

INFLUENCIA DEL PREDOMINIO DE CIERTOS PSICROTROFOS EN LAS PRUEBAS DE REDUCCION DE COLORANTES EN LECHE CRUDAS



CARUSO, Nenúfar S. de FEDER, A.

RESUMEN

En 180 muestras de leche de mezcla se realizaron recuentos de gérmenes psicrotrofos relacionados a las pruebas de reducción de colorantes: AM y TTC. Se utilizó medio gelosado para psicrotrofos, según Buttiaux.

Se sembraron las diluciones 10^2 ; 10^4 y 10^6 incubando a $5^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, 5 días. Las muestras proceden de bidones de 30 lts. llegados en camiones descubiertos a la Usina.

Un porcentaje elevado se encuentra dentro de los standards siguientes:

AM	87×10^4	a	30×10^6	DECOLORACION	en 30'
TTC	130×10^4	a	incontable	FORMAZAN	en 30'

El predominio de la flora microbiana correspondió a Pseudomonadaceae en el 73,33% de las muestras. El metabolismo microbiano de los mismos, tendría una influencia levemente más marcada en los resultados de la prueba de reducción con el 2, 3, 5 trifenil tetrazolium, TTC, que con el Azul de Metileno.

De lo investigado, podría sugerirse la prueba de TTC en el control de leches enfriadas y transportadas en camiones termos

*Catedra de Tecnologia de la Leche.- Instituto de Leche.
Facultad de Veterinaria.- Universidad Mayor de la
República Oriental del Uruguay*

a < 10°C que serán destinados a elaboración de subproductos a stockar en cámaras.-

SUMMARY

180 samples of raw bulk milk were tested for psicrotrophic bacteria counts related to reduction dyes tests:

MB Test and CTT Test. Psicrotrophic agar medium according to Buttiaux was used.

Dilutions from 10^{-2} ; 10^{-4} and 10^{-6} were seed incubating at $5^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$, 5 days. Samples come from 30 lts. cans arrived in open trucks to the dairy.

A high percentage is within the following standards:

AM	87×10^4	a	30×10^6	DECOLORATION	in 30'
CTT	130×10^4	a	imposible to count	FORMAZAN	in 30'

73,33 of the samples showed the predominance in the microbial flora Pseudomonadaceae. Its metabolism would have a lightly higher marked influence in the results of the reduction test with 2, 3, 5 triphenil tetrazolium, CTT, than with the Blue Methylene Test.

From this study, CTT test could be suggested to be used in the control of refrigerated milk carried in bulk refrigerated tanks under 10°C , used as raw material in the elaboration of dairy products that should be stocked.

INTRODUCCION

El empleo del frío en la conservación de los alimentos, marca una etapa de avanzada tecnológica en los últimos años. Sin embargo, en lechería, cuando se aplica a leches de mala calidad bacteriológica, la refrigeración, no hace sino acentuar una falsa seguridad.

Existe una flora capaz de desarrollarse a bajas temperaturas, causando graves riesgos de conservación, por lo que es neces-

rio, una mayor información sobre las condiciones de desarrollo de esta flora, para determinar con precisión los parámetros del empleo del frío en lechería.

El primer calificativo de "psicrófilo", se atribuyó a aquellas bacterias cuya óptima temperatura de crecimiento es menor de 20, 15 y 10°C, según diferentes autores. En el año 1960 Eddy (1) propone el término de "psicrotrofos" para aquellos microorganismos de gran importancia en microbiología alimentaria, que teniendo un crecimiento óptimo a 5-7°C también pueden desarrollarse a 30°C. Esta definición es confirmada por la Federación Internacional de Lechería en el año 1968.

Representan los gérmenes psicrotrofos un gran interés tecnológico, por constituir la leche un medio privilegiado para muchos de ellos. En su mayoría son bastones gramnegativos, aerobios, no esporulados, siendo los más frecuentes en leches los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, hongos y levaduras. Veisseyre (2).

Normalmente, la leche no contiene estos gérmenes. Por lo tanto su presencia obedece a contaminación, constituyendo fuente de la misma el agua, suelo, forrajes, implementos de lechería, etc.-

Los principales factores que determinan la importancia de la flora psicrotrofa de la leche cruda son:

- la contaminación inicial.
- naturaleza de la contaminación inicial.
- temperatura y velocidad de refrigeración, muy bien estudiadas por Mourgues y col (8) en 1967.

