera

Cabrera, et. al., (1987), indica que 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 9 días. El tratamiento térmico destruye con facilidad al vibrión.

2.13 Definiciones de los requisitos Microbiológicos de la Leche Cruda

2.13.1 Bacterias coliformes

Según NB-32005 (2002), las bacterias coliformes son bacilos cortos Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos no esporuladas, que fermenten glucosa y lactosa con formación de ácidos y gas. Los coliformes son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario inadecuado. La presencia de estos microorganismos en cantidades mayores al permitido indica:

- Mala manipulación y o procesamiento del alimento.
- Riesgo indirecto mayor probabilidad de existencia de bacterias entericas patógenas como la salmonella, Shigella.

Alais (1985), las bacterias coliformes pertenecen a la familia de las enterobacteriaceae esta familia es una de las más vistas y de las más difíciles de dividir. Las especies más frecuentes en los productos lácteos son las que fermentan la lactosa. La mayor parte de las enterobacterias son huéspedes normales del intestino de los mamíferos; su presencia en el agua o la leche pueden atribuirse a una contaminación de origen fecal. Muchas de estas especies tienen una fase de vida libre en el suelo y en el agua. Algunos se encuentran en los productos vegetales.

Según Marth (1978), el grupo de bacterias coliformes comprenden todas las aerobias y anaerobias facultativamente, Gram negativas, son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 32°C en 48 h. Una fuente de estos organismos es el tracto intestinal de animales de sangre caliente. Seguro bacterias de origen no fecal son miembros de este grupo. Típicamente estos organismos son clasificados en el género *Escherichia*, *Enterobacter* (antiguamente *Aerobacter*) y *Klebsiella*. Pocas fermentadoras de lactosa y otros gérmenes están incluidas en el grupo coliformes. La existencia de cualquiera de estos tipos en productos diarios es

sugestiva de condiciones no sanitarias a prácticas durante la producción, procesamiento o almacenaje.

2.13.2 Bacteria *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, puede estar aislado o en parejas y tener flagelos se desarrolla fácilmente sobre medios con nutrientes simples. Las colonias pueden ser lisas, poco convexas, húmedas de superficie brillante, con el borde completo o secas y ásperas casi todas las cepas fermentan la lactosa (IBNORCA, 2002).

Las bacterias coliformes proceden del estiércol, el agua contaminada, el suelo y las plantas. Son bioquímicamente muy activas; fermentan al lactosa produciendo ácido láctico y acético y cantidades más pequeñas de otros ácidos. El recuento de bacterias coliformes es uno de los más los medios más significativos para determinar la calidad higiénica de la leche, por ejemplo producen bióxido de carbono e hidrógeno en cantidades apreciables al fermentar la lactosa, dan cierto hedor “fecal” a la leche y crecen a temperaturas mayores a 20 °C (Soto y Castro, 1987).

2.13.3 Bacterias Mesofilos aerobios

A efectos de la presente norma, se entiende por “bacterias mesofilas” a las bacterias cuya temperatura de desarrollo está comprendida entre 20° C a 40° C.

El recuento de bacterias aerobias mesofilas indica la presencia de la flora total sin especificar los tipos de bacterias, también determina la calidad sanitaria y la vida útil de los productos, indicando las condiciones de higiene de la materia prima, la forma como fueron procesados y la manipulación durante su elaboración y comercialización (IBNORCA, 2002).

2.14.4 Estafilococos

El género *Staphylococcus* está conformado por células esféricas (cocos) Gram – positivas (Gram +) generalmente agrupadas en racismos irregulares, crecen con facilidad en diferentes medios de cultivo y son metabólicamente muy activos, fermentan muchos carbohidratos y producen pigmentos que van desde el blanco al amarillo intenso. El *Staphylococcus aureus* es generalmente hemolítico y coagula el plasma (IBNORCA, 2002).

El *Staphylococcus* vive dentro o fuera de la ubre, en la piel del pezón y puede causar tanto mastitis clínica como sub clínica. Generalmente se desimina de la misma forma que el *Streptococcus agalactiae*. La infección tiende a producir cicatrices, que resultan en caso de infección encerradas en la ubre que son difíciles de alcanzar por los antibióticos. Tales sacos pueden romperse y abrirse a otras partes de la glándula mas tarde (Wattiaux, 2002).

La bacteria *Estaphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, inmóvil que forma agrupaciones irregulares de células usualmente parecidas a los racimos de uvas. Son anaerobios facultativas, pero crecen mejor en presencia de aire, siendo su temperatura optima de crecimiento los 37º, desarrollándose hasta los 10°C o ligeramente menos (Hayes, 1993).

Shaphylococcus aureus ha sido ampliamente caracterizado, ya que se sabe que este microorganismo produce una gran variedad de productos extracelulares. Muchos de ellos, como las enterotoxinas estafilococales (SE en ingles), son factores virulentos que han estado implicados en enfermedades de humanos y animales. Estas entero toxinas elaboran un juego de propiedades biológicas que causan al menos dos enfermedades humanas comunes, síndrome de shock toxico (TSS en ingles) e intoxicaciones debidas a *Staphylococcus* en alimentos (Doyle, 1997).

2.14.5 Células Somáticas

Hablar de la calidad de la leche significa, para el consumidor, productos de buena calidad y de buena presentación. Las células somáticas son células blancas propias del organismo que le sirven como defensa a la glándula mamaria de la vaca contra organismos patógenos (Bradley y Green, 2005).

Las células somáticas están constituidas por una asociación de leucocitos y células epiteliales. Los leucocitos se introducen en la leche en respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una enfermedad o, a veces, a una lesión. Las células epiteliales se desprenden del revestimiento del tejido de la ubre (Blowey y Edmondson, 1995).

Se denomina a las células de la leche, a aquellas células propias del cuerpo (somáticas) en la leche. Estas provienen de la sangre y del tejido de la glándula mamaria. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y debido a su cercana relación con la composición de la leche un criterio muy importante de calidad de la leche (Wolter y Kloppert, 2004).

Las bacterias ambientales están presentes en el medio ambiente de la vaca, en su piel, pesebre, charcos de agua, etc. y penetran en la ubre cuando se dan determinadas condiciones. Una vez que las bacterias atacan las células del interior de la glándula mamaria la respuesta inmunitaria del organismo es enviar glóbulos blancos de la sangre para neutralizar a las bacterias invasoras. Estos glóbulos blancos son en esencia lo que constituye los conteos de células somáticas (CCS). Un alto CCS en la leche de vacas individuales o en el tanque de enfriado significa que las bacterias han invadido la glándula de la vaca (García, 2004).

2.13.6 Mohos y Levaduras

En general los mohos y las levaduras utilizan diversos tipos de nutrientes y sustratos tanto sencillos como complejos, poseen gran cantidad de enzimas hidrolíticas y algunos se cultivan para obtener amilasas pectinazas, proteinazas y lipasas (IBNORCA, 2003).

2.15 Mastitis

La mastitis es el nombre técnico que se les da al proceso inflamatorio de la glándula mamaria (inflamación de la ubre), esta inflamación se desarrolla debido a la presencia de leucocitos, estos son creados por el sistema inmune de la vaca y transportada hacia la ubre, llegando a producir toxinas, que causan la destrucción del tejido mamario (Loor, 2003).

Según Wattiaux (2002), señala que luego del ordeño el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierta. Los microorganismos del ambiente (material fecal, cama, etc.) o aquellos que se encuentran en las lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir fácilmente o abrir total o parcialmente el canal. La mastitis ofrece muchos aspectos interesantes por eso es necesario en forma adecuada la epizootiología y control; así como las diferentes formas de destacarla.

La mastitis reduce las ganancias tanto con la pérdida temporal de producción de leche como con la pérdida permanente del potencial de producción. Cuando los microorganismos causantes de la mastitis entran a la glándula mamaria, los mecanismos de defensa envían grandes cantidades de leucocitos hacia la leche para intentar destruir las bacterias. Si la infección es eliminada, el recuento de células disminuirá. Si los leucocitos son incapaces de eliminar los organismos, se crea una infección subclínica. En este caso son segregados continuamente leucocitos hacia la leche, que originan un recuento elevado de células (Blowey y Edmondson, 1995).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

La zona de estudio está comprendida por cuatro comunidades (Choquenaira, Copalacaya, Canaviri, Callisaya) y la Estación Experimental de Choquenaira.

3.2 Ubicación Geográfica

La zona de estudio está comprendida entre los $16^{\circ}41'35,58''$ latitud Sur y $68^{\circ}17'14,41''$ longitud Oeste. La altitud de la zona está sobre los 3876 / msnm.



Figura 1. Zona de Estudio de la Estación Experimental de Choquenaira

3.2.1 Fisiografía

El aspecto fisiográfico de la zona, está dada en un 21% por serranías y 79% de planicies; la vegetación corresponde a Bosque Húmedo Montano Subtropical, donde la vegetación primaria dominante son las plantas xerófilas; las especies más representativas que comprende la comunidad vegetal son de tipo herbáceos, arbustos y anuales.

Las plantas que predominan en las praderas nativas son las gramíneas y está relacionado con el sobre pastoreo de vacunos y ovinos.

3.2.2 Clima

Los elementos climáticos en la región son muy variables y contrastantes, siendo la temperatura media de 8,4°C y las extremas fluctúan desde -15°C a 22°C; en tanto, el régimen de lluvias resulta estacionaria, concentrándose las mayores precipitaciones en los meses de Enero a Marzo en algunos años los pluviómetros suelen registrar hasta 590mm y en el resto de los meses suelen ser más reducidas.

Los cambios climáticos son frecuentes en determinados épocas del año, como son las granizadas, heladas y sequias; los efectos sobre los cultivos son determinantes, llegando a ocasionar pérdidas económicas cuantiosas a nivel productor; la evaporación aproximada llega los 1350 mm/año, lo cual hace su condición de árido (seco), sobre todo en los meses de Mayo a Julio.

3.3 Materiales

3.4.1 Material biológico

- Leche natural de vaca

3.4.2 Material de campo

- Una conservadora
- 13 Frascos de 50mL
- 15 frascos de 100mL
- Un cucharon de 100 mL
- Un cronometro
- Una cámara fotográfica
- Un tablero

3.4.3 Materiales de Laboratorio

- 20 Pipetas de 0,1; 0,5; 10 mL
- 2 Buretas de 250 cc
- 100 Cajas petris
- 4 Matraz Erlenmeyer de 50 mL
- Balanza de precisión (2000 g)
- 1 Termómetro de 10 a 200°C
- 2 Mecheros de alcohol
- 2 Asas bacteriológicas
- 200 Tubos de ensayo de 20mL
- 40 Tubos de ensayo de 50mL
- Gradillas

- Hornilla
- 100 Campanas DURHAM
- 5 Frascos de 500 MI

3.3.5 Equipos

- Estufa de cultivo a 37°C
- Autoclave 1,5 atm
- Incubadora a 37°C
- Refrigerador 4°C
- Baño María 44,5 °C

3.3.6 Reactivos

- Caldo cerebro corazón 500g
- Agua fisiológica 1000mL
- Plasma citratado 500g
- Lactosado Caldo 500g
- Mac Conkey Agar 500g
- Saboraud glucosado Agar 500g
- Salmonella Shigella Agar 500g
- Simons Citrato Agar 500g
- Caldo Verde Brillante Bilis 800g

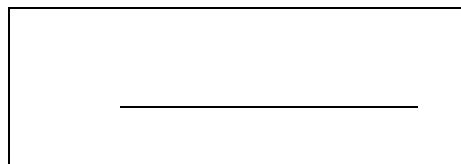
- Reactivo de Kovacs 500g
- Caldo Lauril Sulfato de Sodio 800g
- Tripteina Soya Agar 500g
- Agar Base Sangre 500g

3.4 Metodología

Para el presente trabajo de investigación se realizó mediante la estadística descriptiva, utilizada para todas las variables en estudio.

3.4.1 Determinación del Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra se determinó usando la fórmula siguiente:



Según (Koría, 2007)

Donde:

n=tamaño de la muestra

z=nivel de confianza (95%) (1,96)

N=población de estudio (40 productores)

e=error estimación (0,10)

p=probabilidad de éxito (0,95)

q=probabilidad de fracaso (0,05)

3.4.2 Toma de Muestras

Para muestras líquidas se sigue la Norma Boliviana NB - 199/77, que consiste en:

Los recipientes fueron de vidrio de tapas roscas, que resistieron el proceso de esterilización (esterilización mediante el autoclave). La leche contenida en baldes de ordeño completo, se mezclaron uniformemente con un cucharón, teniendo cuidado que la mezcla sea uniforme y que la composición no varíe en el momento del análisis, la leche tuvo una temperatura de 0-6°C.

