



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACION
-MODULO DE INTENSIFICACION PRÁCTICA-

OPCION: SALUD PUBLICA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

TEMA: ESTUDIO DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LECHE MEDIANTE EXAMEN BACTERIOLOGICO

-Trabajo experimental a campo-

TUTOR INTERNO: Mgter. MV. Polej, Egon Edvin

TUTOR EXTERNO: M.V. Casuso, José

RESIDENTE: Varlamoff, Valentín Vladimir

e-mail: varlamoffvalentinvladimir@gmail.com

Índice.

- Resumen..... 1 pág.
- Introducción..... 2 pág.
- Objetivos..... 5 pág.
- Materiales y método..... 5 pág.
- Resultados y discusión..... 14 pág.
- Conclusiones..... 16 pág.
- Bibliografía..... 17 pág.

Resumen.

El objetivo de este trabajo fue analizar la calidad higiénica de la leche producida en la Sección Tambo dependiente del establecimiento E.R.A.G.I.A. – U.N.N.E., ubicado sobre Ruta Nacional N° 12, km 1031, en la localidad de Corrientes. Mediante la determinación bacteriológica a través de la dilución y siembra en placa de leche cruda. Para lo cual se muestreó 11 vacas de raza Holando-Argentino, conformando las mismas la unidad de estudio para la toma de muestra y su examen posterior. Se efectuó un análisis mediante pruebas de laboratorio, en donde se evaluaron los recuentos de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.), sembrados y llevados a estufa, realizando la lectura a las 48 horas posteriores. Las muestras de leche para el análisis, fueron colectadas de forma aséptica y dispuesta en recipiente estéril, para evitar posibles contaminaciones del medio. El proceso se llevó a cabo, bajo la supervisión del profesional a cargo, para luego ser transportado inmediatamente al lugar donde se lo analizó. El mismo fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y Aguas – anexo a la Cátedra de Bromatología e higiene alimentaria de la Facultad de Ciencias Veterinaria.

Para la siembra se realizaron las diluciones sucesivas pertinentes, volcando luego en cajas de Petri junto con agar nutritivo. Las medias de los recuentos bacterianos, luego del cultivo, dieron los siguientes resultados: 133 UFC/ml dilución 1/10; 91 UFC/ml dilución 1/100; 3 UFC/ml dilución 1/1000; 2 UFC/ml dilución 1/10000.

Al finalizar la práctica y analizando los resultados, pudo establecerse una relación positiva entre el trabajo realizado a campo y los estudios obtenidos de los cultivos de la leche cruda. Esto refleja las buenas practicas de manejo y sanitarias, a los que son sometidos los bovinos de la institución, acompañado al mismo, las maniobras higiénicas que aplican las personas antes, durante y después del ordeño.

Introducción.

La leche proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía alimentaria, proteínas de alta calidad y grasas. Puede contribuir considerablemente a la ingestión necesaria de nutrientes como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y ácido pantoténico. La leche de origen animal puede desempeñar un papel importante en las dietas de los niños en poblaciones con bajo nivel de ingestión de grasas y acceso limitado a otros alimentos de origen animal. La especie del animal lechero, su raza, edad y dieta, junto con el estado de lactancia, el número de pariciones, el sistema agrícola, el entorno físico y la estación del año, influyen en el color, sabor y composición de la misma (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, s. f.).

El Código Alimentario Argentino establece *“Con la denominación de Leche sin calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie. La leche proveniente de otros animales, deberá denominarse con el nombre de la especie productora”* (Código Alimentario Argentino, 1969).

La leche cruda de buena calidad no debe contener residuos ni sedimentos; no debe ser insípida ni tener color y olor anormales; debe tener un contenido de bacterias bajo (menos de 200.000 UFC/cm³); no debe contener sustancias químicas (por ejemplo, antibióticos y detergentes), y debe tener una composición y acidez normales. La calidad higiénica de la leche tiene una importancia fundamental para la producción de una leche y productos lácteos que sean inocuos e idóneos para los usos previstos. Para lograr esta calidad, se han de aplicar buenas prácticas de manejo e higiene a lo largo de toda la cadena láctea. Al igual que los demás tipos de alimentos, la leche y los productos lácteos pueden provocar enfermedades (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, s. f.).