Cuando la temperatura de la leche llega a 6-7°C, la flora psicrotrofa acusa un notable desarrollo y a 8-10°C el crecimiento es aun más considerable. Parecería pues correcto, pensar, en la conveniencia de enfriar la leche lo más rápido posible en una temperatura cercana a 0°C. Sin embargo, se debe tener en cuenta aquí la lipólisis resultante de la lipasa natural de la leche, que es tanto más marcada cuanto más baja es la temperatura.

En el enfriamiento de la leche, se deben tener en cuenta las cargas microbianas y las propiedades fisico-químicas. Sería preferible enfriar rápidamente de 0°C a -1°C una leche de mala

calidad bacteriológica, evitando así un crecimiento importante de psicrotrofos. Una leche de buena calidad bacteriológica puede ser enfriada de 4 a 2°C, disminuyendo así los riesgos de la lólisis.

La actividad proteolítica y lipolítica de estos gérmenes, repercute en la calidad organoléptica con alteraciones del sabor (amargo, rancio, putrefacto, etc.) los que lamentablemente no desaparecen con el tratamiento posterior de la leche.

En nuestro país, las cooperativas lecheras tratan cada vez más de sistematizar el control higiénico de la leche, evaluando a través de pruebas de reducción su calidad bacteriológica

Hemos puesto de manifiesto en un trabajo anterior (3) el escaso valor de las pruebas de reducción, cuando son realizadas en leches crudas con altos recuentos en células somáticas, presencia de antibióticos, antagonismo o predominio bacteriano.

En este trabajo se estudia la influencia de la flora psicrotrofa en los tests de reducción con predominio de *Pseudomonas* spp.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de leche de mezcla fueron extraídas de tarros de 30 lts. en horas de la mañana. Estos son habitualmente transportados en camiones abiertos. Una vez retiradas fueron mantenidas en refrigerador 2 a 3 horas, a 5°C. Este estudio se realizó entre el mes de agosto de 1976 y el mes de enero de 1977.

1.- Recuento de gérmenes psicrotrofos.-

Se realizaron siembras partiendo de diluciones 10^2 , 10^4 , y 10^6 e incubando a $5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5-7 días. Se empleó el medio gelosado para numeración de aerobios viables recomendado por Buttiaux (4) para gérmenes psicrotrofos.

2.- Prueba de reducción de colorantes.-

a.- AZUL DE METILENO.- Se empleó una solución preparada con una tableta de 0,5 grs. de peso, conteniendo 9 mgrs. de tiocianato de azul de metileno (Blauenfeldt & Twede, Copenhague) en 200 ml. de agua destilada hervida y fría Rossi Lema,

Echenique y Caruso (5). A cada tubo de 10 ml. de leche, se le agregó 1 ml. de esta solución. Se incubó en BM a 37°C, realizando la primera lectura a los 30 minutos y luego a cada hora.

b.- 2, 3, 5 Cloruro de Trifeniltetrazolium (TTC). Las combinaciones tetrazólicas se convierten en compuestos rojos de formazán por la acción reductora. Estas sales descubiertas en 1894 por Pechmann y Runge citado por Demeter (6), tienen la ventaja de colorear las bacterias y células en rojo y formar un precipitado rojo estable en presencia de oxígeno. Se agregó 1 ml. de una solución al 1% a 10 ml. de leche, incubando a BM a 37°C. Se realizaron las lecturas simultáneamente con el AM.

c - AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE **Pseudomonas** spp.-

De todas las cajas se contaron y se repicaron colonias verde-azuladas y/o fluorescentes en medio gelosado inclinado. Se incubaron a 30°C 24 horas.

Investigación de oxidasa.

Las cepas oxidasa positivo, fueron inoculadas en el medio King A y King B.