3.4.3 Transporte de Muestras

Las muestras se llevaron a laboratorios de análisis, inmediatamente después de haber sido recogidas de las comunidades en estudio, para ser analizadas en el día en que fueron tomadas. La temperatura durante el transporte no sobrepasó de 6°C, ya que se utilizó plastaformas de conservación, y esto hizo que la temperatura se mantenga en ese rango. Se las puso en un conservador tratando en lo posible de no ser agitadas ya que podrían modificar la consistencia del producto.



i) Lavado de frascos



ii) Muestras de leche

Figura 2. Toma de muestras de leche de las Comunidades

3.4.4 Fase de Laboratorio

El análisis de las diferentes variables en estudio se las realizó en el laboratorio de la Facultad de Agronomía (Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Mesófilos aerobios, mohos y levaduras y Células somáticas).

3.4.5 Situación de Zona Lechera de la Estación Experimental de Choquenaira

Las comunidades que comprenden la zona lechera de la Estación Experimental de Choquenaira son: Choquenaira, Copalacaya, Canaviri y Callisaya. Estas comunidades dan en total un promedio de 1500litros/día, llegando a una producción de 10500litros/semana (Arano, 2010).

3.4.6 Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra obtenido fue 13, con el cual se determinó el número de productores a trabajar y donde se realizó un muestreo aleatorio simple para realizar el estudio con las familias productoras de leche de la zona.

3.4.7 Análisis Microbiológico

3.4.7.1 Recuento de Bacterias Mesófilos Aerobios. El recuento de las bacterias mesófilos aerobios se realizó mediante la Norma Boliviana NB- 32003 en ufc/mL, el cual consiste en:

- Primeramente desinfectar todas las superficies con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 3% para eliminar la mayoría de los microorganismos presentes en el laboratorio de análisis.
- Colocar en la autoclave todos los materiales de vidrio y medios de cultivo para esterilizar.

- Se peso el medio de cultivo Tripteina Soya Agar en una balanza de precisión y luego se vertió en un vaso Erlenmeyer luego se añadió agua destilada hasta que disuelva.
- Se preparó las diluciones para cada muestra en: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}
- El método de siembra que se utilizo es vertido en placa.
- Colocar las cajas petris alrededor de los mecheros.
- Verter 0.1 mL de la muestra diluida en cajas petris.
- Se realizo un movimiento circular para homogeneizar.
- Incubar a 37 °C durante 24 h.
- Observar en ese tiempo la formación de colonias
- En caso de que no haya formación de colonias incubar 24 horas más.
- Posteriormente se registro los datos.
- Se procedió a identificar bacterias Gram + y Gram – mediante Tinción Gram.
- Observación en el microscopio



i) Siembra

ii) Incubación a 37°C

iii) Lectura de colonias

Figura 3. Pasos en la determinación de bacterias Mesofilos aerobios en ufc/mL.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$UFC = \frac{Ncc}{FD \times Vs} \times 10^x$$

Donde:

UFC = Unidades formadoras de colonias

Ncc=numero de colonias contadas

FD= factor de la dilución

Vs=volumen de la siembra

Los resultados se expresaron con un solo número entero y un decimal multiplicando por diez elevado a la potencia correspondiente.

3.4.7.2 Recuento de bacterias coliformes totales

Se realizo de acuerdo a la Norma Boliviana NB 32005, la determinación de coliformes totales y fecales en el cual se utilizo dos métodos: técnica de número más probable NMP y recuento en placa.

a) Determinación de coliformes totales en NMP.

El método se basa en la propiedad, que tienen los microorganismos denominados coliformes, de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a una temperatura entre 37° C e incubados durante un periodo comprendido entre 24 a 48 h.

Este método consiste en un ensayo de dos fases una presuntiva y otra confirmativa:

b) Prueba presuntiva

- Se preparó medio de cultivo Caldo Lactosado para coliformes.
- Se preparo dilución para cada muestra en: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}
- Se vertió en 39 tubos de cultivo con tubos Durhan invertidas a 10 mL de Caldo Lactosado.
- Se coloco los tubos en un frasco grande tapado con papel madera y amarrado con cordel para esterilizar en el autoclave.
- Se incubo en Baño María durante 24h. Y se dio 24 h más para aquellos tubos que dieron negativos.

c) Prueba confirmativa para Coliformes Totales.

- De cada uno de los tubos con Caldo Lactosado que han producido gas, se transfirió una azada en tubos de cultivo con Caldo Verde Brillante Bilis, con tubos Durham invertidos.
- Los tubos sembrados se incubaron en Baño María a 44,5°C por 24 horas.
- La presencia de gas indica una prueba positiva para coliformes fecales.

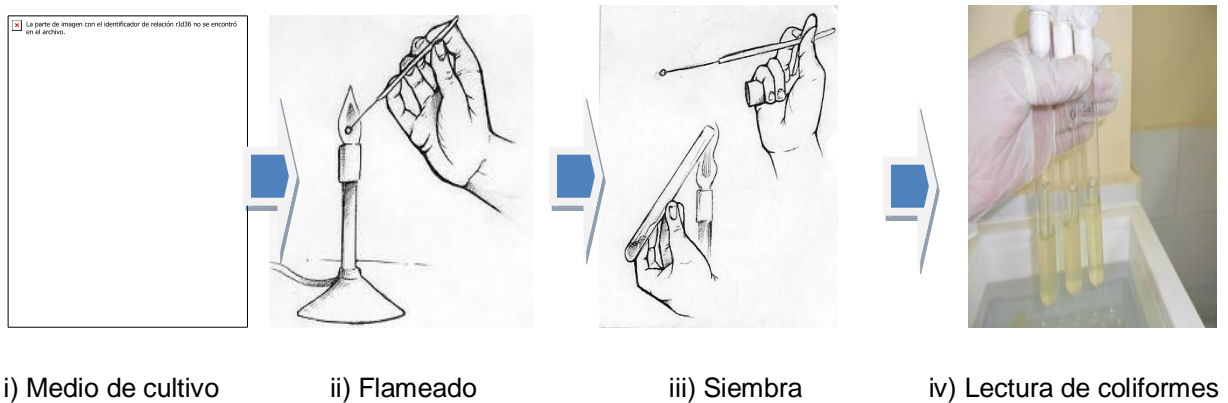


Figura 4. Determinación de los pasos en la identificación de bacterias coliformes.

- Después de 24h, todos los tubos positivos se registran.
- Los datos obtenidos se expresaron en número más probable (NMP) para tres tubos.

3.4.7.3 Recuento de la bacteria *Escherichia coli* en (ufc/mL)

De cada tubo que contiene Caldo Cerebro Corazón con formación de gas, se transfirió una porción con el asa de inoculación y se sembró sobre la superficie del Agar Mac Conkey en cajas petris. Este medio de cultivo es esencial para el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*.



i) Medio de cultivo

ii) Desarrollo de bacterias

iii) Lectura de colonias

Figura 5. Recuento de la bacteria *Escherichia coli*.

- Se incubó las cajas a 37° C por un periodo de 24 h.
- Posteriormente se realizó el recuento de la bacteria *Escherichia coli*.
- Se procedió a identificar mediante Tinción Gram.
- Los datos obtenidos se expresaron con un solo número entero y un decimal por diez elevado a la potencia correspondiente.

3.4.7.4 Presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* en ufc/mL

3.4.7.4.1 Recuento en placa

De acuerdo al Norma Boliviana NB 32004, el método consiste en extender un volumen determinado de las diluciones correspondientes de la leche homogeneizado, sobre la superficie de Agar Base Sangre, en este medio de cultivo se forman colonias negras rodeadas de zonas claras características de *Staphylococcus aureus* este método utiliza la prueba de coagulasa y catalasa.

- Colocar en la autoclave todos los materiales de vidrio y medios de cultivo para esterilizar.
- Se peso el medio de cultivo Agar Base Sangre en una balanza de precisión y luego se vertió en un vaso Erlenmeyer, luego se añadió agua destilada hasta que se disuelva.
- Se preparó las diluciones para cada muestra 1 en 10; 1 en 100; 1 en 1000.
- El método de siembra que se utilizo es por estría. El cual consiste en sembrar sobre el Agar.
- Se incubo a 37 °C durante 24 h.
- Observar después de 48 h la formación de colonias.



i) Medio de cultivo

ii) Crecimiento de bacterias a 37°C

iii) Lectura de colonias

Figura 6. Pasos para la determinación de *Estaphylococcus aureus* en ufc/mL

- Posteriormente se realizó el recuento de colonias sospechosas de *Estaphylococcus aureus*.
- Se realizó la identificación mediante Tinción Gram donde se observaron al microscopio cocos Gram positivos y en racimos.

3.4.7.4.2 Prueba de Coagulasa y Catalasa para la bacteria *Estaphylococcus aureus*

a) Características de la bacteria *Estaphylococcus aureus*

- Gram positivo en racimo.
- Aproximadamente 1 μ m de diámetro.
- Inmóviles.
- No forman esporas.

- La mayoría son anaerobios facultativos
- Crece bien en Agar Sangre a 37°C.
- Presenta un pigmento de color amarillo.
- Catalasa positivo.
- Coagulasa positivo.
- Colonias medianas, cremosas y brillantes

b) Prueba de Catalasa

Consiste en realizar una catalasa, que dará positivo, por la presencia de esta enzima en *Staphylococcus spp*, que desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (desprendimiento de burbujas) y esta prueba nos ayuda a diferenciar de los *Streptococcus spp*.

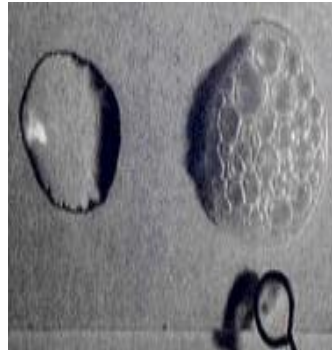
c) Prueba de Coagulasa

Para la detección de *Staphylococcus aureus* se requiere realizar la prueba de la coagulasa que nos permite diferenciar al *S.aureus* de otras especies del género *Staphylococcus*. La coagulasa es una enzima que estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, por lo que comprueba la facultad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de esta enzima. Si es coagulasa positivo, se produce una turbidez alrededor de la colonia, debida a la coagulación del plasma.

Para identificar a la bacteria *estaphylococcus aureus* se realizo las dos pruebas.



i) Prueba de Coagulasa



ii) Prueba de catalasa

Figura 7. Identificación de la bacteria *Estaphylococcus aureus*



Figura. 8 Colonias de la bacteria *Estaphylococcus aureus*.

3.4.7.5 Recuento de Células somáticas. De acuerdo a la Norma Boliviana NB- 914, para la determinación de la presencia de células somáticas en la leche se hizo mediante el método de tiempo de reducción de azul de metileno (TRAM).

Para estimar el número aproximado de microorganismos en la leche cruda se utiliza un método indirecto basado en la reducción del colorante azul de metileno que es un indicador de oxido- reducción (es azul cuando esta oxidado e incoloro cuando esta reducido).

La actividad reductora de los microorganismos se manifiesta por el tiempo de la reducción del colorante a una temperatura de 37 °C la cual se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Tiempo de reducción de Azul de Metileno para Células Somáticas cel/mL

Característica	Tiempo (TRAM)	(Cel/mL)	
Buena a excelente	Mayor a 6horas	<100 000	1×10^5
Regular a buena	Mayor a 3 horas	>100 000	1×10^5
Aceptable	3horas	<500 000	5×10^5
Mala	Menor a 3 horas	>500 000	5×10^5

FUENTE: IBNORCA, 2002.



Figura. 9 Pasos para la Determinación de Células Somáticas

- Homogenizar las muestras de leche inmediatamente antes de procesarlas
- Añadir 9 mL de leche fresca en tubos de cultivo.
- Añadir 1 ml de azul de metileno agitarlos e incubar durante 3-5 horas.
- De los tubos positivos expandir en una porta objetos.
- Lavar con agua corriente.
- Mediante el microscopio contar las células.
- Se registro los resultados tanto en porcentaje como en potencia.

3.4.7.6 Recuento de Mohos y Levaduras. De acuerdo a la Norma Boliviana NB - 32006, el método se basa en la siembra de una suspensión obtenida de una muestra diluida en medio de cultivo selectivo, incubar a una temperatura 37° C durante 72 h (levaduras) y 120 h (mohos).

Las levaduras y los mohos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo, en los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias (Cruz, 1989).