Los peligros microbiológicos son un importante problema de inocuidad de los alimentos en el sector lechero porque la leche es un medio ideal para el crecimiento de bacterias y otros microbios. Estos se pueden introducir en la leche a partir del medio

ambiente o de los mismos animales lecheros. La leche puede contener microorganismos nocivos como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* (Veisseyre, 1980).

La higiene de la leche se basa en las medidas destinadas al mayor control sobre las causas que originan la contaminación microbiana, es decir, por causas exógenas derivadas de una microflora banal que contamina el conducto galactóforo, los que se agregan durante el ordeño y los que provienen de los utensilios, ordeñadoras deficientemente higienizadas y de las manos del ordeñador (Mayer, 1986).

La microbiota normal de la ubre está compuesta principalmente por bacterias como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* (alrededor del 50%) seguido por *Corynebacterium spp*, *Escherichia coli* y otros. Las condiciones anormales debidas a infecciones, enfermedades o prácticas lecheras deficientes afectan la microflora de la leche que procede de la glándula mamaria. Los factores que modifican las características de la leche pueden presentarse **antes del ordeño**, condicionan la calidad original o natural de la leche y están relacionados con las enfermedades de los animales, la cual puede adquirirse mediante dos tipos de vías: 1) vía ascendente: debido a la anatomía de la ubre constituida por conductos gruesos y poco ramificados lo que hace más fácil el ingreso post-ordeño de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* y Coliformes a través del esfínter; 2) vía descendente: conocida también como endógena ya que los microorganismos que infectan la ubre provienen de la sangre y poseen la capacidad de movilizarse a través de este fluido. Existen factores **posteriores al ordeño**: hacen referencia a la manipulación de la leche durante el ordeño, el ambiente, la conservación de la leche y el transporte, lo que ocasiona alteración de la calidad original. Las fuentes de contaminación de la leche se pueden resumir en la siguiente escala:

Bacterias provenientes del aire.....	100 – 1.500 UFC/ml
De la ubre.....	300 – 4.000 UFC/ml
Piel de los pezones.....	500 – 15.000 UFC/ml
Equipo de ordeño.....	1.000-10.000 UFC/ml
Tanque de Refrigeración.....	5.000-20.000 UFC/ml

Infecciones de la ubre.....300 – 25.000 UFC/ml
 Equipamiento.....miles hasta millones de UFC/ml
 (Arteaga L. 2016)

El recuento de bacterias totales a 30°C deberá cumplir con las siguientes condiciones: el valor correspondiente a la media geométrica de los resultados de las muestras analizadas durante un período de dos meses, con al menos dos muestras al mes, de la leche cruda, no deberá superar el límite máximo siguiente:

Parámetro	Límite máximo	Método de análisis
Recuento Total a 30°C (UFC/cm ³)	200.000	FIL 100B: 1991

Las muestras correspondientes deberán ser tomadas de cisterna de camión proveniente de tambo, en condiciones de asepsia y en plataforma de recibo del establecimiento de tratamiento térmico y/o transformación (Código Alimentario Argentino, 1969).

Se prohíbe en todo el país la venta al público de leche cruda de cualquier especie. En aquellas localidades donde no pueda abastecerse total o parcialmente a la población de leche pasteurizada y/o sometida a tratamiento térmico autorizado, las autoridades locales deberán solicitar a la autoridad sanitaria provincial la autorización correspondiente para su venta (Código Alimentario Argentino, 1969).

Con lo expuesto anteriormente y considerando el riesgo para la salud humana, es necesario que se apliquen los conocimientos microbiológicos con la finalidad de prevenir e impedir la transmisión de patógenos transportados por la leche y los productos lácteos, reducir el desarrollo de bacterias indeseables en la leche para impedir su alteración y al mismo tiempo favorecer y dirigir el desarrollo de las bacterias útiles para la elaboración de productos lácteos derivados (Amiot, 1991).