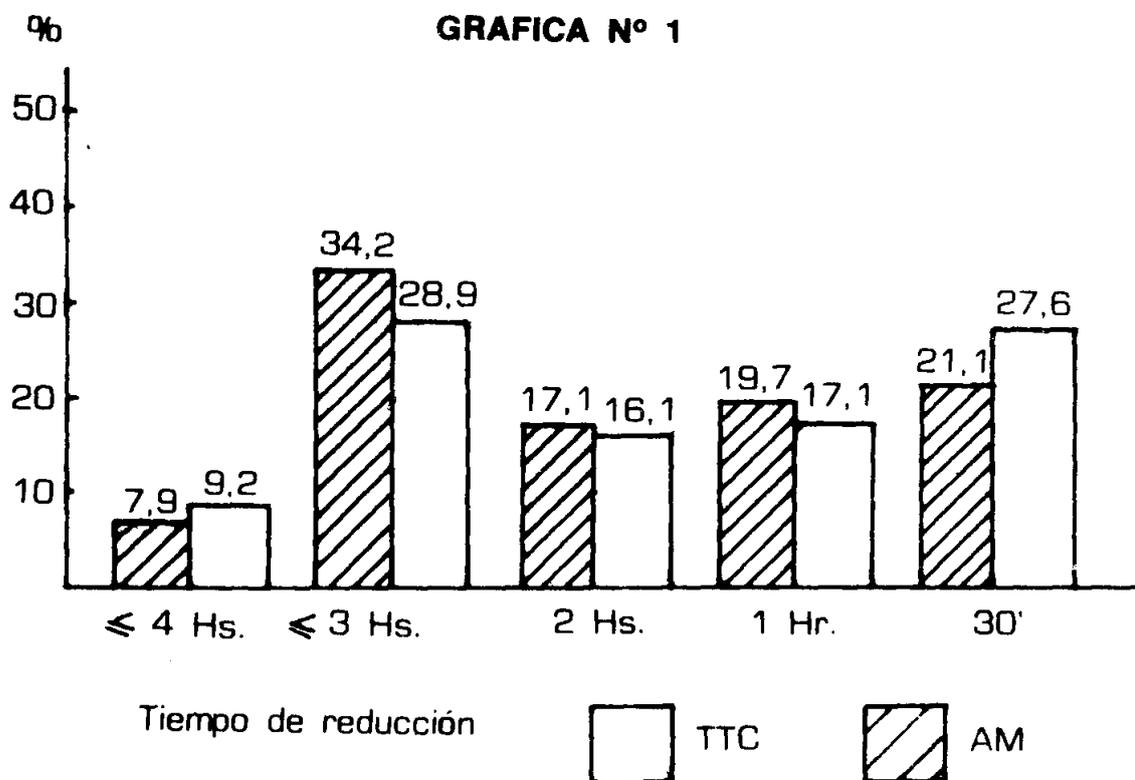
RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los porcentajes que redujeron el AM y TTC de 30 minutos a 4 horas.

TABLA I

TIEMPO DE REDUCCION	% A.M.	% TTC
4 hs	7.9	9.2
3 hs.	34.2	28.9
2 hs.	17.1	16.1
1 h.	19.7	17.1
30	21.1	27.6

En la Gráfica N° 1 se observa una mayor sensibilidad al TTC en 30 minutos (27,6%) frente al AM (21,1%), mientras que a las 4 horas se mantiene la sensibilidad al TTC aunque en porcentaje menor (TTC 9,2% / AM 7,9%). El AM en cambio, se manifestó más sensible que el TTC de 1 a 3 horas.-