- Encender los mecheros
- Colocar en la autoclave todos los materiales de vidrio y medios de cultivo para esterilizar.
- Se pesó el medio de cultivo Saboraud glucosado Agar en una balanza de precisión y luego se vertió en un vaso Erlenmeyer luego se añadió agua destilada hasta que se disuelva.
- Se preparó las diluciones para cada muestra: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .
- El método de siembra que se utilizó es vertido en placa.
- Se vertió 0.1 mL de la muestra diluida en cajas petris.
- Se vertió el medio de cultivo y se realizó un movimiento circular para homogeneizar.
- Se incubó a 30 °C durante 72 h para levaduras y 120 h para mohos.
- Posteriormente se observó en ese tiempo la formación de colonias.



i) Siembra ii) Desarrollo de mohos a 37°C iii) Lectura de colonias iv) Identificación

Figura 10. Determinación de Mohos y Levaduras

Después de contar las colonias se realizó la identificación de las especies mediante Tinción Gram y la observación en el microscopio para identificar a que familia de hongos pertenece.

- Se empleó la fórmula mencionada en la técnica de recuento de bacterias mesofilos aerobios.
- Posteriormente se registro los datos.
- Los resultados se expresaron con un solo número entero y un decimal multiplicando por diez elevado a la potencia correspondiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Recuento de Bacterias Mesofilos Aerobios

De acuerdo a Norma Boliviana NB 32003, se realizo el recuento total de bacterias mesofilas aerobios después de incubar las cajas petris a 37° C durante 48 h, se calculo el número de bacterias aerobias mesofilas en unidades formadoras de colonias (ufc/mL).

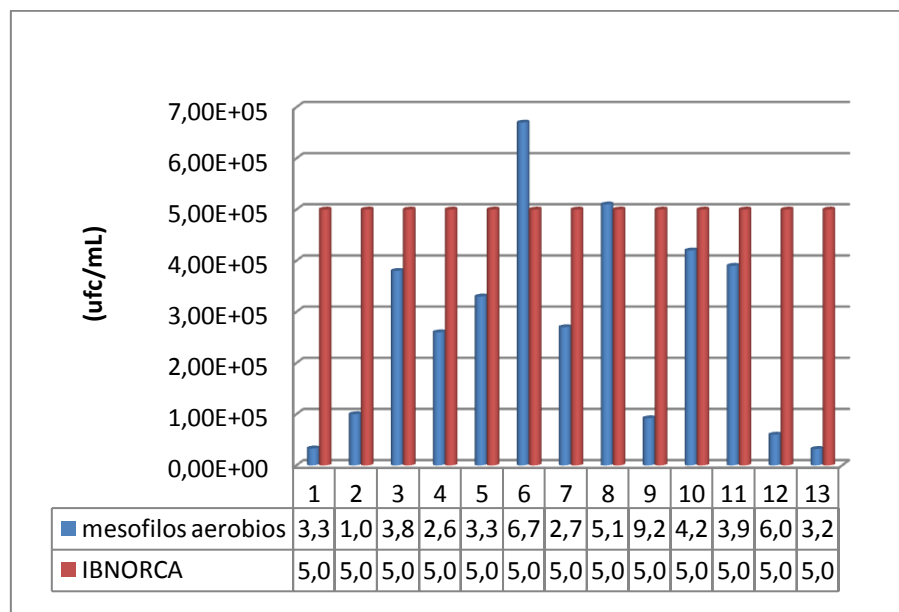


Figura 11. Recuento Total de bacterias Mesofilos Aerobios en leche.

De acuerdo a la Figura 11 podemos notar que el recuento total de bacterias mesofilas aerobios esta dentro de la norma establecido por IBNORCA para 12 muestras analizadas para un total del porcentaje 92,30 %, lo que no garantiza que

hasta terminar de recolectar la leche en casos cerca o pasado el medio día la carga permanezca igual, la tendencia es que estos microorganismos lleguen a multiplicarse muy rápidamente si no es manejado en condiciones adecuadas.

Por eso en este caso dio un recuento levemente elevado una de las últimas muestras tomadas dando un porcentaje de 7,7% con un recuento total máxima de 680 000 ufc/mL. Lo que puede denotar el estado de estas muestras tal vez sea por un mal manejo del ordeñador o también puede deberse a la hora de recolección de la leche y esta leche puede causar malestares en las personas que consuman.

Las diferencias se atribuyen al manejo de higiene de cada productor perteneciente a las diferentes comunidades, como lo realiza al momento de ordeño, del transporte y acopio de la leche fresca y cruda de las comunidades en estudio.

Los resultados muestran que la leche de la zona cumple con los rangos establecidos por IBNORCA cuyo parámetro máximo es de 5×10^5 ufc/mL, que dice que leche por debajo de este rango son consideradas leches aptas para el consumo y por encima 1 000 000 ufc/mL, son considerados leches de no aptos para el consumo. Las muestras sujetas a análisis están dentro de estos rangos por tanto podemos decir que la leche contiene una menor carga bacteriana respecto al recuento total de bacterias mesófilas por tanto podemos decir que es de buena calidad y puede ser utilizado en la planta de transformación de productos en la estación experimental de Choquenaira.

FAO (1998) indica, que las bacterias mesófilas aerobias es uno de los indicadores del estado sanitario de un alimento. Un recuento muy variable determina un estado sanitario poco satisfactorio, condiciones de tiempo durante el ordeño y transporte y temperatura no idóneas durante la producción o almacenamiento del alimento

recuentos elevados predicen la posibilidad de que el alimento se descomponga ya que la mayoría de ellos contienen de 100 000 a 1 000 000 de unidades formadoras de colonias por cada mililitro en el momento en que la descomposición es evidente.

Tanto las temperaturas del ambiente como a las registradas en el momento de la toma de muestras es uno de los factores que influyen directamente en la proliferación de las bacterias mesofilos aerobios.

El factor del ordeño es importante en las concentraciones de los mesofilos aerobios, debido a que si las vacas no son ordeñadas completamente y son sometidas a secado en forma drástica, la influencia de que los microorganismos presentes infecten la ubre es indudable. Copa (1999), describe que en el altiplano la mayoría de las vacas producen leche por un periodo de 7 a 8 meses. Muchas familias dejan de ordeñar cuando las vacas tienen poca leche que se junta en la ubre y favorece a que las bacterias se reproduzcan y generen una mastitis subclínica.

Diferentes tipos de daños pueden causar infecciones en el tejido mamario dentro de la ubre, incluyendo toxinas producidas por bacterias, químicos que irriten el pezón, o cualquier trauma recibido por el pezón o la ubre. En vacas lactantes, las mastitis es casi exclusivamente causada por bacterias que llegan a invadir la ubre, se multiplican dentro del tejido mamario, y generan toxinas que son causantes de lesiones. Al respecto, Llor (2003), menciona que cualquier trauma que recibiera el pezón también puede afectar el grado de susceptibilidad hacia invasiones bacterianas, colonización y eventualmente infecciones, traumas físicos pueden llegar a destruir la queratina y una vez que el trauma ha ocurrido, el esfínter del pezón puede permanecer abierto.

Cabe enfatizar que las concentraciones de mesofilos aerobios están por debajo del rango establecido por IBNORCA. Arano (2010), en estudios realizados en

Choquenaira presento que la zona de estudio presentaba las más bajas concentraciones con (41 900 ufc/mL) y comparando con los resultados obtenidos presentan una diferencia de 628 100 ufc/mL esta diferencia se debe a que las familias han dejado de ordeñar cuando las vacas tenían poca leche y esta favorece a que las bacterias se reproduzcan.

Cruz (1989), describe que después del ordeño, la microflora de la leche aumenta en grandes proporciones, lo que depende de la cantidad inicial, o sea de la microflora primaria, la temperatura y el tiempo de conservación. El desarrollo de la microflora de la leche hasta la total de la utilización de las sustancias de los microorganismos está supeditado a la fase bactericida. Inmediatamente después del ordeño se encuentran en la leche unas sustancias bactericidas denominadas Lactinin I y Lactinin II, las que son segregadas junto con la leche de la glándula mamaria, y que no permiten el desarrollo de microorganismos durante un tiempo determinado.

El Lactinin I se encuentra en el calostro y el Lactinin II en la leche unida a los glóbulos de grasa. La duración de esta fase depende de la temperatura de la leche, las temperaturas bajas aumentan la acción de las sustancias bactericidas y las temperaturas altas la disminuyen. Esta es la causa por la que, una vez realizado el ordeño, la leche se enfría a una temperatura alrededor de de 283 K (10°C).

Finalizada la acción de las sustancias comienza el desarrollo de los microorganismos que se encuentran en la leche.

El control sanitario en la preparación de alimentos es determinante para reducir los factores de riesgo que influyen en la transmisión de enfermedades por alimentos para proteger la salud del consumidor. Los criterios microbiológicos ofrecen a la industria alimentaria y a los organismos reguladores las directrices para controlar los sistemas de elaboración de alimentos (Balcazar, 1996).

4.2 Variable Coliformes Totales

Se realizo de acuerdo a la Norma Boliviana NB 32005, la determinación de bacterias coliformes totales utilizando el método de número más probable NMP, el cual consiste en sembrar las muestras de leche en caldos nutritivos durante 24 a 48 h.

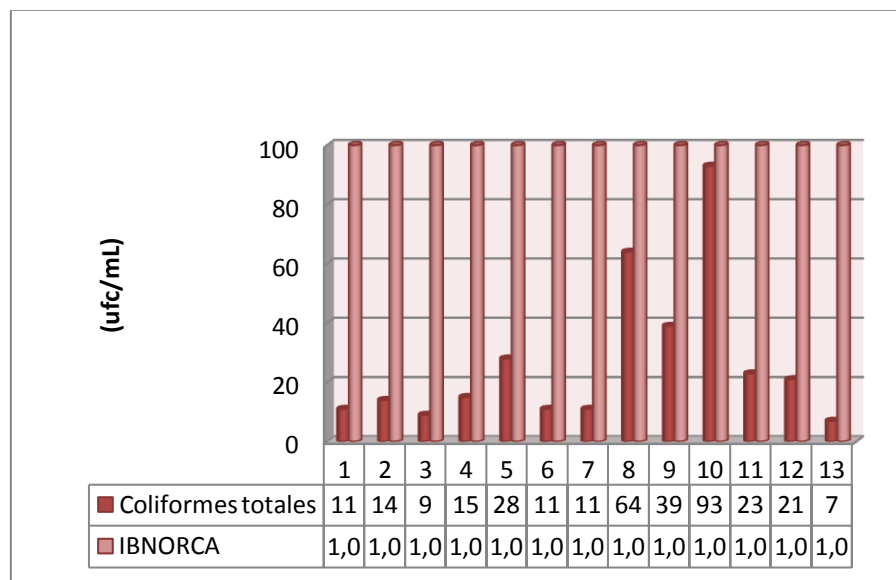


Figura 12. Recuento total de bacterias Coliformes totales en (NMP/mL)

De acuerdo a la figura 12 podemos notar que la determinación de bacterias coliformes totales en NMP/mL esta dentro de la norma IBNORCA para todas las muestras analizadas alcanzando como máximo 93 coliformes lo que garantiza una leche exenta de contaminación fecal.

Los resultados muestran que la leche de la zona cumple con los rangos establecidos por IBNORCA cuyo parámetro máximo para coliformes es de 100 coliformes en NMP/mL de leche, que por debajo de este rango son consideradas leches aptas para el consumo. Y por encima una leche con mayor carga bacteriana por coliformes dando una leche de mala calidad. Las muestras sujetas a análisis están dentro de estos rangos por tanto podemos decir que la leche es de buena calidad respecto al control microbiológico y puede ser utilizado en la planta de transformación de productos en la estación experimental de Choquenaira.

El número de coliformes totales en la leche puede depender, hasta cierto punto de la raza. La cantidad de coliformes es una variable que está unida más al manejo sanitario de la vaca y a la alimentación y por decirlo así a la calidad de agua que esta pueda consumir.

Camacho (2009), indica que el grupo coliformes es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, sin embargo, las características de sobrevivencias y la capacidad para multiplicarse fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que el grupo coliformes se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; conforme mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente.

Se concuerda con Davis (1991), indica que los alimentos suministrados a las vacas lecheras muchas veces son causantes de elevar las concentraciones de coliformes. Debido a que estas bacterias se encuentran presentes en el agua, suelo, polvo, etc., su recuento es uno de los medios más significativos para la apreciación de la calidad higiénica de la leche cruda.

De igual manera Rueeg (2003), nos dice que los alimentos son fuentes responsables, muchas veces, de la presencia de coliformes totales en la leche cruda, al igual que el agua. La presencia elevada de concentraciones de coliformes puede elevarse hasta el punto de llegar a ser letal para el animal productor de leche.