Objetivos.

Generales:

- Determinar la calidad higiénica de la leche cruda obtenida, mediante toma de muestra y examen bacteriológico cuantitativo.
- Identificar en la práctica, los puntos críticos que afecte la calidad higiénica en la cadena de producción.

Particulares:

- Perfeccionar la técnica empleada en la toma de muestra, su transporte y manipulación al momento de realizar la prueba de laboratorio.
- Establecer el estado de la metodología de trabajo aplicada en el tambo por el personal tanto antes, como durante y después del ordeño.
- Comprobar las relaciones positivas o negativas que hay entre, los resultados de los cultivos y la metodología de trabajo.

Lugar y período del trabajo:

El trabajo se llevó a cabo en la Escuela Regional de Agricultura, Ganadería e Industrias Afines (ERAGIA), en el período de noviembre 2022 a enero 2023 y las determinaciones microbiológicas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y Aguas – anexo a la Cátedra de Bromatología e Higiene Alimentaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Materiales y Métodos.

La actividad practica se realizó en E.R.A.G.I.A. de acuerdo a la rutina establecida, dentro de todo el predio de la institución, principalmente en el área que abarca la Sección de Tambo, en constante supervisión profesional; la cual consta con un total de 11 (once)

vacas en producción. Las determinaciones microbiológicas se llevaron a cabo en la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Se inició la jornada laboral a partir de las 7 am; horario en que se presenta el personal del sector. Luego de que se recibió el ordenamiento de las tareas a realizarse, se prosiguió con todas las actividades mencionadas a continuación:

Se observó los animales del rodeo general en el corral de encierre nocturno (figura 1), al mismo tiempo se realizó una inspección más minuciosa a las vacas que ingresaban al ordeño (figura 2).

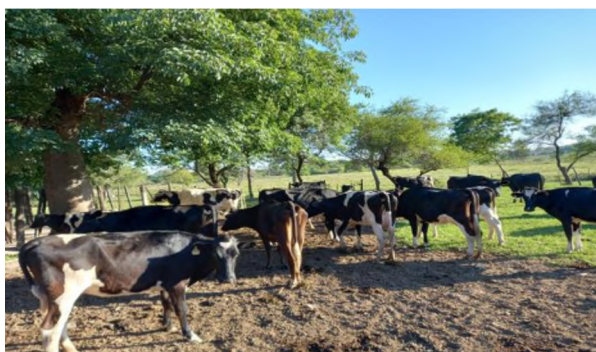


Figura 1: rodeo general en corral de encierre.



Figura 2: individualización de vacas a ordeñar.

Una vez identificadas las vacas a ordeñar, se dirigió y acompañó al lote separado, durante todo el recorrido necesario hasta llegar a la sala de ordeño (figura 3 y 4).



Figura 3: paso por pasillo y pediluvio.



Figura 4: disposición en espina de pescado.

Estando en la fosa de ordeñe, se procedió con los pasos previos necesarios para el ordeñe mecánico (lavado de pezones, despunte, desinfección y secado con papel descartable) (figura 5 y 6), culminando con la toma de muestra del material obtenido (figura 7), la misma se realizó del cántaro donde confluía la leche de las 11 vacas analizadas.



Figura 5: lavado del área de trabajo.



Figura 6: sellado de pezones.



Figura 7: toma de muestra.

Al finalizar el ordeño del lote completo, se trasladó el rodeo al potrero establecido, observándolo constantemente (figura 8).



Figura 8: observación del rodeo en potrero.