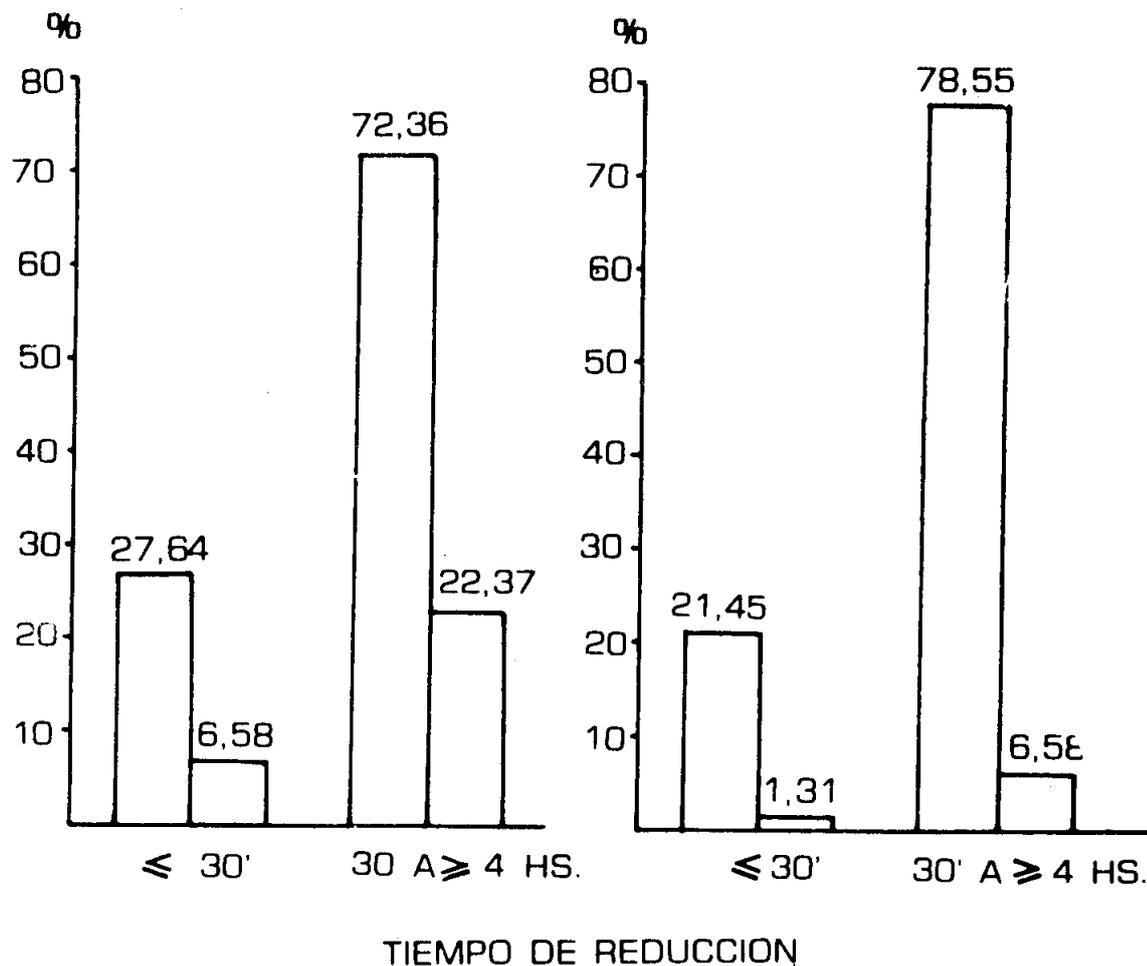


En la Tabla II se observa que del total de muestras que redujeron en 30 minutos al TTC, demostró mayor sensibilidad el 6,58% frente al 1,31 para el AM, valores que están representados en la Gráfica N°. 2.-

TABLA II

TIEMPO DE REDUCCION	TTC%	AM %	>SENSIBILIDAD TTC %	>SENSIBILIDAD AM %
≤ 30'	27,64	21,45	6,58	1,31
30' A ≥ 4 Hs.	72,36	78,55	22,37	6,58

GRAFICA N°. 2



En la Tabla II se observa que del total de muestras que redujeron en 30' al TTC, demostró mayor sensibilidad el 6,58% frente al 1,31% para el AM, valores que están representados en el mismo tiempo.

La Tabla III muestra el número de germen psicrotrofos correspondientes a los tiempos de reducción, destacándose que los mayores recuentos fueron para el TTC en 30', frente al AM en el mismo tiempo.

El estudio de la flora psicrotrofa reveló que el 73,3% correspondía a *Pseudomonas* spp.

TABLA III

Recuentos de psicrotrofos en relación a los tiempos de reducción.

TIEMPOS DE REDUCCION	AM	TTC
30	30×10^6	INCONTABLE
1 HORA	30×10^6	50×10^6
	15×10^6	30×10^6
3 HORAS	3×10^6	10×10^6
4 HORAS	3×10^5	3×10^6

DISCUSION

La finalidad de la refrigeración de la leche cruda en el tambo o en la planta, es proteger todas sus propiedades: organolépticas, fisicoquímicas, bacteriológicas, etc. hasta su transformación. En nuestra explotación lechera el mal manejo del ordeño, de la recolección y del transporte, incide negativamente en la calidad de la leche. Se agrega a esto un período crítico para la conservabilidad de la leche. La incoordinación entre el ordeño y el transporte, conduce a una verdadera "reincubación" de las leches, sometidas a temperaturas de 10 a 12°C en invierno, y de 25 a 30°C en verano al borde de las rutas.