La contaminación ambiental durante el ordeño es otra causa, para que los niveles de contaminación debido a coliformes se encuentren presentes. Otro factor también importante es el producto de deficientes prácticas de manejo, permitiendo que los microorganismos de la piel de los pezones, manos del ordeñador, baldes y todo el entorno del ordeño, lleguen a la leche. Esta es la fuente de contaminación más importante y variable, debido a que aporta un gran número de microorganismos, esencialmente el de coliformes totales.

Cottrino (2002), confirma este hecho, al plantear que la contaminación ambiental, es la que se produce alrededor del ordeño por microorganismos que provienen de la piel de los pezones, manos del ordeñador, pezoneras, agua, aire y en general de todo el ambiente que rodea el sitio de ordeño. Esta es la fuente de contaminación más importante, tanto por el número como por la variedad de bacterias que puede llegar a la leche; es también muy susceptible a modificarse ya sea en forma positiva o negativa y por esto es muy fácil tener un buen recuento de bacterias en un ordeño y al siguiente uno muy alto o viceversa.

IBNORCA (2003), indica que las bacterias coliformes son bacilos cortos Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos no esporulados, que fermenten glucosa y lactosa con formación de ácido y gas. Los coliformes son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario inadecuado. La presencia de estos microorganismos en cantidades mayores al permitido indica: Mala manipulación o

procesamiento del alimento, riesgo indirecto mayor probabilidad de existencia de bacterias entéricas patógenas.

Cabe enfatizar que las concentraciones de coliformes totales están por debajo del rango establecido por IBNORCA. Arano (2010), en estudios realizados en Choquenaira presento que la zona de estudio presentaba las más altas concentraciones (35400 ufc/mL) y comparando con los resultados obtenidos presenta una diferencia muy elevada de 35700 ufc/mL esta diferencia se debe a que las familias han mejorado bastante en lo que es la calidad higiénica.

El recuento de bacterias coliformes es una medida que refleja la exposición de la leche a material fecal. Esta contaminación puede ser directa, como en el caso de ordeño sucio o indirecta cuando bacterias coliformes comienzan a multiplicarse en el sistema de ordeño. Ocasionalmente, una vaca con mastitis causada por coliformes, puede transmitir gran número de bacterias a la leche. El recuento de coliformes es especialmente importante dado que ciertas bacterias de este grupo son capaces de causar serias enfermedades en humanos.

El recuento de bacterias coliformes es el número de colonias en una muestra que se desarrolla y forma distintiva colonias contables en Agar Mack Conkey después de haber estado a 37°C durante 24 horas. Generalmente coliformes están presentes en alimentos contaminados con materia fecal o el medio ambiente contaminado.

4.3 Recuento de la bacteria *Escherichia coli* en la leche

Se realizó de acuerdo a la Norma Boliviana NB 32005, la determinación de la bacterias *Escherichia coli* utilizando dos métodos el método de número más probable NMP y recuento en placa.

De cada tubo que contiene caldo cerebro corazón con formación de gas, se transfirió una porción con el asa de inoculación y se sembró sobre la superficie de placas de Agar Mac Conkey el cual es esencial para la formación de colonias de esta bacteria *Escherichia coli*.

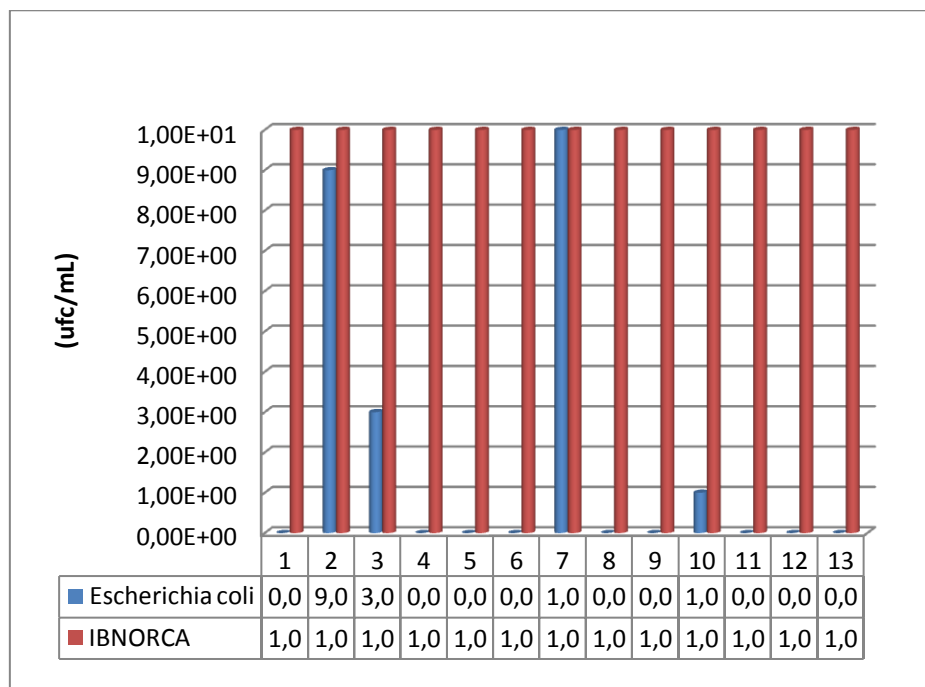


Figura 13. Recuento de la bacteria *Escherichia coli* en la leche.

De acuerdo a la Figura 13 podemos notar que el recuento de la bacteria *Escherichia coli* en ufc/mL esta dentro de la norma IBNORCA para todas las muestras analizadas alcanzando como máximo 10 ufc/mL, lo que garantiza una leche exenta de contaminación fecal.

Tomando en cuenta este comportamiento respecto a las bacterias patógenas *Escherichia coli*, podemos indicar que la leche de la zona de estudio está dentro del rango establecido por la Norma Boliviana.

Los resultados muestran que la leche de la zona cumple con los rangos establecidos por IBNORCA cuyo parámetro máximo para *Escherichia coli* es de 10 ufc/mL, que por encima de este rango son considerados leche con mayor contaminación fecal y esto puede llegar a causar enfermedades en las personas como diarrea, vomito, alergia, fiebre tifoidea, etc.

Las muestras sujetas a análisis de las diferentes comunidades están por debajo del rango establecido por IBNORCA por tanto podemos decir que la leche es de buena calidad y puede ser utilizado en la planta de transformación de productos en la Estación Experimental de Choquenaira.

IBNORCA indica que la bacteria *E.coli* se utiliza como microorganismo indicador de la contaminación de origen fecal. Su hábitat natural es el hombre y animales de sangre caliente y debido a esto se ha utilizado como indicador dentro del grupo coniformes, es el microorganismo de mayor significado sanitario.

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, puede estar aislado o en parejas y tener flagelos se desarrolla fácilmente sobre medios con nutrientes simples. Las colonias

pueden ser lisas, poco convexas, húmedas de superficie brillante, con el borde completo o seco y áspero. Casi todas las cepas fermentan la lactosa.

Magariños (2001), indica que el lavado de los pezones, previo al ordeño, es una forma fundamental para reducir la contaminación microbiana de la leche .el agua empleada debe ser limpia y de ser posible con algún desinfectante, utilizando toallas desechables para el secado.

La Norma Peruana (2002) señala que los coliformes fecales se encuentran en la categoría 1000 ufc/mL el cual se localiza dentro el límite de calidad de leche cruda. Por tanto la leche producida en la Zona de estudio se encuentra dentro de las Normas Peruanas.

La variación de la presencia de *Escherichia coli* entre muestras se debe al tipo de manejo que cada productor lechero lo realiza en el momento del ordeño y la recepción para la entrega a la planta de transformación, el factor que afecta directamente en la cantidad de *Escherichia coli* es el tiempo en el cual la leche se encuentra expuesta al medio ambiente y por las condiciones higiénicas del manipulador desde el momento del ordeño hasta la entrega de la leche a la planta de transformación de productos lácteos debido a que las bacterias de *Escherichia coli* habitan en el medio ambiente principalmente en el agua y el suelo (Larragaña,1999).

ICMSF (2000), indica que los coliformes fecales es un nuevo término surgido de los intentos para encontrar métodos rápidos y seguros de detectar la presencia de *E.coli* los cuales pueden fermentar la lactosa a temperaturas superiores a la normal entre (44-45,5 °C) y a los 44,5 °C exactamente se hallan los coliformes fecales y son por consiguiente, útiles para indicar contaminación de origen fecal del animal o del ordeñador.

Camacho (2009), menciona que el grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 horas, de incubación a una temperatura de 44,5°C. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli*.

Kaper (1998), indica que la especie *Escherichia coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes habilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc), pero las infecciones provocadas por este germen no son causados por las cepas que habitan normalmente en los intestinos, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización.

Las cepas de *Escherichia coli* patógenas entéricas y en particular los enteropatógenos clásicos son la causa principal de diarrea en los países pobres, y llevan a la muerte cerca de un millón de niños por año. (Montano, 1991).

El recuento de la bacteria *Eschechichia coli* es una medida que refleja la exposición de la leche a material fecal. Esta contaminación puede ser directa, como en el caso de ordeño sucio o indirecta cuando bacterias coliformes comienzan a multiplicarse en el sistema de ordeño. El recuento de *Escherichia coli* es especialmente importante ya que la presencia de esta bacteria indica una contaminación con materia fecal ya sea del animal o del ordeñador, y cuando encontramos una carga por encima de las normas nos puede causar enfermedades a los consumidores.

El recuento de *Escherichia coli* es el número de colonias en una muestra que se desarrolla y forma distintiva colonias contables en Agar Mack Conkey después de haber estado a 37°C durante 24 horas.

4.4 Recuento de la bacteria *Estaphylococcus aureus* en la leche.

De acuerdo a la Norma Boliviana NB 32004, El método consiste en extender un volumen determinado de las diluciones correspondientes de la leche homogeneizado, sobre la superficie de Agar Base Sangre, en este medio de cultivo se forman colonias negras rodeadas de zonas claras características de *Staphylococcus aureus* este método utiliza la prueba de coagulasa y catalasa.

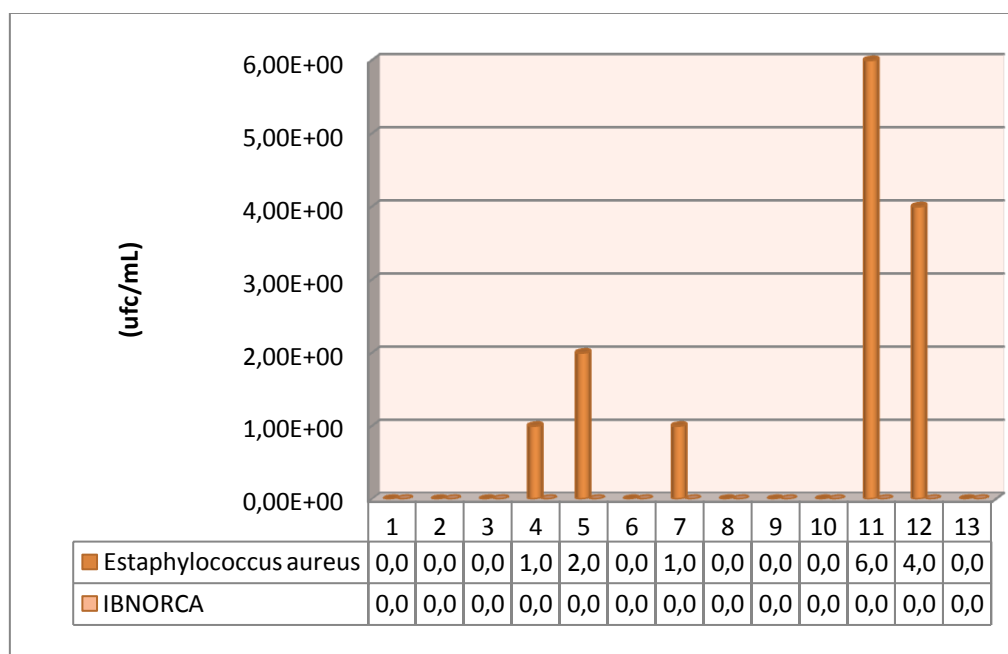


Figura 14. Recuento de la bacteria *Estaphylococcus aureus* en (ufc/mL)

De acuerdo a la Figura 14 podemos notar que el recuento de la bacteria *Estaphylococcus aureus* en ufc/mL está por encima de la norma IBNORCA para cinco muestras analizadas alcanzando como máximo 6 ufc/mL, lo que no garantiza una leche de buena calidad.

Los resultados respecto a la presencia de la bacteria *Estaphylococcus aureus* muestra que la leche de la zona no cumple con los rangos establecidos por IBNORCA, cuyo parámetro para *Estaphylococcus aureus* es ausencia de estos microorganismos ya que la presencia de la misma indica leche contaminada por mastitis y esto puede llegar a causar enfermedades en las personas como alergias, fiebre tifoidea, intoxicación estaphylococias, etc.