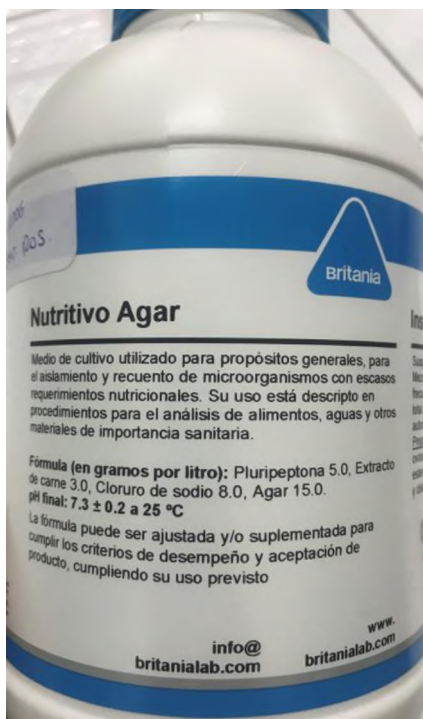
Semanalmente y posterior a cada toma de muestra luego del ordeño, la actividad se continuó y trasladó a la Facultad de Ciencias Veterinarias, en el Laboratorio de la Cátedra de Bromatología. Las tareas que allí se practicaron, fue bajo supervisión del profesional actuante.

Primeramente, se dispuso de todos los elementos necesarios, sobre la mesada de trabajo (figura 9), luego se procedió con las diluciones y siembras correspondientes.



Figura 9: 1- Pipetas estériles; 2-Muestra; 3-Tubos para dilución; 4-Mechero de Bunsen; 5-Cajas de Petri; 6-Agar en baño de maría.

Recuento en placa estándar o recuento de microorganismos. Con este método se pudo distinguir entre células viables y no viables, esto se logró sembrando diluciones sucesivas de las muestras en medios de cultivos, como ser en este caso agar nutritivo (figura 10), sólidos dispensados en cajas Petri, se incubó y posteriormente se realizó el conteo de las colonias visibles.



CONTROL DE CALIDAD		
MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	
Escherichia coli	Satisfactorio	
ATCC 25922		
Staphylococcus aureus	Satisfactorio	
ATCC 25923		
Enterococcus faecalis	Satisfactorio	
ATCC 29212		
Pseudomonas aeruginosa	Satisfactorio	
ATCC 27853		
Nutritivo Agar suplementado con 5% de sangre ovina:		
MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	HEMÓLISIS
Streptococcus pyogenes	Satisfactorio	Beta
ATCC 19616		
Streptococcus pneumoniae	Satisfactorio	Alfa
ATCC 6305		
Streptococcus pneumoniae	Satisfactorio	Alfa
ATCC 49619		
CONTROL DE ESTERILIDAD		
Medio sin inocular		RESULTADO
		Sin cambios

Figura 10: medio de cultivo Agar Nutritivo, junto a los microorganismos que desarrolla.

Estas colonias a su vez, se multiplicó por el factor inverso de las diluciones utilizadas (figura 11). Se redujo el error realizando las pruebas por duplicado (colocando los resultados individualmente). Adicionalmente, el conteo y cálculo de la población de viables, se realizó en las cajas que contenían entre 30 y 200 colonias (algunos autores reportan el rango de 10 a 300). En este tipo de conteo de viables, las colonias no siempre han de proceder de una sola célula, dado que algunas bacterias pueden formar agrupaciones y estas serán las que darán origen a la colonia. Por lo anterior, los reportes de esta metodología se refieren a “unidades formadoras de colonia” o UFC, unidad que corresponde como mínimo a una bacteria formando una colonia, así como, también a un grupo de estas que han sido las formadoras de la misma (Dirección de Bromatología de Neuquén, 2021).

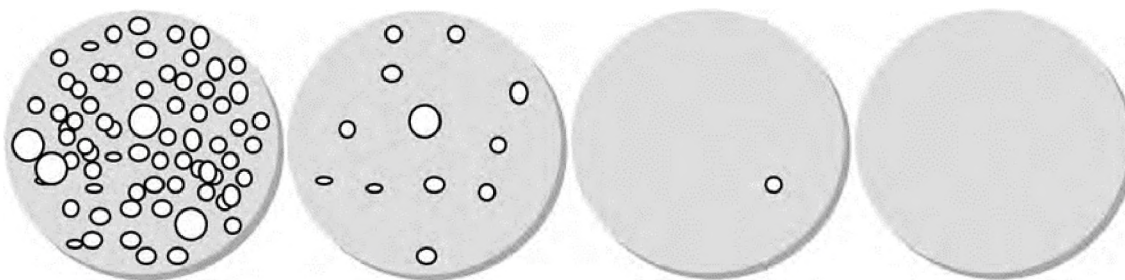


Figura 11: cajas de Petri sembradas con diluciones sucesivas, donde, la imagen de la izquierda representa la dilución menor (o más concentrada), en progresión hacia la dilución mayor o más diluida (imagen de la derecha)