De estas consideraciones parecería ser más importante la composición de la flora microbiana que el número real de bacterias presentes.-

Le Grange y Nelson (7), encontraron que 1/3 de las muestras colectadas en tanques presentaban recuentos (SPC) dos veces mayores que los estimados por el test de resazurina, y que las cepas representativas de psicrotrofos poseían una débil aptitud de reducción de la misma.

Existe actualmente la tendencia de suplantar el transporte en tarros por los tanques-cisterna. Pero la sola aplicación del frío no podrá reemplazar las buenas condiciones de higiene y manejo.

Evidentemente las muestras estudiadas corresponden a leches con una contaminación inicial elevada en gérmenes psicrotrofos.

De acuerdo a los estudios de conservabilidad realizados por Feuillat, Le Guenec y Olsson (8) las leches con cargas iniciales entre 500 y 2500 gérmenes psicrotrofos pueden conservarse a 4° C durante 5 días, mientras que las que tienen más de 50.000/ml. sólo podrían conservarse 3 días.

Dado que las muestras por nosotros estudiadas presentaron recuentos mayores de 3×10^6 en su mayoría, se deduce que el período de conservación a 4°C se acortaría considerablemente.

El predominio del género **Pseudomonas** spp. en nuestra flora psicrotrofa adquiere importancia por:

1°.- En muchos de nuestros tambos el abastecimiento de agua es deficitario, siendo ésta la principal fuente de contaminación por *Pseudomonas*.

2°.- Las alteraciones físico-químicas ligadas a la actividad proteolítica y lipolítica de algunas especies.

3°.- La significación patógena de **Ps. aeruginosa**.

4°.- Deterioro de la calidad mercantil, con alteraciones visibles de color por la producción de pigmentos.

CONCLUSIONES

1°) La contaminación inicial en gérmenes psicrotrofos condiciona el período de conservación de las leches enfriadas.

2°) En esta primera comunicación encontramos una mayoría con una flora psicrotrofa mayor de 3×10^6 , lo que constituye un alerta a los empresarios lecheros que pretenden mejorar la

calidad de la misma, sólo disponiendo de transportes refrigerados.

3º) Sugerimos profundizar el estudio de empleo del TTC en las pruebas de reducción, con el fin de juzgar más la aptitud de transformación y conservabilidad de las leches enfriadas que la calidad bacteriológica basada en el número real de bacterias.

4º) Sugerimos desde el punto de vista tecnológico, el estudio de la implicancia el género **Pseudomonas** spp. en la actividad proteolítica con solubilización parcial de la caseína traducida en definitiva por una disminución del extracto seco y su consiguiente repercusión en la elaboración de subproductos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) EDDY, B.P. 1960. *The use of meaning of the term psychophilic* J. Appl. Bact. 23, 189-190.
- 2) VEISSEYRE, R. 1975, *Technologie du lait*. Simi ed. Paris. Maison Roustique.
- 3) CARUSO, N.S. de, GONZALEZ, M., MUÑOZ, E. FEDER, A. 1976. *Escaso valor de la prueba de azul de metileno en el control bacteriológico de leches crudas*. An. Facultad de Vet., Montevideo.
- 4) BUTTIAUX, BEERENS, TACQUET, 1974. *Manual de techniques bacteriologiques*. Ed. Medicales Flammarion, 4eme. Ed.
- 5) ROSSI LEMA, L., ECHENIQUE, CARUSO, N.S., de 1969. *Resazurina, azul de metileno y contaje en placas en el control del contenido bacteriano de la leche higiénica*. An. de la Facultad de Vet. TOMO VII, No. 6 Montevideo.
- 6) DEMETER, K. 1969. *LACTOBACTERIOLOGIA*. Ed. Acribia.
- 7) LE GRANGE et NELSON. 1965. *Evaluación de los tests de reducción de colorantes para leche a granel enfriada, grado industrial*. J. Dairy Sci. Vol. 48:1129.
- 8) MOURGUES, R.; VASSAL, L. et AUCLAIR, J. *Influence de la vitesse de refroidissement et de la temperature de conservation en tanks de ferme sur le developpement de la flore microbienne du lait cur*. Rev. Laitiere Francaise, 1967.