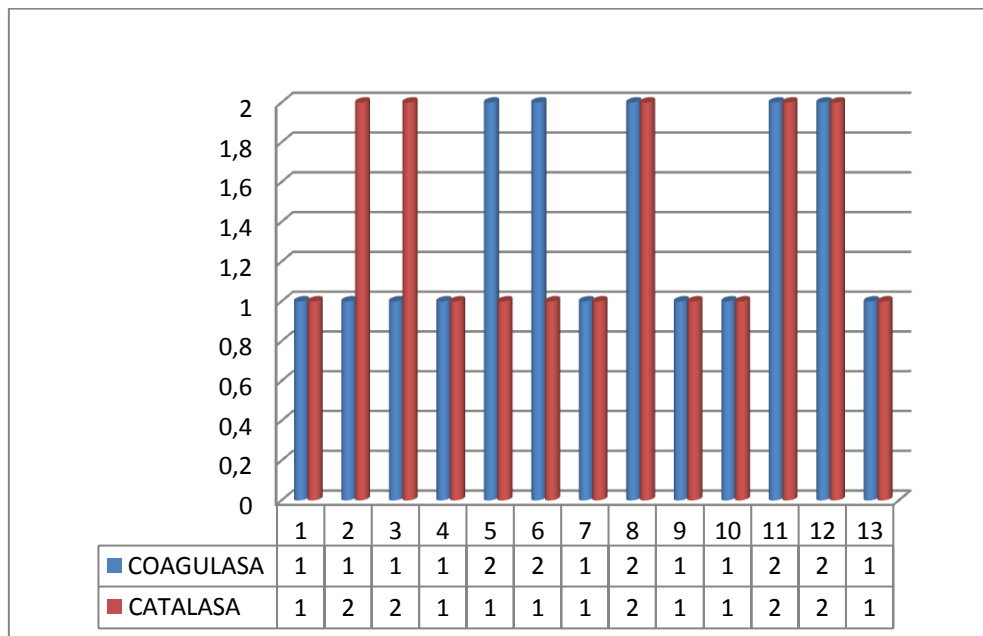


Figura 15. Prueba de Catalasa y Coagulasa para *Estaphylococcus aureus*.

De acuerdo a la Figura 15 podemos notar que dio resultados positivos para algunas colonias sospechosas de la bacteria *Estaphylococcus aureus*.

Para la detección de *Staphylococcus aureus* se requiere realizar la prueba de la coagulasa que nos permite diferenciar al *S.aureus* de otras especies del género *Staphylococcus*. Si es coagulasa positivo nos indica que hay presencia de esta bacteria en la leche.

La prueba de catalasa nos indica que hay presencia de este género en la leche, pero sin especificar que especie es. Por eso se realiza una prueba de coagulasa para identificar *estaphylococcus aureus*.

IBNORCA indica que la presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento, se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel, boca y fosas nasales de los manipuladores de alimentos, material, equipos sucios y materias primas de origen animal contaminados.

Las intoxicaciones estafilococicas son causadas por la ingestión de alimentos que contienen una de las entero toxinas preformas producidas por esta bacteria patógena *Staphylococcus aureus*.

Las diferencias existentes se atribuyen a las temperaturas ambientales, además de la higiene durante y después del ordeño y principalmente del ordeñador debido a que el hombre es el principal portador de esta bacteria ratificando lo dicho FAO(1998), indica que la fuente más importante de *Estaphylococcus aureus* es el hombre, cerca del 40% de personas normales adultas contienen esos organismos en la nariz, en la garganta por consiguiente, el alimento puede contaminarse al ser tocado o por rozaduras de las manos que pueden contener millones de bacterias.

Hayes (1993), indica que el *Estafilococos aureus* es el nombre general que se le da a una clase de bacterias capaces de causar mastitis (inflamación de la ubre) en las vacas lecheras. La mastitis a *Stafilococcus aureus* es generalmente descripta como contagiosa. Las encuestas reportaron el aislamiento de *S. aureus* de cultivos de leche de tanque en el 43 al 92% de los hatos muestreados. Los signos clínicos van desde la presencia de leche anormal a mastitis gangrenosa. Estos patógenos pueden causar episodios de mastitis leve a moderada que parecieran remitir con o sin tratamiento.

Larragaña (1999), indica que la bacteria *Estaphylococcus aureus* es el más propagado en el ser humano se localiza en las fosas nasales que son su reservorio principal (se encuentra 20 a 50% de sujetos sanos) desde allí se disemina a la cara manos y piel, ocasionalmente se puede aislar en las heces, aire superficies, aguas dulces y de mar, superficies de plantas etc.

El elevado contenido de *Estaphylococcus aureus* es un peligro para la seguridad alimentaria al respecto FAO (1998) indica que los organismos patógenos potenciales tales como *Bacillus cereus* y el *Estaphylococcus aureus*, al desarrollarse en los alimentos, suelen producir enterotoxinas, que provocan la intoxicación de los alimentos. Las enterotoxinas son termoestables y no son destruidas por la pasteurización.

Larragaña (1999), indica que el *Estaphylococcus aureus*, al desarrollarse genera toxina, no alteran las características de la leche en su olor ni sabor, los síntomas de envenenamiento por estafilococos son nauseas, vómitos, contracciones abdominales, postración y diarrea.

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos humanos no esporo formador más resistente, pues puede sobrevivir por extensos periodos de tiempo. Es por esto que para algunos alimentos procesados o tratados, *S. aureus* es un buen indicador del grado de contacto humano, o con alimentos naturales no tratados de origen animal dentro de la fábrica de alimentos (ICMSF. 2000). Por esta razón, se debe realizar la búsqueda de *S. aureus*; pues su presencia indica insuficiencia en los tratamientos con calor como pasteurización de la leche y en el uso de agentes químicos sanitizantes que generalmente destruyen a este microorganismos (Schoeller, 2001).

De igual manera Doyle (1997), menciona que el *Stafilcoccus aureus* se puede aislar de varias partes del cuerpo, inclusive de la piel de los pezones y la nariz. Una vez que *S. aureus* entra en la glándula mamaria, invade profundamente las células secretoras y los conductos. La infección a *S. aureus* produce tejido cicatrizal y abscesos en la ubre. Esta destrucción tisular limita la producción de leche y la respuesta al tratamiento del cuarto en cuestión.

Aznar *et al.*, (2005) indican que las vacas infectadas con *S. aureus* pueden presentar múltiples episodios clínicos durante la misma lactancia. La leche de las vacas infectadas puede parecer normal o verse de otro color, con coágulos y grumos. Y los conteos de células somáticas pueden sobrepasar el 1 000 000 de células/mL. Es raro que tanto una vaca como una ternera desarrollen gangrena o “bluebag” a causa de una infección a *S. aureus*. Las terneras pueden infectarse en cualquier momento de la lactancia.

4.5 Determinación de Células somáticas en la leche cruda.

De acuerdo a la Norma Boliviana NB 914, se determino la presencia de células somáticas en la leche se hizo mediante el método de tiempo de reducción de azul de metileno (TRAM) que consiste en:

- Mezclar bien las muestras de leche inmediatamente antes de procesarlas; añadir 9 mL de leche fresca en tubos de cultivo y luego añadir 1 ml de azul de metileno agitarlos e incubar durante 3 a 6 horas.

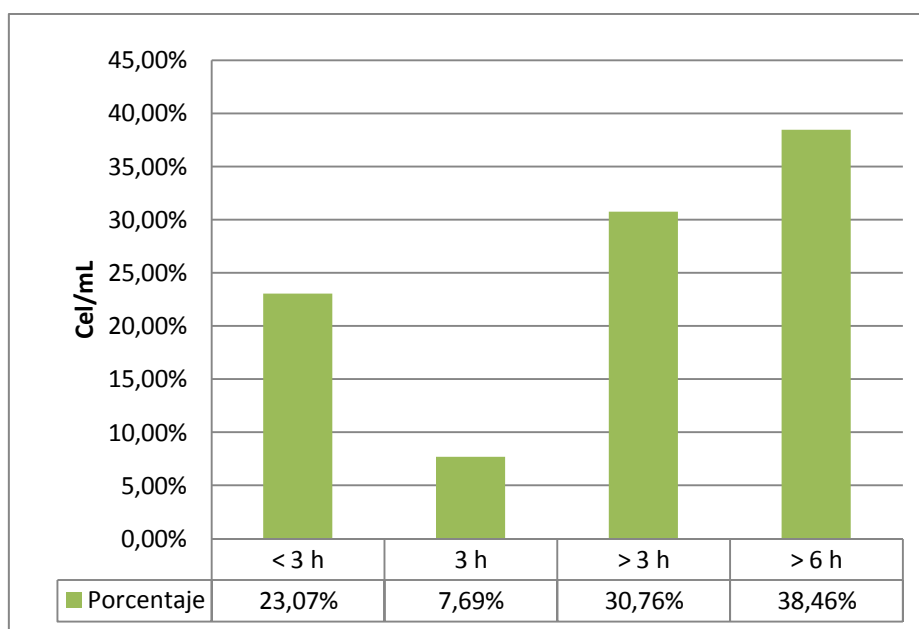


Figura 16. Recuento de células somáticas en (ufc/mL)

Los resultados de la prueba tiempo de reducción del azul del metileno (TRAM) para las muestras en análisis se determino lo siguiente:

Tabla 2. Resultado de la prueba TRAM para la leche cruda

Característica	Tiempo	Cantidad de muestras	Porcentaje
Buena a excelente	Mayor a 6 horas	5	38,46%
Regular a buena	Mayor a 3 horas	4	30,76%
Aceptable	3 horas	1	7,69%
Mala	Menor a 3 horas	3	23,07%

De acuerdo a la Tabla 2 podemos decir que el 76,93% de las muestras son aceptables respecto a células somáticas, el restante 23,07% de las muestras analizadas en la Zona de Estudio pueden presentar una elevada carga bacteriana mayor a 500 000 cel. /mL.

IBNORCA (2002), indica como una leche aceptable para el consumo con conteos menores a 500 000 cel/mL y que por encima de 1 000 000 cel/mL son consideradas leches no aptos para el consumo. Por tanto podemos decir que las muestras analizadas respecto a células somáticas están dentro de la Norma Boliviana IBNORCA.

Las diferencias se atribuyen a la higiene de cada productor perteneciente a las diferentes comunidades como lo realiza en el momento del ordeño es invisiblemente insuficiente en las comunidades presentan variación de células somáticas están dentro del rango el 91,22% de las muestras analizadas y el restante está por encima del rango establecido por IBNORCA.

Al respecto Fil (1985) citado Por Ponce (1990), señala que un incremento en las células somáticas, provoca alteraciones en la composición de la leche, cambios en sus propiedades físicas y alteraciones en la fabricación de derivados lácteos además de tener posibles implicaciones en la salud. Por lo tanto en los meses de agosto y julio se tiene elevados números de células somáticas que él puede deberse a los cambios climáticos.

Wattiaux (2002), menciona que las células somáticas en la leche no afectan la calidad nutricional en sí. Ellas son importantes como indicadores de otros procesos que pueden estar sucediendo en el tejido mamario, incluyendo una inflamación. Cuando las células se encuentran presentes en cantidades mayores del medio millón por mililitro, existe una razón de sospechar mastitis.

Las bacterias ambientales están presentes en el medio ambiente de la vaca, en su piel, pesebre, charcos de agua, etc. y penetran en la ubre cuando se dan determinadas condiciones. Una vez que las bacterias atacan las células del interior de la glándula mamaria la respuesta inmunitaria del organismo es enviar glóbulos blancos de la sangre para neutralizar a las bacterias invasoras. Estos glóbulos blancos son en esencia lo que constituye los conteos de células somáticas (CCS). Un alto CCS en la leche de vacas individuales o en el tanque de enfriado significa que las bacterias han invadido la glándula de la vaca (García, 2004).

El mismo autor menciona que más del 98% de las células somáticas que se encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre. Un alto conteo de células somáticas se asocia con la pérdida de la producción de leche.

Las células somáticas son simplemente células del organismo (varios tipos de leucocitos o células blancas de la sangre) y normalmente están presentes en la leche en niveles bajos. La presencia de un incremento del número de estas células dentro del alveolo, es un indicador como respuesta a la infección; aún cuando no han sido detectadas al observar la leche de la vaca, (ejemplo en la mastitis subclínica) (Carrión,2001).

Hernández (2003), indica que el secado de la vaca no se hace correctamente es posible que dentro de la primera semana después del parto se presenten conteos celulares elevados. Al final de la lactación, como disminuye la cantidad de leche, los conteos celulares aumentan en las vacas que tienen mastitis subclínica.