Pasos previos efectuados para agilizar las operaciones: la muestra para análisis se mezcló para que los microorganismos se distribuyan lo más homogéneamente posible invirtiendo el recipiente de la muestra varias veces, evitando la formación de espuma. El agar en los tubos que se encontraban en baño de maría, se templó para poder disponer en ellos la suspensión, sin dañar los microorganismos que ellos contengan. Las cajas de Petri se dispusieron de a pares, invertidos e identificados con la concentración de inóculos que en ellos se colocaron. Todos estos procedimientos y los siguientes se realizaron cerca del mechero de Bunsen.

Se retiró 1 ml de la muestra para análisis con una pipeta estéril (figura 12) y se añadió a un tubo con volumen 9 veces superior de diluyente (agua destilada estéril), obteniendo de esta manera una dilución 10^1 (1/10), denominándolo a este como tubo N°1.

Seguidamente y con otra pipeta estéril, se tomó 3 ml de dicho tubo, se distribuyó de la siguiente manera: 1 ml en el siguiente tubo de dilución, consiguiendo una dilución de 10^2 (1/100) (figura 13), identificado con tubo N°2. Con los restantes 2 ml, distribuimos 1 ml en cada tubo con agar, los mezclamos suavemente, sin introducir ningún elemento, solamente invirtiéndolos un poco e inmediatamente fueron volcados en cada caja de Petri.



Imagen 12: pipeteo para diluciones y siembra

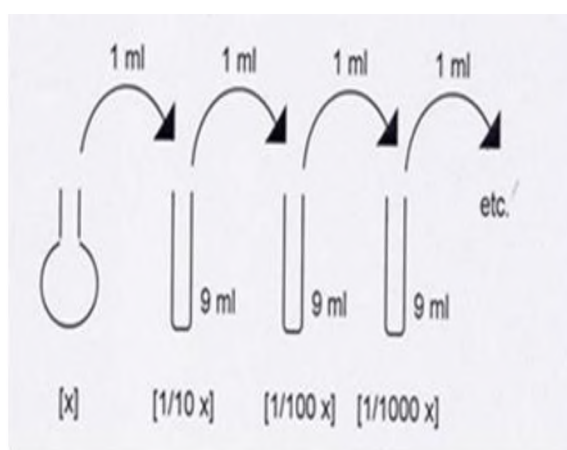


Imagen 13: diluciones seriadas sucesivas.

Para una óptima precisión no se introdujo la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y se evitó el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Al finalizar esta etapa se obtuvieron, dos cultivos con una dilución 10^1 correspondiente del tubo N°1 y una nueva dilución sucesiva de la misma con dilución 10^2 .

Luego se consiguieron nuevas diluciones decimales sucesivas, con sus respectivas siembras en sus cajas ya identificadas. Se transfirió con una pipeta estéril 3 ml del tubo N°2 y se distribuyó de la misma manera anteriormente descrita, (1 ml en un nuevo tubo con diluyente se consiguió una dilución 10^3 (1/1000) y 1 ml en cada tubo con agar, luego se sembró en sus respectivas cajas de Petri) (figura 14).



Figura 14: siembra en caja de Petri.

Se repitió esta operación a partir de la dilución 10^3 , utilizando nuevamente una pipeta estéril.

Al finalizar la última etapa, se mantuvieron las placas en superficie horizontal hasta que se solidificó el agar completamente. Se efectuó la inversión de las placas y la introducción de las mismas a estufa, se incubó las cajas a 37°C durante 48 horas (figura 15).



Imagen 15: cajas de Petri en estufa para incubación.