El conteo de células somáticas, automáticamente tiende a aumentar a medida que la vaca llega al período final de la lactancia. A medida que la vaca se seca hay un aumento de células somáticas que pasan a la leche. Además, la vaca produce menos leche, de manera que el número normal de células se concentra en un volumen menor de leche.

Las células somáticas son células sanguíneas que combaten las infecciones y se producen naturalmente en la leche. La presencia de mastitis (infección de la glándula mamaria) en la vaca aumenta el recuento de células somáticas. El recuento de células somáticas puede ser determinado por el examen microscópico directo o por los instrumentos electrónicos diseñado para contar las células somáticas.

4.6 Recuento de Mohos y Levaduras

De acuerdo a la Norma Boliviana NB 32006, el método se basa en la siembra de una suspensión obtenida de una muestra con el diluyente y sus diluciones decimales, en medio de cultivo selectivo, incubados a una temperatura entre 22 a 25° C durante 72 h (levaduras) y 120 h (mohos)

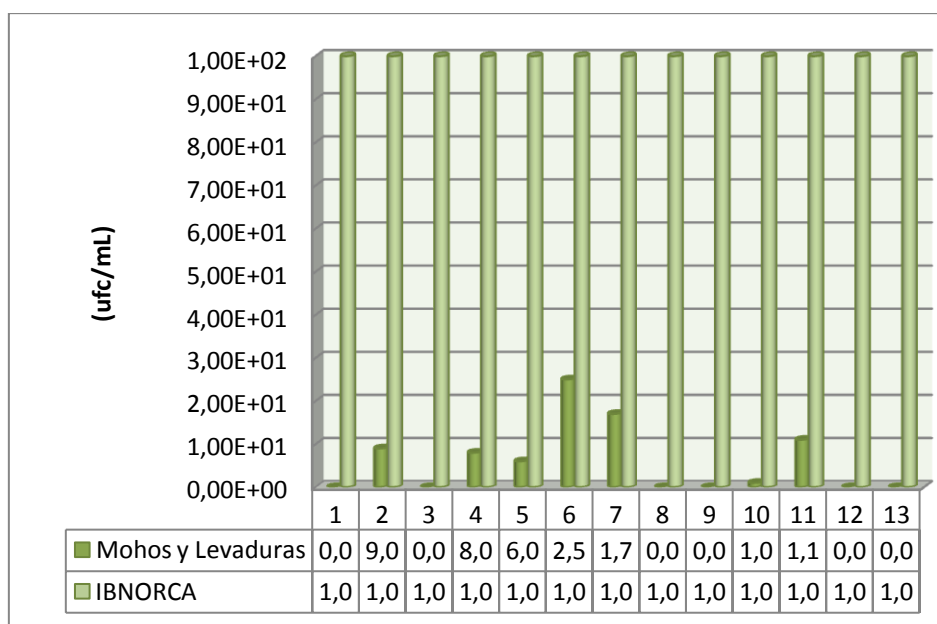


Figura 17. Recuento total de Mohos y Levaduras en la leche cruda.

De acuerdo a la figura 17 podemos notar que el recuento total de los mohos y levaduras están dentro de la norma IBNORCA para todas las muestras analizadas, lo que garantiza el uso de esta materia prima en la planta de transformación de productos lácteos en la estación experimental de Choquenaira.

Tomando en cuenta este comportamiento, podemos indicar que la leche de la zona está dentro de la clasificación del tipo A.

Los resultados muestran que la leche de la zona cumple con el rango establecido por IBNORCA cuyo parámetro máximo es de 1×10^2 UFC/mL, que dice que por encima de este rango pueda haber una contaminación por hongos patógenos y estos hongos llegan a causar enfermedades en las personas. Las muestras sujetas a análisis están por muy debajo del rango establecido por IBNORCA. Por tanto podemos decir que la leche puede ser utilizada en la planta de transformación de productos en la estación experimental de Choquenaira.

IBNORCA (2002), indica que los esporidios de las levaduras y de los hongos son resistentes al calor, a la congelación y a los antibióticos. Pueden causar olores y aromas extraños y decolorar la superficie de los alimentos.

Camacho (2009), indica que los mohos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente puede encontrarse como flora normal de un alimento o como contaminantes en equipos mal sanitizados.

De igual manera Frazier y Westhoff (1994), indican que ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en elaboración de algunos alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad los hongos y las levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos o la exposición del alimento a la irradiación. Por tanto pierde ser un potencial en alimentos lácteos fermentados como en caso de yogurt.

Las levaduras intervienen en el proceso de fermentación que se producen durante la elaboración de alimentos como cerveza, vino, vinagre, quesos así como en la obtención de enzimas y alimentos (Cruz, 1989).

Levaduras y mohos son comunes de contaminación de los alimentos. Mientras que la levadura no da lugar a la intoxicación alimentaria que hace que los alimentos a descongelar. Los mohos pueden producir micotoxinas, algunos de los cuales pueden ser dañinos para los seres humanos. Las esporas del moho pueden ser transportadas por el viento, y por lo tanto puede tener una fácil entrada a una instalación de producción de alimentos.

FAO (2009), indica que, los hongos y las levaduras, rara vez su presencia se manifiesta, las levaduras pueden ser perjudiciales, y algunos hongos llegan a ser nocivos, por ejemplo cuando el crecimiento excesivo de *Geoihchum* sobre la superficie de los quesos blandos.

Los hongos y las levaduras no tienen importancia en leche fluida, sino más bien en los productos ya elaborados. Algunas especies de hongos 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. Coincidiendo con Cabrera (1987), quien reporta que, los hongos y levaduras forman parte de la microflora de la leche, pero debido a que son acidófilos, solo alcanzan pleno desarrollo en medios ácidos su crecimiento en la leche cruda es pobre.

Arano (2010), menciona que los recuentos bajos de los hongos mohos y levaduras en la zona de estudio se debe a que en la zona existe la presencia de la Estación Experimental de Choquenaira y La Granja San Gabriel. Ambas cuentan con

asistencia técnica calificada por lo que la calidad de su leche es alta, en comparación de las otras comunidades estudiadas. También pudimos observar que con una adecuada asistencia técnica en las zonas estudiadas, se puede incrementar la producción de leche. Esto lo ratifica Franqueville (1990), que indica que en la zona de Achocalla se logro mejorar la producción y calidad de la leche debido a la asistencia técnica adecuada que se dio en la cuenca lechera de La Paz.

Los resultados obtenidos al respecto a levaduras y de los mohos son buenas esto se debe a que las muestras se analizaron en época seca por lo que hay poca humedad en los forrajes ya que los hongos mayormente se presentan en los alimentos con micotoxinas que consumen las vacas.

La presencia de estos microorganismos patógenos, durante la pasteurización no llega a morir porque son resistentes al calor a 75°, a la congelación y a los antibióticos. Por tanto pueden causar olores y aromas extraños y decolorar la superficie de los alimentos

Un alimento contaminado por hongos patógenos es capaz de provocar enfermedades graves en las personas que lo consumen ya que estos microorganismos no llegan a morir con la pasteurización de la leche.

5. CONCLUSIONES

- Podemos concluir que la leche de la zona de estudio es apta para el consumo respecto a la calidad microbiológica, en lo que se refiere a la variable mesofilos aerobios, presentando un 92,30% está por debajo del establecido por IBNORCA clasificándola como leche de tipo A. Y el restante 7,7% que representa a una muestra analizada con un recuento total de 670 000 ufc/mL clasificándola como leche de tipo B. Por tanto podemos decir que es apta para la utilización de la Planta de Transformación de Productos Lácteos de la Estación Experimental de Choquenaira.
- De igual manera podemos concluir respecto a las bacterias coliformes y *Escherichia coli* están dentro del rango establecido por IBNORCA. Llegando el valor más alto 93 coliformes y 10 de bacterias *Escherichia coli* en NMP/mL de leche.
- Los resultados respecto a la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* muestran que la leche de la zona no cumple con los rangos establecidos por IBNORCA, llegando un recuento máximo de 6 ufc/mL, la norma boliviana indica ausencia de este microorganismo en la leche, por tanto no garantiza una leche de buena calidad.
- Respecto a las células somáticas se determinó que 76,93% de las muestras analizadas son aceptables el restante 23,07% de las muestras analizadas pueden presentar una elevada carga bacteriana mayor a 500 000 cel. /mL

- El recuento para mohos y levaduras están dentro de la norma IBNORCA para todas las muestras analizadas, lo que garantiza el uso de esta materia prima en la planta de transformación de productos lácteos en la estación experimental de Choquenaira.

- Tomando en cuenta todos los puntos anteriormente mencionados, podemos concluir que las 13 muestras analizadas en el área de influencia de la Estación experimental Choquenaira, son un gran potencial de acopio lechero para la Planta de Transformación de Productos Lácteos de la Estación Experimental de Choquenaira.

- Un alimento contaminado es aquél que contiene gérmenes capaces de provocar enfermedad a las personas que lo consumen. No es lo mismo un alimento contaminado que un alimento deteriorado ya que cuando un alimento se encuentra deteriorado sus cualidades, olor, sabor, aspecto, se reducen o anulan, pudiéndose apreciar por medio de los sentidos (vista, olfato, gusto, tacto).

- La contaminación ni se nota ni se ve ya que los microorganismos no se aprecian a simple vista al ser microscópicos. Un alimento contaminado puede parecer completamente normal, por eso es un error suponer que un alimento con buen aspecto está en buenas condiciones para su consumo, ya que puede estar contaminado por bacterias y hongos. Este último es el realmente peligroso y causante generalmente de las enfermedades de origen alimentario.

6. RECOMENDACIONES

- Si pretendemos obtener leche de buena calidad microbiológica, la atención debe encontrarse en los procesos de producción y en 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 de la ubre como del medio ambiente, equipo de ordeño y también del manipulador.
- El control sobre la calidad higiénica de la leche y la salud de la ubre influye en la variación de los componentes de la leche, por consiguiente se debe prestar mayor atención en los factores del manejo, y el manipuleo durante el ordeño debido a que en el medio ambiente se tiene una infinidad de microorganismos que contaminan la leche y por tanto aumenta la acidez de la misma.
- 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, la calidad se conserva cuando se aplica una refrigeración oportuna y que tenga una temperatura entre 4 y 6°C.
- También es necesario el control interno de un laboratorio microbiológico el cual hace una evaluación continua de los principales materiales y objetos que se utilizan dentro de los análisis, como medios de cultivo, reactivos, equipos o instrumentos, además del personal, también debe incluir manuales de procedimientos y documentación en general, para así poder garantizar un buen desarrollo del procedimiento y de este se realice en forma correcta cada vez que se ejecute el control de calidad microbiológico de estos productos lácteos.

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. MOSS, M. 1997. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Págs. 130 -139.

ALAIS, CH. 1985. Ciencia De La Leche. Ed. Reverdete, S.A. Barcelona España.

ARANO, F. 2010. Determinación de la calidad de la leche en la Estación Experimental de Choquenaira. Págs. 62-66.

BROCK, T. D.; MADIGON, M. T. 1997. Biología de los Microorganismos. 6 ed. Ed. Limusa. México D.F.

CABRERA, G.; ALVAREZ, C.; HIDALGO, P. 1987. Manual de Higiene de Alimentos II. Ministerio de educación superior. San José de la Lajas. La Habana Cuba.

CASADO, P. BLANCO. 1998. Métodos instrumentales para el análisis de leche Madrid. Asociación Nacional de Químicos de España.

CARRASCAL, A. K., PAEZ, A., BURBANO, M. 2003. Manual de Laboratorio: Microbiología de alimentos. Primera Edición. Editorial CEJA. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

CAMACHO, A. (2009) Técnicas para el análisis Microbiológicos de Alimentos. 2da Ed. Facultad de Química. UNAM. México.

CRUZ, A. (1989). Microbiología de los alimentos. Primera reimpresión. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la HABANA. Págs. 9-15.

HANNOVER, A. (2002). Departamento para la Higiene y Tecnología de la Leche – Escuela Superior de Veterinaria.

DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J.1997.Food Microbiology: fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology Press. Washington D.C.

ELLNER, R. 2000. Microbiología de la Leche y de los Productos Lácteos. Trad. SCHLUTER ELLNER, C. Y SCHULZ, R. Editorial Díaz de Santos S. A. Madrid-España.

FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura yAlimentación). 2009. Anuario de Producción.Roma-Italia.

FRAZIER, C. 1962. Microbiología de la leche. 1ra. ed. Editorial Acribia. Zaragoza - España.

FRAZIER, W. Y WESTHOFF, D., 1988. Microbiología de los Alimentos. 3ra. ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.

FRANQUEVILLE, A. 1990. La Cuenca Lechera de La Paz Bolivia. Ministerio de planificación y coordinación. La Paz – Bolivia.

HAYES, P.R.1993. Microbiología e higiene de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

HENNENBERG, W. 1971. Elementos de Microbiología Lactológica. 6ta Ed. Ed. Acribia. Zaragoza – España.

ICMSF, 2000 international commission on microbiological especifications for foods of the international union of microbiological societies.2000. Microorganismos de los alimentos su significado y metodos de enumeracion segunda Edicion Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.

KAPER JB 1998, Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clínica Microbiológica pag. 142 - 201.

KORIA, P. R. (2007), Metodología de la Investigación desde la Práctica Didáctica, derechos reservados. Pp. 105.

IBNORCA INSTITUTO BOLIVIANO DE NORMALIZACION Y CALIDAD

a. ____ Norma Boliviana NB 33013. Productos Lácteos. Leche Cruda y Fresca. Requisitos.

b. ____ Norma Boliviana NB 199. Productos Lácteos. Toma de Muestras.

c. ____ 2000 NORMA BOLIVIANA NB – 914 productos lácteos recuento de células somáticas (Primera revisión) Bolivia.

d. ____ 2002. NORMA BOLIVIANA NB 32004, ensayos microbiológicos, *staphylococcus aureus*. (Segunda revisión) Bolivia.

e. ____ 2005 NORMA BOLIVIANA NB – 32003 ensayos microbiológicos para bacterias mesófilas aerobias (Segunda revisión) Bolivia.

f. ____ 2004. NORMA BOLIVIANA NB 32006, ensayos microbiológicos, recuento de mohos y levaduras. (Primera revisión) Bolivia.

g. ____ 2002 NORMA BOLIVIANA NB – 32005 ensayos microbiológicos para bacterias coliformes totales (Segunda revisión) Bolivia.

ICMSF, 1999. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies. Microorganismos de los

Alimentos. Métodos de muestreo para para analisis Microbiologicos: principios y aplicaciones específicas. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

LOOR, J. 2003. Aspectos Básicos sobre el Desarrollo de la Mastitis.
Disponble en: <http://www.a-campo.com.ar/espanol/bovinos/bovinos13.htm>.

MACA (Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios). s/f. Identificación, mapeo y análisis competitivo de la cadena productiva de leche de origen bovino y productos lácteos. BO. 230 p.

MADRID, A. 1996. Curso de industrias lácteas. Editorial Mundo-Prensa Libros, S.A. Madrid - España.

MADIGAN, M.1999. Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice may. 8ª edición. Impreso en España.

MONTANO, A. diarrea aguda en al comunidad. Informe de investigación financiada por CIID, Canada (Nº3-P-87-0323), 1991.

PINZON, A. 2004. 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 Titulo de Tecnólogo en Producción Animal. UNAD. 2004.

PISABARRO, G. (2007). Microbiología general 2006 – 2007 Ecología microbiana de los alimentos.

REVILLA, A. 1985. Tecnología de leche: Procesamiento, Manufacturación y Analisis. Ed. Levantex S.A. San Jose Costa Rica.Pag.132.

REVILLA, A. 2000. Tecnología de la leche. 4ta Ed. Zamorano Academia Press. Zamorano Honduras.392p.

ROBINSON, R.1997.Microbiología Lactológica. Vol I. Editorial Acribia. Zaragoza – España.

ROQUE, S. 2000. Comportamiento productivo y Reproductivo del Bovino Lechero en la Provincia Avaroa del Departamento de Oruro: Tesis, Oruro Bolivia.

SOBOCE. 2009. Ingavi, 2020. Estrategia Decenal de Desarrollo. Publicación de Soboce y el Gobierno Municipal de Viacha. Viacha Bolivia.

SOLER, J.P.2006. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Departamento de Microbiología Bogotá Colombia.

SOTO, E. 1987. Tecnología de la Leche y sus Derivados. I.S.C.A.H. La Habana Cuba.Pag. 362-368.

THOMAS S. 1991. Técnicas Bacteriológicas para el Control Bacteriológico. Ed. Acribia. Zaragoza España.

WATTIAUX MICHEL. 2005. Composición de la Leche y Valor Nutricional. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera Universidad de Wisconsin-madison disponible en: <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/19.es.pdf>

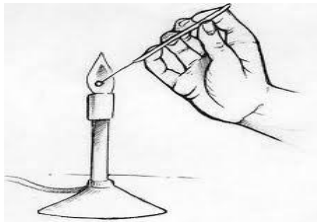
WARNER, J. 1980. Principios de la Tecnología de Lácteos. Ed. AGT Editos. Mexico DF – Mexico.

YABAR, F. 2005. Microbiología de alimentos. Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú.

ANEXOS



Muestra de leche



Flameado



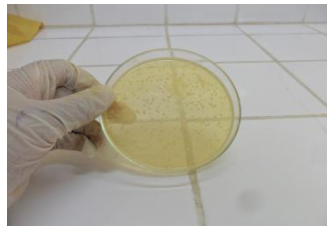
Diluciones



vertido en placa



Crecimiento de bacterias mesofilos

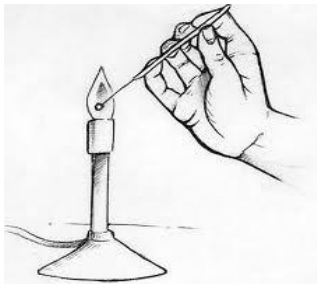


Conteo de colonias

Figura 1. Recuento de bacterias mesofilos aerobios en ufc/mL



Muestra de leche



Flameado



caldo Lauril sulfato de sodio



Crecimiento de coliformes



Recuento de colonias

Figura 2. Recuento de Bacterias Coliformes Totales en NMP/mL

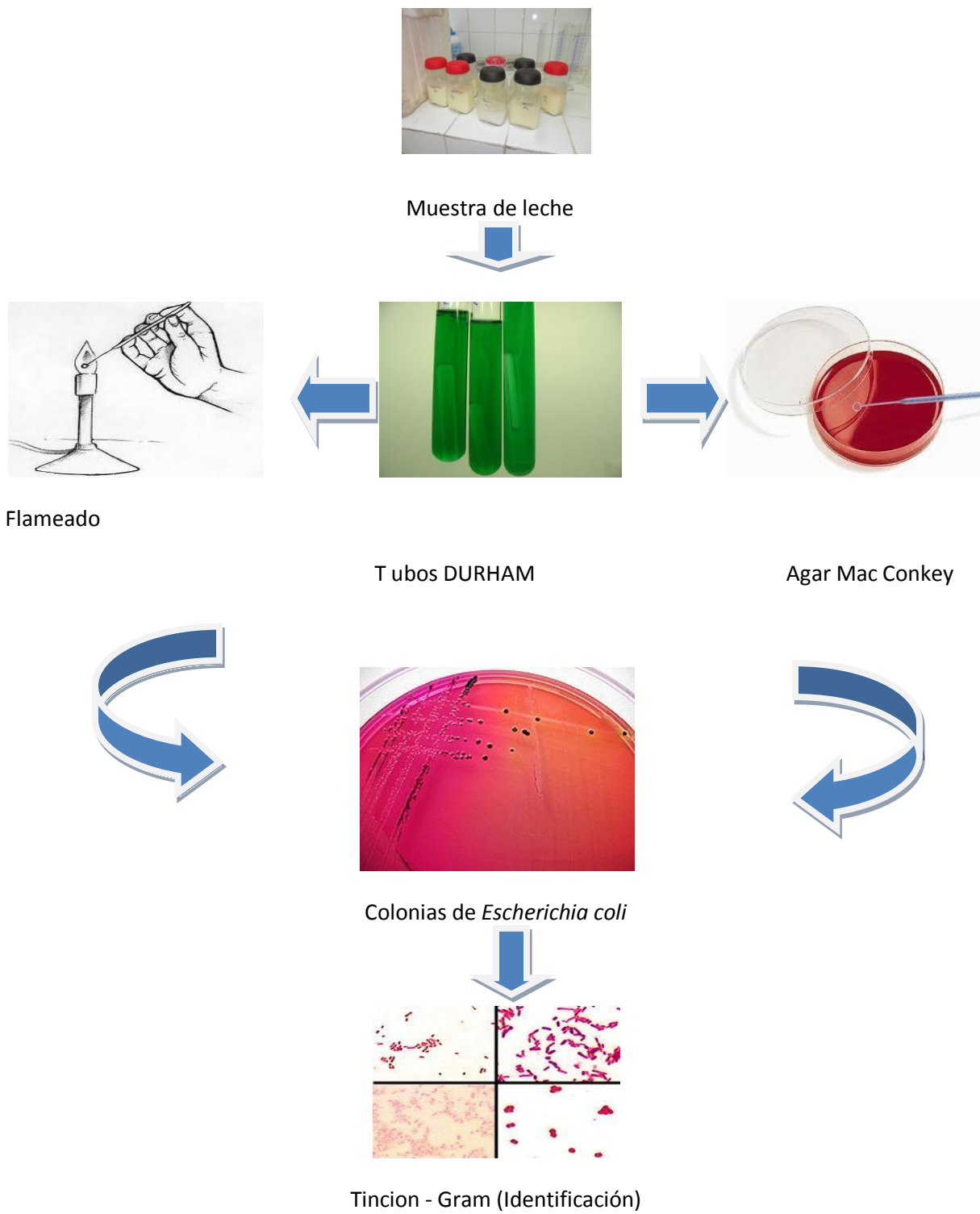


Figura 3. Recuento de *Escherichia coli* en ufc/ml

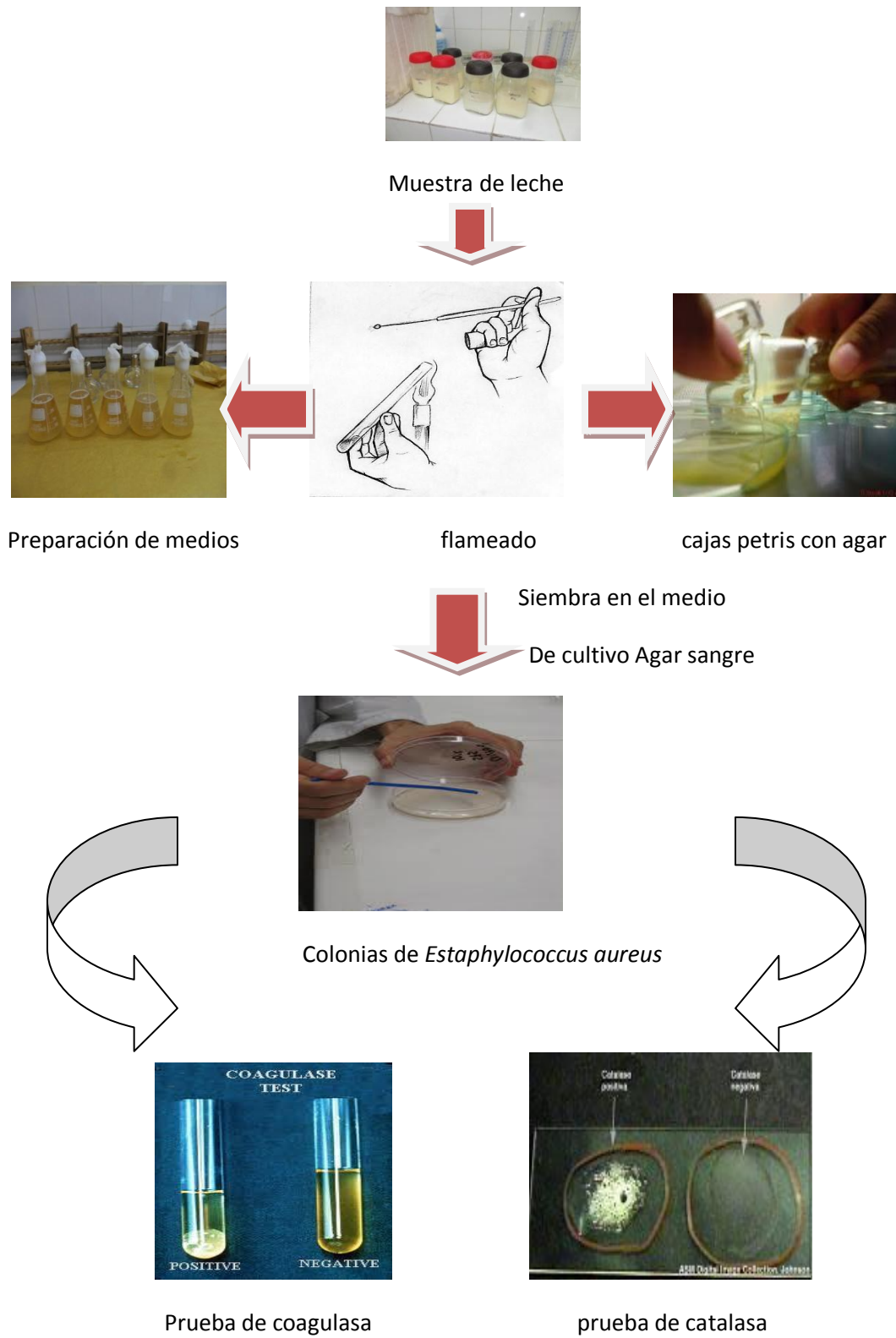


Figura 4 .Recuento de la bacteria *Estaphylococcus aureus* en ufc/mL



Muestra de leche



Añadir en 9 ml de leche



Incubar por tres horas



Observar el cambio de color en la leche

(Controlar el tiempo)