Después del periodo de incubación, se contaron las colonias en aquellas placas que presentaban el rango permitido para su conteo. El mismo se realizó con un Cuenta colonias para ser más precisos y evitar al máximo el error (figura 16). El número total obtenido de colonias en cada caja de Petri, multiplicado por su factor de dilución, corresponde al total de colonias por mililitro de muestra (figura 17; 18; 19 y 20).



Figura 16: conteo, con Cuenta colonias.

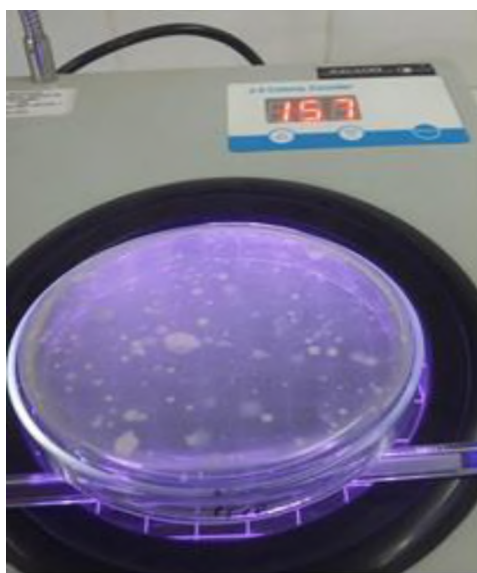


Figura 17: 157 UFC, en dilución 10^1 .

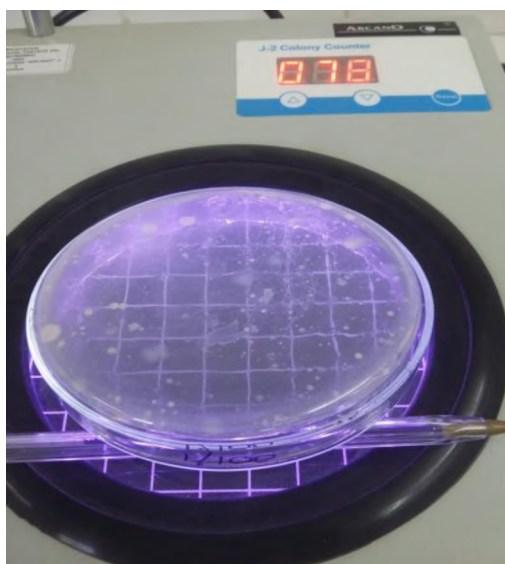


Figura 18: 78 UFC, en dilución 10^2 .

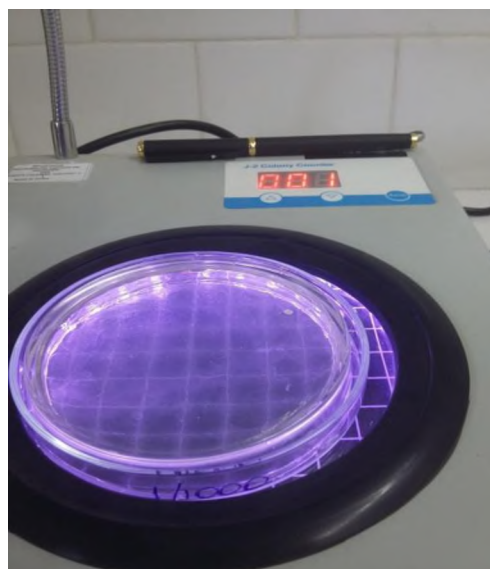


Figura 19: 1 UFC, en dilución 10^3 .

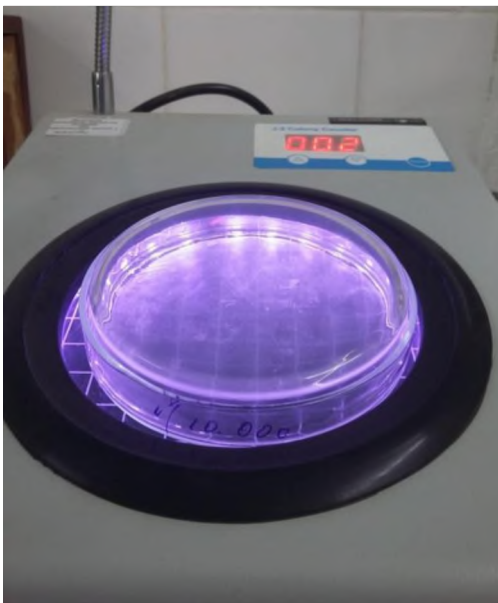


Figura 20: 2 UFC, en dilución 10^4 .

Resultados y discusión.

En la siguiente tabla se expresan los resultados obtenidos, luego de la siembra y cultivo las muestras.

Tabla 1. Resultados y sus promedios obtenidos durante la investigación.

Primera semana de análisis					Segunda semana de analisis				
Fecha siembra	Fecha lectura	Dilución	U.F.C.	X	Fecha siembra	Fecha lectura	Dilución	U.F.C.	X
1/11/2022	3/11/2022	1/10	157	132	8/11/2022	10/11/2022	1/10	138	152
		1/10	106				1/10	165	
		1/100	91	85			1/100	96	91
		1/100	78				1/100	85	
		1/1000	1	2			1/1000	4	3
		1/1000	3				1/1000	2	
		1/10000	2	2			1/10000	1	2
		1/10000	2				1/10000	3	
Tercera semana de análisis					Cuarta semana de análisis				
Fecha siembra	Fecha lectura	Dilución	U.F.C.	X	Fecha siembra	Fecha lectura	Dilución	U.F.C.	X
15/11/2022	17/11/2022	1/10	109	127	22/11/2022	24/11/2022	1/10	122	120
		1/10	145				1/10	118	
		1/100	106	97			1/100	84	90
		1/100	87				1/100	97	
		1/1000	3	4			1/1000	4	4
		1/1000	4				1/1000	3	
		1/10000	1	2			1/10000	1	2
		1/10000	3				1/10000	2	

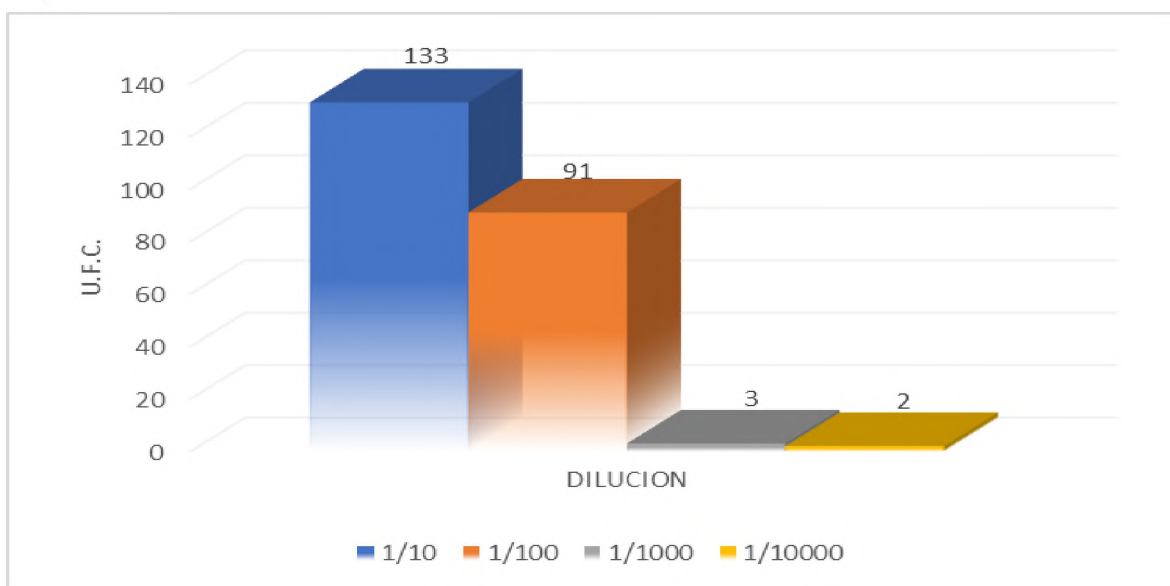
Nota: los promedios (X), fueron obtenidos mediante la media aritmética del número total de UFC, en cada

par de cajas de Petri, según la dilución (ej.: $157 + 106 / 2 = 132 \text{ UFC/Cm}^3$, para la dilución 1/10, de la primera semana).

Gracias a los datos recogidos y volcados en planillas Excel, pudo establecerse el número de las colonias bacterianas según la dilución a la que fueron sometidas. Se observó que a una menor dilución de 1/10, las colonias son muchas más numerosas teniendo un promedio de 133 UFC/ml, comparándolas con diluciones sucesivas: las diluciones de 1/100 obtuvieron una media de 91 UFC/ml; dilución 1/1000 con promedio de 3 UFC/ml y las muestras sembradas en 1/10000, expresaron una cantidad de 2 UFC/ml.

Al mismo tiempo y expresado en un eje cartesiano, se evidenció el promedio de las colonias bacterianas, según la dilución a las que fueron sometidas para su siembra.

Grafico 1. Promedios resultantes del total de siembras realizadas, en sus respectivas diluciones.



Nota: los resultados corresponden a la media aritmética, de los promedios obtenidos por semana en cada una de las diluciones (ej.: $132 + 152 + 127 + 120 / 4 = 133 \text{ UFC/cm}^3$, para la dilución 1/10 en las cuatro semanas de análisis).

Conclusiones.

En consideración de la calidad bacteriológica de la leche cruda, producida en la Sección Tambo del establecimiento ERAGIA, se determinó mediante el recuento bacteriano totales (expresados en U.F.C.), se encuentran dentro de los valores establecidos según el C.A.A. (artículo 556 tris, establece como límite máximo, 200.000 UFC/cm³).

Se puede mencionar que calidad bacteriológica de dicha leche cruda a nivel de todo el rodeo en producción, es el efecto de varios factores y condiciones que rodean a la vaca: en general las buenas prácticas higiénicas en la rutina de ordeño, óptimas condiciones higiénicas de los establos o sitios de ordeño, higiene en las manos de los operarios y muchos factores más favorecen al reducido recuento de microorganismos.

Bibliografía.

- 1- AGUIRRE AGUIRRE MARIELENA. Determinación del perfil microbiológico de la leche pasteurizada a través de su línea de producción en la planta procesadora Colanta – Planeta Rica. Trabajo de grado. Universidad de Córdoba. Facultad Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología. Montería – Córdoba. 2016.
- 2- AMIOT J. Ciencias y Tecnología de la Leche. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 1991.
- 3- ARTEAGA L. Implementación de un plan de mejoramiento de la calidad de la leche, de proveedores de lácteos San Antonio Cañar. 2016. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6079/1/27T0315.pdf>
- 4- Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII. Alimentos Lácteos. Artículo 554 - (Res 22, 30.01.95). Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteosactualiz_2022-08.pdf
- 5- DIRECCIÓN DE BROMATOLOGÍA DE NEUQUEN. Disponible en: <https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/ANAL-005-Microbiologia-general.pdf>.
- 6- VASQUEZ F, MARTINEZ G, MANCERA V, AVILA L, VARGAS M. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha. Revista de Medicina Veterinaria 2007. N° 14: 61-83. Disponible en: <file:///D:/Users/Daiana%20Varela/Downloads/TFG/material/Dialnet-AnalisisMicrobiologicoYSuRelacionConLaCalidadHigie-4943762.pdf>
- 7- MAYER, H. F. Bromatología. Higiene y control de Alimentos. 1ª. Edición. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Nordeste. 1986

- 8- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Portal Lácteo. Disponible en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/calidad-y-evaluacion/es/>
- 9- PADRON CESAR, MORALES MARCO. Calidad Bacteriológica de la leche cruda en ganaderías de la provincia del Azuay. Tesis previa a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de Cuenca. Facultad de ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2018.
- 10- VEISSEYRE R. 1980. Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. 2^{da}. Edición Española. Editorial Acribia. Zaragoza España.