Figura 6. Recuento de mohos y levaduras en ufc/mL



Muestra de leche



Añadir en 9 ml de leche
1 ml de azul de metileno



Incubar por tres horas



Observar el cambio de color en la leche

(Controlar el tiempo)

**Figura 5. Determinación de células somáticas mediante TRAM
(Tiempo de reducción de azul de metileno)**

Tabla 1. Productores de la Zona de estudio

Nº	PRODUCTOR	LOCALIDAD	HORA	RFRIGERACION	PROCESAMIENTO
1	Natividad Rojas	Copalacaya	8:15	4:00horas	12:30 Pm
2	Eusebio Rojas	Copalacaya	8:30	4:00horas	12:30 Pm
3	Bernardo Condri	Canaviri	8:40	4:00horas	12:30 Pm
4	Paulino Canaviri	Canaviri	8:50	4:00horas	12:30 Pm
5	Sirilo M.	Canaviri	9:00	4:00horas	12:30 Pm
6	Amalia Condori	Calisaya	9:10	4:00horas	12:30 Pm
7	Rosmery Condori	Calisaya	9:20	4:00horas	12:30 Pm
8	Ruth Callisaya	Calisaya	9:30	4:00horas	12:30 Pm
9	Federico C.	Calisaya	9:40	4:00horas	12:30 Pm
10	Granja S.G.	Choquenaira	9:40	4:00horas	12:30 Pm
11	Graja CHOQ.	Choquenaira	9:50	4:00horas	12:30 Pm
12	Anastacio Lopez	Choquenaira	10:00	4:00horas	12:30 Pm
13	Margarita Quispe	Choquenaira	10:15	4:00horas	12:30 Pm

Tabla 2. Tabla de NMP para coliformes totales

Lectura (1)	Indice NMP por 100ml	Limite de confianza (2)		Lectura (1)	Indice NMP por 100ml	Limite de confianza (2)	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
000	< 0			412	26	9	78
001	2	< 0.5	7	420	22	7	67
010	2	< 0.5	7	421	26	9	78
020	4	< 0.5	11	430	27	9	80
				431	33	11	93
100	2	< 0.5	7	440	34	12	93
101	4	< 0.5	11				
110	4	< 0.5	11	500	23	7	70
111	6	< 0.5	15	501	31	11	89
120	6	< 0.5	15	502	43	15	110
				510	33	11	93
200	5	< 0.5	13	511	46	16	120
201	7	1	17	512	63	21	150
210	7	1	17	520	49	17	130
211	9	2	21	521	70	23	170
220	9	2	21	522	94	28	220
230	12	3	28	530	79	25	190
				531	110	31	250
300	8	1	19	532	140	37	340
301	11	2	25	533	180	44	500
310	11	2	25	540	130	35	300
311	14	4	34	541	170	43	490
320	14	4	34	542	220	57	700
321	7	5	46	543	280	90	850
				444	350	120	1000
400	13	3	31	550	240	68	750
401	17	5	46	551	350	120	1000
410	17	5	46	552	540	180	1400
411	21	7	63	553	920	300	3200
				554	1600	640	5800
				555	> 2400	-	-

Tabla N°3. Volumen de producción de Leche por Departamento (litros/año)

DEPARTAMENTO	2003	%
Santa Cruz	183,336,580.00	61.9 %
Cochabamba	66,815,216.18	22.57 %
La Paz	17,679,870.00	5.97 %
Oruro	9,484,889.30	3.20 %
Chuquisaca	7,003,444.80	2.37 %
Tarija	6,209,157.35	2.10%
Beni	5,467,700.00	1.85 %
TOTAL	295,996,857.63	100.00%

(Fuente: MACA, s/f)

Tabla N°4 Producción promedio del sector lechero de la E.E. Choquenaira

Comunidad	l/día	l/semana
Callisaya	543	3801
Canaviri	477	3339
Choquenaira	270	1890
Copalacaya	210	1470
Total	1500	10500

Fuente: ARANO, 2010

Tabla N° 5. 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.

Tabla Nº 6. 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
Hongos xerófilos	0,61

FUENTE: CASADO, P.; BLANCO, 1998

Tabla Nº 7. 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

Tabla Nº 8. Microorganismos Psicrófilos y Termodúricos de la leche cruda

GÉNEROS TERMODURICOS	GÉNEROS PSICROTROFOS
Micobacterium	Acitobacter
Micrococcus	Flavobacterium
Bacillus	Aerobacter
Clostridium	Bacillus
Alcaligenes	Arthrobacter
Pseudomonas	Alcaligenes

FUENTE: ROBINSON, R. K. 1997.

Tabla 9. Origen de Microorganismos de la Leche

Origen	Numero de bacterias /mL
Salida del pezón	500- 1000
Equipo de ordeño	1000-10000
Tanque de refrigeración	50000-20000

Fuente: AMIOT, J.1991

Tabla Nº 10 Cantidad de microorganismos por etapa de ordeño

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: Tetrapak, 1998.

Tabla Nº 11 Rangos de temperatura (°C) para el crecimiento de los microorganismos

GRUPO	MIN	OPTIMA	MAX
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Termotrofos	15-20	30-40	45-50
Mesofilos	5-10	30-40	40-47
Psicrofilos	-5-+5	12-15	15-20
Psicrotrofos	-5-+5	25-30	30-35

Fuente: Robinson, R. 1997.

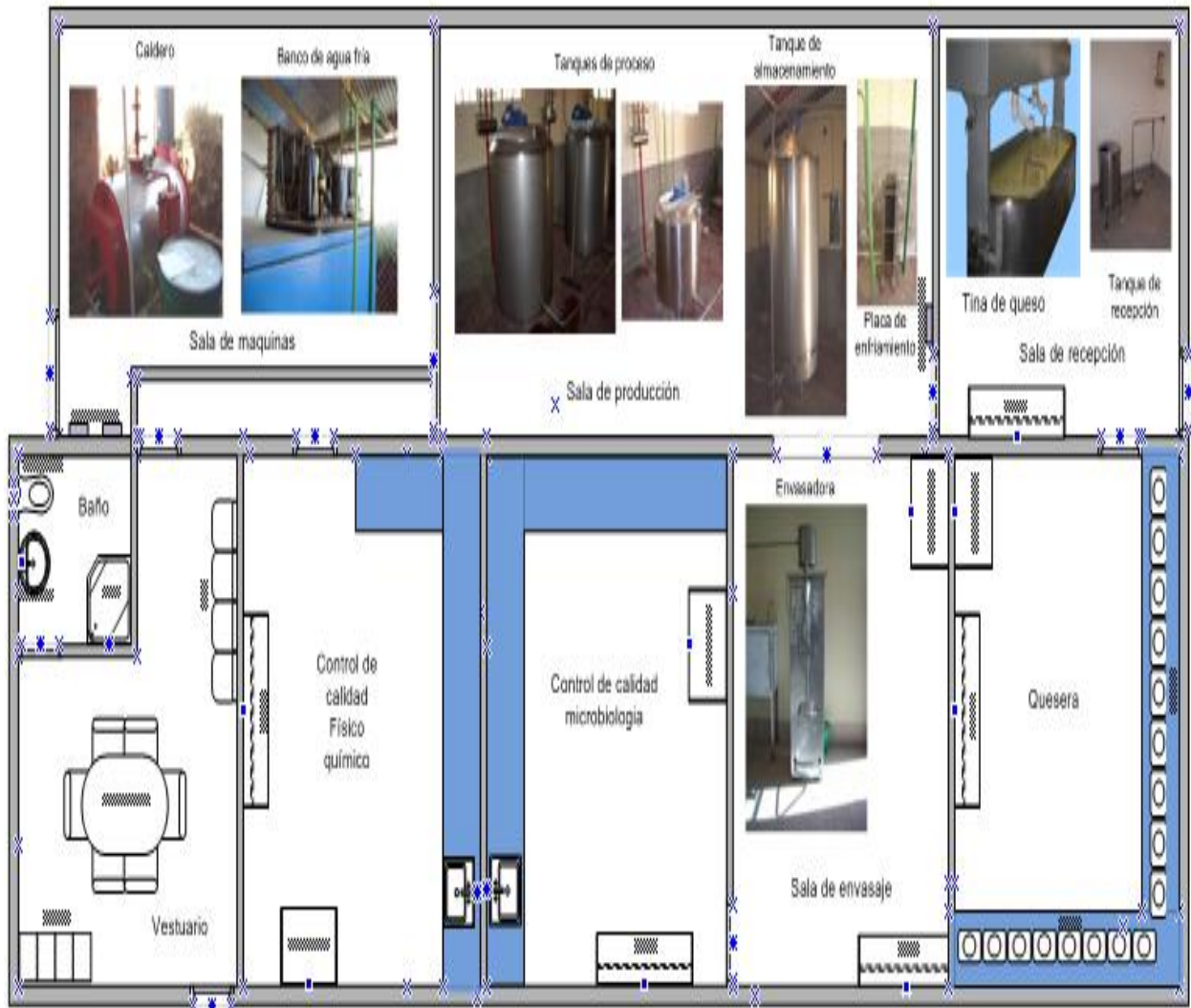
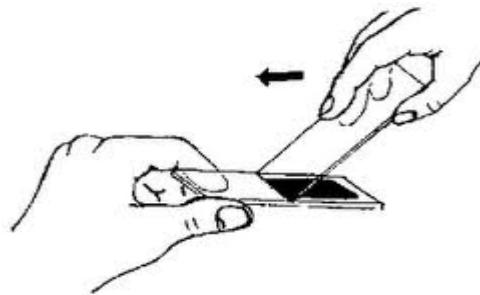


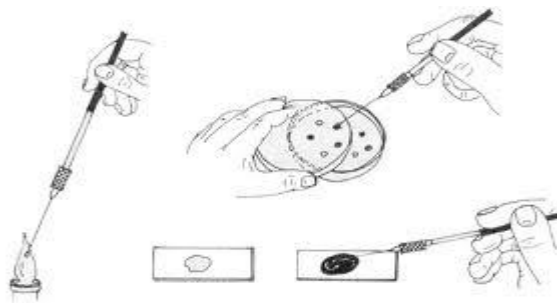
Figura 7. Planta de Transformación de Productos Lácteos Choquenaira-UMSA



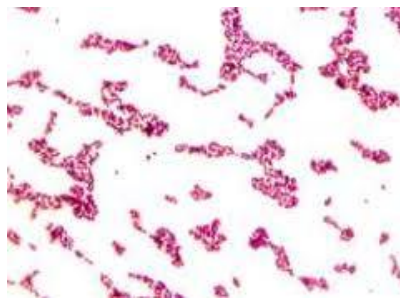
Colorantes GRAM



Extendido de las muestras



Teñido de las colonias



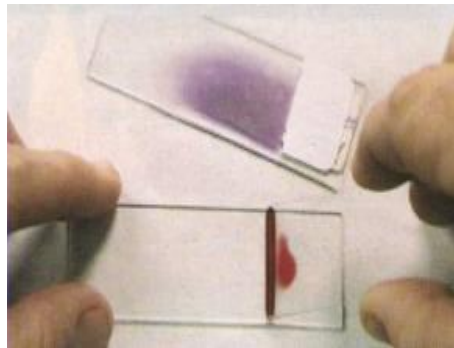
Identificación de bacterias

Figura 8. Determinación de Tinción GRAM para identificar las bacterias

TINCION ZIEHL NEELSEN



Colorante Ziehl Neelsen



Teñido de las colonias



Flameado de portaobjetos



Identificación de bacterias

Figura 8. Determinación de Tinción Ziehl Neelsen



Caldo Verde brillante Bilis 2%



Cerebro Corazón Infusión



Caldo lauril sulfato de sodio



Agar Base Sangre



Agar Mac Conkey

Figura 9. Medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias