

# **Resazurina, azul de metileno y contaje en placas en el control del contenido bacteriano de la leche higiénica**

Por los Dres. LIBERO ROSSI LEMA Y LUIS ECHENIQUE  
y Bach. NENUFAR SOSA DE CARUSO

Instituto de Industria Animal

## **INTRODUCCION**

El conocimiento del contenido bacteriano de una leche es fundamental para el juzgamiento de sus condiciones higiénicas y en consecuencia uno de los pilares en que se apoya la calificación de alimento apto para el consumo de los grandes centros poblados.

El consumo de leche higiénica constituye siempre una preocupación permanente de las autoridades sanitarias de cada país que tratan por todos los medios posibles de ajustarse a la aplicación de reglamentaciones y técnicas cada vez más perfeccionadas. Montevideo, como pasa con otras ciudades del mundo, necesita para su abastecimiento normal, la concentración de leche producida en distintos puntos del país y cuya cifra en número global es aproximadamente de quinientos mil litros diarios. Esta cantidad en algunas épocas del año se acrecienta y casi puede llegar a duplicarse sin que ello implique que deba ser consumida como leche integral, puesto que es notorio que en estas condiciones una parte pasa a ser industrializada. Pero para los efectos del juzgamiento de su calidad higiénica el problema no varía.

Siendo la leche un alimento con un alto contenido acuoso, rico en proteínas e hidratos de carbono, constituye un excelente

medio de cultivo de diferentes gérmenes que, colocados en condiciones de multiplicarse, ocasionan serias alteraciones de su estado físico-químico, que la vuelven inapropiada para la alimentación.

La leche que se concentra en nuestra ciudad para el abastecimiento, ha sido obtenida a diferentes distancias, a veces desde puntos alejados o difíciles de acercamiento por dificultades de camino, o ha sido manipulada de diferente modo, según las costumbres de los productores, o ha llegado a plazos muy diferentes desde su ordeño hasta la usina de pasteurización y en consecuencia debe presentar culturas microbianas diferentes y alteraciones que corresponden a estas culturas. Por estas causas someramente expuestas el Instituto de Industria Animal ha considerado de interés, iniciar un trabajo que conduzca a un conocimiento mejor, actualmente, de los contenidos microbianos de las leches que llegan a la usina de pasteurización y que posteriormente sirven de alimentación a la población.

Además se ha considerado también de interés la comparación de algunos métodos que conduzcan frente a la naturaleza de estas leches, a la aplicación más o menos sencilla de una técnica realmente recomendable.

La evaluación de la actividad microbiana de una leche se juzga clásicamente en función de dos elementos: el número de gérmenes y la actividad de sus diastasas.

En cuanto al primer elemento o sea el número de gérmenes, puede apreciarse por contaje directo según Breed o por contaje en placas después de constatar su viabilidad. Cada uno de estos métodos tiene sus partidarios. En el método de Breed se cuentan gérmenes extendidos en el porta-objeto y que en la leche puedan encontrarse vivos o muertos; en el método en placas se cuentan sólo las colonias que han surgido, es decir, aquellas que corresponden a gérmenes vivos y que han demostrado su viabilidad.

En el segundo elemento o sea el diastásico se avalúa el poder de las reductasas microbianas frente a un colorante que como el azul de metileno o la resazurina presentan un cuadro de variaciones fácilmente captables en tiempos de lecturas comprendidos desde los primeros minutos hasta varias horas. En la presente nota, nosotros damos los resultados obtenidos, trabajando con la resazurina, azul de metileno y el contaje en placas frente a una misma leche cuyo contenido microbiano se deseaba conocer.

## TEST DEL AZUL DE METILENO

El test del azul de metileno está basado en el hecho de que la coloración azul del mismo, pertenece a la forma oxidada y la coloración blanca en presencia de la leche corresponde a la forma reducida o leuco-derivado.

Las bacterias en desarrollo consumen el oxígeno libre o débilmente combinado en la leche, determinando un medio ambiente que facilita la percepción de los óxido-reductores a través de los cambios de color del azul al blanco y en consecuencia de la actividad de las reductasas producida por los gérmenes. Las reacciones que se producen al influjo bacterial evidentemente dependen del número y tipo de bacterias, según sean débiles o fuertemente reductoras; de su promedio de crecimiento y del consumo de oxígeno.

El azul de metileno usado en la preparación de las soluciones ha sido generalmente reconocido como puro medicinal según diferentes autores. Ultimamente, Thornton y Sandin por indicación del Jefe de la Comisión de Standarización de Coloraciones Biológicas han recomendado el uso del tiocianato de azul de metileno.

Pero el azul de metileno utilizado en esta prueba como indicador, no es necesario que se encuentre en una concentración determinada con toda exactitud puesto que el viraje de su color igualmente se opera con ligeras variaciones de la concentración y reúne por lo tanto las condiciones generales de la fidelidad exigible. Sin embargo no debemos perder de vista que un aumento apreciable de la concentración puede desnaturalizar el sentido de la prueba al inhibir el crecimiento de algunas bacterias. Es un hecho conocido en bacteriología al aludir a una bacteria determinada, decir que cultiva o no, en un medio con azul de metileno en proporciones del 0.1% a 0.01%.

El test del azul de metileno nos da en consecuencia una indicación aproximada del número de bacterias de la leche.

**Conducción de la prueba.**

La solución que figura actualmente en los Standards Methods for the Examination of Dairy Products, se obtiene disolviendo una tableta de tiocianato de azul de metileno de 0,5 gramo, de peso y con 9 miligramos de colorante certificado por la Biological Stain Commission tal como el preparado por la Blaun Feidt y Tyde de Copenhagen, en 200 centímetros cúbicos de agua destilada, hervida y fría, utilizándose 1 c.c. de la solución en 10 c.c. de leche.

A pesar de no figurar en las últimas ediciones de los Standars Methods, se continúa usando la solución de azul de metileno, tal como figura en ediciones anteriores, preparando la solución con 1 gramo con 1 (un gramo, con uno) de azul de metileno certificado, en 500 c.c. de agua destilada hervida, esterilizada y fría, constituyendo ésta la **"solución madre"**.

Esta solución se conserva bien durante largo tiempo, al abrigo de la luz y temperaturas altas.

Tomando de la solución "madre" un centímetro cúbico, se diluye en 39 c.c. de agua destilada, hervida y fría, luego esterilizada brevemente y bien conservada, esta solución puede ser utilizada dentro de la semana de preparada. Para la prueba se utiliza un centímetro cúbico de esta solución en diez c.c. de leche o sea a una concentración de 1/200.000.

Los tubos que se utilizan, deben ser estériles a igual que los tapones, pudiendo ser éstos, de rosca, metálicos, de plástico o corcho previamente parafinados (nosotros utilizamos los que poseen tapón de baquelite y de rosca).

Los tubos con la leche y el colorante, son llevados al Baño María frío, dándose calor hasta que el termómetro alcanza la temperatura de 37°C, instante en que se comienza a contar el tiempo, debiendo permanecer los tubos en el Baño María o ser llevados a la estufa a 37°C donde continuará la observación.

En nuestra experiencia, la observación, se realiza cada 20 minutos en la primera hora, luego cada media hora hasta completar 8 horas.

La observación se continúa hasta apreciar la reducción (hidrogenación del azul de metileno, pasando a leuco-derivado que por oxidación pasa al azul nuevamente, siendo por consiguiente una reacción reversible) de las 4/5 partes inferiores y clasificando las leches de acuerdo a los tests oficiales de apreciación de su calidad.

En esta experiencia no se realizaron apreciaciones de acuerdo a una modificación introducida por Wilson, dado que aquí sólo nos referimos a su valor comparativo con el test de la resazurina y el contaje en placas, dejando para una posterior comunicación, las modificaciones que estamos estudiando con la finalidad de establecer técnicas simples, económicas y prácticas que permitan obtener valores, referentes al grado higiénico de obtención de las leches para el consumo directo o para la industria y que en definitiva den la base para una rápida y concluyente calificación.

### Limitaciones del test.

El test está basado como dijimos en el consumo de oxígeno por el contenido y desarrollo microbiano que es realizado hasta el punto que el azul de metileno es reducido, tratando de obtener como indicación, el número de bacterias originalmente presentes en la leche. Este planteamiento teórico se complica, si tenemos en cuenta los siguientes hechos:

- a) diferencias en el promedio de crecimiento de las bacterias;
- b) diferencias en el consumo de oxígeno por bacteria;
- c) falta de uniformidad en la distribución de las bacterias, al cremar la leche, siendo barridas por los glóbulos butirosos;
- d) diferencias entre la cantidad de oxígeno disuelto en la leche justo hasta el momento antes de realizar el test;
- e) presencia de otros agentes reductores de la leche.

Las diferencias entre especies de bacterias, relacionadas con el promedio de crecimiento y el consumo de oxígeno por bacteria, son perfectamente conocidas y deben tomarse en cuenta de tal modo que, igual tiempo de reducción, no significa igual número de bacterias en dos muestras estudiadas. Sin embargo en leches con alto contenido microbiano, las fuentes de contaminación son numerosas y corrientemente las floras bacterianas son a menudo comparables, mientras que en las leches con recuentos bacterianos bajos, las fuentes de contaminación son más restringidas y las floras microbianas son mucho menos comparables. Este factor es principalmente el que debe tenerse en cuenta y es el que produce discrepancias entre el tiempo de reducción y el recuento bacteriano en el caso de leches de alta calidad.

El proceso del cremado de las leches influye en la seguridad o eficiencia del test. La distribución de las bacterias pierde uniformidad con el cremado y así puede observarse una zona reducida en contacto con una mayor superficie grasa en momentos que el color azul domina uniformemente el resto del tubo en observación. Las leches con desiguales caracteres grasos propenden a dar reacción de este tipo aunque tengan igual concentración bacteriana y el test puede perder eficacia, sobre todo en las leches de alta calidad y con escaso tenor bacteriano, cuando el tiempo de reducción es más extenso. La grasa por sí misma tiene un poder reductor del azul de metileno que ha sido atribuido a la absorción del indicador por los glóbulos grasos, sustrayendo al equilibrio blanco-azul de la reacción, la parte correspondiente al blanco, lo que favorece la reducción.

## TEST DE LA RESAZURINA

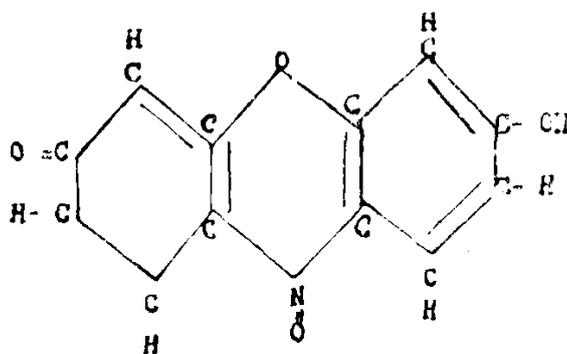
La prueba de la resazurina es empleada como un test de reducción en forma muy comparable en este aspecto a la del azul de metileno, pero además según algunos autores, podría ser utilizada eficazmente para revelar o despistar leches patológicas o anormales.

Este colorante fué propuesto como test reductor en el año 1935 por Ransdell y Evans (3). La resazurina es azul a la reacción de la leche normal (Ph 6.5: 6.6) y rojo (5.3), correspondiendo el primer estado de su reducción a la resorufina, de color rosado en solución en la leche. En una etapa posterior o última se forma la hidroresorufina que es incolora. De esta manera la reducción del colorante se opera en una primera instancia, cambiando el color de azul violáceo a rosado y pasando en último término al incoloro. Al virar del color azul-violáceo al rosado, el colorante pasa por varios matices, lila, malva, rojo malva y malva-rojo.

El primer estado de la reducción es irreversible, no influenciado por el oxígeno, mientras que el blanco producido al hidratarse la resazurina es reversible bajo la acción del oxígeno.

### Química de la resazurina.

La resazurina es el 7-oxi-phenoxazona-(2)-10 óxido.



Weslesky manifiesta que Beilstein fué quien primero la preparó y simultáneamente en el año 1872 obtuvo un compuesto semi-reducido: la resorufina. Weslesky describió esta nueva sustancia bajo el nombre de diazo-resorcina, sintetizadas ambas por tratamiento a baja temperatura empleando una solución de resorcina en éter por medio del ácido nítrico fumante.

Los dos compuestos, de interés en relación con sus hermosos colores fueron más tarde a sugestión de Nietzki, Dietzer y Ma-

cker, designados con nombres sin mayor trascendencia, siendo conocidos hoy día por: resazurina y resorufina.

La resazurina pertenece al grupo de los colorantes de las quinonas heterocíclicas descritas hoy bajo el nombre común de oxazonas.

La resazurina tiene una fórmula empírica de  $C^{12} H^7 O^4 N$  y reacciona como ácido frente a una base, dando con el sodio una sal que es actualmente el compuesto en cuestión: la resazurina. Esta constituye en solución acuosa un colorante gris-azul. Presenta además un color azul-violeta con una fluorescencia rojiza y con adición de alcohol adquiere un color rojo vino intenso.

En solución acuosa al 2% constituye una solución estable, si se conserva al abrigo de la luz y en frío (heladera, lejos del freezer).

La estabilidad responde como un carácter casi general para el caso de casi todas las soluciones colorantes diluidas; sin embargo después de una conservación prolongada en las condiciones citadas, pierde en gran parte sus caracteres tintoriales, sobre todo después de un mes de preparada.

La solución de resazurina es muy sensible a la luz directa como también a la luz artificial fuerte.

Aunque la actual síntesis no ofrece mayores dificultades, en las formas antiguas de preparación, presentaba algunos inconvenientes para llegar a la purificación, dado que se constataba entre otros hechos la presencia de compuestos semi-reducidos, como la resorufina que es simultáneamente sintetizada con la resazurina y que la separación de las dos sustancias no puede ser fácilmente realizada.

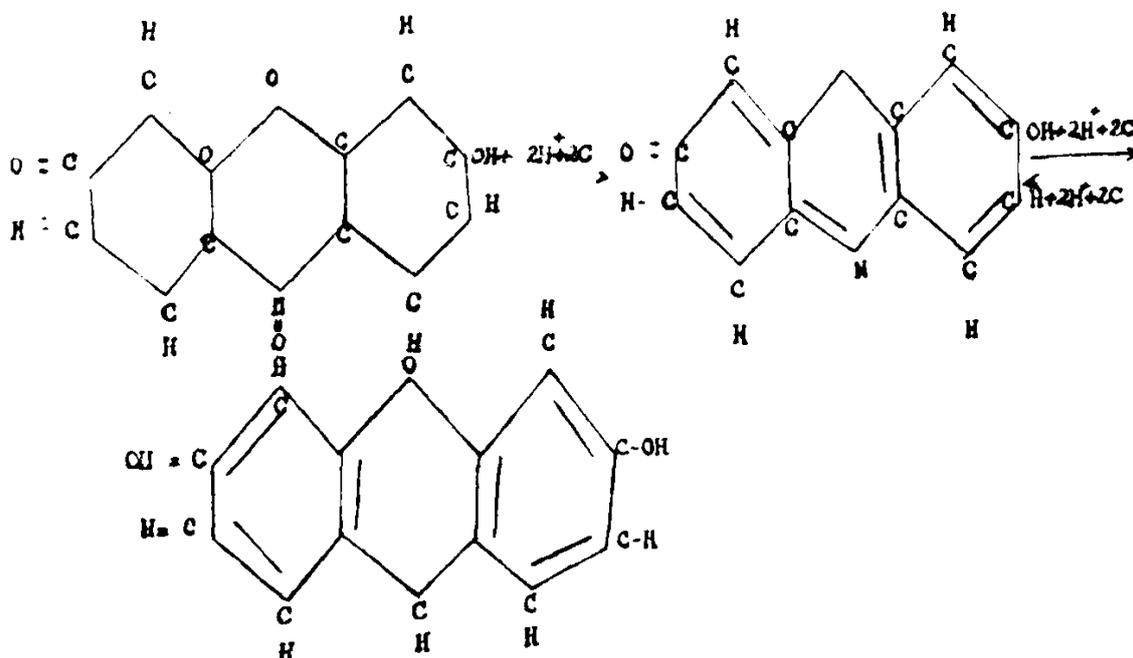
Así Thornthorn, Mc Clure y Sandin afirman que otra sustancia no conocida es sintetizada durante la producción de la resazurina. Teniendo en cuenta estos hechos, es que se ha señalado que no todos los preparados de resazurina comerciales son aptos para ser utilizados en estas pruebas, tal cual se ha señalado en los países donde este producto ha estado en práctica corriente, como Estados Unidos de Norte América y Canadá.

En el año 1943 teniendo en cuenta este aspecto, fué presentado un nuevo método de producción de la resazurina, según el cual es sintetizada a partir de la resorcina y nitro-resorcina en solución de acetona acidulada con el ácido sulfúrico ( $H^2SO^4$ ) y la adición de un agente oxidante: el peróxido de manganeso. Presumiblemente esta síntesis haya facilitado la obtención de un producto puro o de mucha pureza, el cual ha permitido evidentemente los estudios que se relacionan con su utilización para la calificación de las leches.

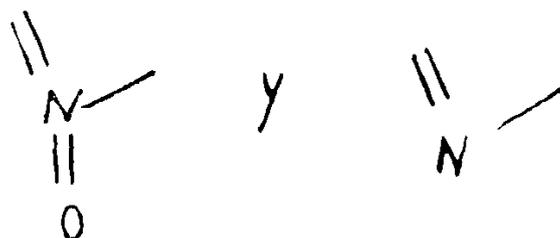
REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

Mientras que la resazurina utilizada actualmente en los Estados Unidos y Canadá es una forma aparentemente pura; la azurufina utilizada por los alemanes e investigadores daneses, tiene un tinte rojo distinto, lo que parecería indicar la presencia de ciertas impurezas existentes y que serían imputables a la presencia de resorufina.

La utilización de la resazurina como indicador redox (así denominado al sistema constituido por el proceso reversible en el cual la oxidación de un elemento, corresponde a la reducción de otro elemento del mismo sistema) según lo establece Klotz, permite suponer que el azul-azul de resazurina es primeramente reducido a resorufina rosado vivo y luego sucesivamente reducido a un compuesto incoloro de hidroresorufina o tal vez como más corrientemente lo denomina Twigs (5): **dihidroresorufina**. Agrega Klotz (6), que la reducción de resazurina a resorufina es un proceso irreversible, mientras que la ulterior reducción de resorufina a dihidroresorufina es reversible. Los procesos referidos anteriormente lo establecen Mundinger y Wolf (7) de esta manera:



Siendo los colores de la resazurina insertados con doble atadura en los grupos cromóforos:



Y estas dobles ataduras son perdidas en la reducción completa de dihidro-resorufina, faltándole a esta sustancia su característica cromogénica, siendo por tanto incolora.

### Técnica del test de la resazurina.

En nuestra experiencia utilizamos las tabletas de resazurina proporcionadas por la Nacional Aniline Division of Allied Chemical and Dye Corporation N.Y., las que contienen por tableta 0 gramo 0 11, 6 del producto.

Estos comprimidos deben encontrarse totalmente enteros, no faltarles sustancia en el momento de su empleo, de manera que al hacerse la dilución, ésta corresponda exactamente a su contenido en sustancia colorante.

Para preparar la solución, se disuelve un comprimido en 200 c.c de agua destilada, hervida y fría, presionando el comprimido de manera que si la solución se va a utilizar de inmediato, no haya error, en el caso de que quedara parte del comprimido sin disolver.

Las soluciones se conservan una semana, si se tiene la precaución de mantenerla en frasco oscuro, al abrigo de la luz y en el refrigerador.

Los tubos utilizados corresponden a los de rosca, y son esterilizados previo a su uso, igual que las pipetas que deben ser individuales para cada muestra de leche.

Se colocan en cada tubo 10 c.c de leche, previamente bien uniformizada; una vez puesta la leche en los tubos se agrega rápidamente con pipeta estéril un centímetro cúbico de la solución de resazurina de acuerdo a la preparación antes mencionada. Se invierten los tubos y se llevan a Baño María frío, procediéndose a dar calor; cuando el termómetro alcanza la temperatura de 37°C se comienza a tomar el tiempo y simultáneamente se hace la observación, es decir a los cero minutos, registrando todos los cambios de color observados y haciendo la anotación correspondiente cada diez minutos, dentro de la primera hora y cada quince minutos dentro de la segunda y ter-

cer hora. La certificación de los colores, se hace de acuerdo a la tabla proporcionada por la Munsell Color Company, 10 East Franklin Street, Baltimore Md. U.S.A..

## CONTAJE MICROBIANO EN PLACAS

### Recolección de muestras.

Tanto para realizar las pruebas del azul de metileno, como de la resazurina y del contaje en placas, la leche debe ser bien mezclada para luego retirar la misma, ya sea del tarro, del tanque de la balanza o de otros continentes, mediante la utilización de pipetas, dippert o caños de vidrio con embocadura de algodón, adaptados para tomar muestras de grandes recipientes, debiendo ser todo el instrumental estéril.

Para apreciaciones de orden oficial, o cuando se trata de realizar tomas de orden educativo o reglamentarias, la extracción de la muestra debe ser realizada preferentemente de recipientes no abiertos o que no hubieran sido destapados anteriormente.

Conviene que el material sea utilizado individualmente; sin embargo podrían utilizarse más de una vez, siempre que se tuviera la precaución de enjuagarlos con agua fría y luego agua caliente, virtualmente hirviendo por algunos instantes.

Las muestras de leche recogidas para estas determinaciones no deben ser conservadas más de 24 horas, estableciéndose el tiempo que ha mediado entre la extracción de la muestra y el comienzo de la prueba. Las muestras deben ser conservadas siempre a una temperatura no superior a los 4° C.

Para la prueba del contaje en placas, la muestra es transferida a frascos de color caramelo, con tapa de vidrio, de preferencia en una cantidad de 20 c.c. pero no ocupando la leche, más de los 2/3 o los 3/4 de la capacidad del frasco. Cuando el tiempo es mayor de 4 horas entre la extracción de la muestra y el comienzo de la prueba, debe hacerse constar.

Una vez llegado el material al laboratorio, se procede a su examen, para lo cual se hace un agitado fuerte de 25 veces aproximadamente, extendiendo el brazo en radio de 30 cms. y en etapas de 7 segundos, de acuerdo a lo que establecen los métodos standards. Las diluciones optadas de manera de obtener recuentos de más de 30 colonias y menos de 300 por c.c. se hacen un poco difícil, por la variedad extraordinaria de leches examinadas, en sus cargas microbianas, lo que está ligado a una serie de factores: distintas épocas del año, variaciones grandes de temperatura, le-

ches que no se someten a un rápido enfriamiento o que habiendo sido enfriadas, las condiciones de transporte son totalmente deficientes. Todos estos factores que conspiran lógicamente, en la apreciación de la calidad de las leches por medio del recuento bacteriano, están previstos en los métodos oficiales recomendados.

Las diluciones que adoptamos para esta prueba, son las siguientes: 1:100; 1:10.000 y 1:20.000, utilizando para cada muestra, las dos últimas o sean 1:10.000 y 1:20.000. Las cajas de Petri son llevadas a la estufa a 37°C, por pares, es decir dos de cada muestra, haciéndose el contaje dentro de las 48 horas (más-menos 3 horas) mediante el empleo del campo oscuro Quebec.

### **Resultados obtenidos de las tres pruebas realizadas**

A continuación exponemos un cuadro comparativo de las pruebas realizadas, tomando de 80 muestras examinadas, aquellas que redujeron el azul de metileno en menos de tres horas y su correspondencia con el test de la resazurina y el contaje en placas.

---

Como puede apreciarse en el cuadro N° 1, de 80 muestras estudiadas, el 30% aproximadamente, redujeron totalmente el azul de metileno en menos de 3 horas, correspondiendo lógicamente un menor tiempo para la resazurina e indicando, salvo algunas excepciones, un mayor número de colonias por centímetro cúbico de leche examinada, en el contaje en placas.

Corresponde destacar, que hay un número de muestras que después de 8 horas de observación no redujeron aún el azul de metileno y se mantuvieron en el Patrón N° 4 de la escala Munsell y cuyo contenido microbiano, se expone a continuación en el cuadro N° 2.

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

CUADRO Nº 1

RESAZURINA			AZUL DE METILENO		CONTAJE EN PLACAS	
MUESTRAS	TIEMPOS	ESCALA	TIEMPO	REDUC. TOTAL.	COLONIAS e. c.	48 Horas
Nº 1	40'	Patrón Nº 4	2 h. 30'	R T	13.040.000	" "
Nº 4	10'	" "	40'	R T	incontable	" "
Nº 5	40'	" "	2 h.	R T	12.320.000	" "
Nº 12	10'	" "	20'	R T	26.880.000	" "
Nº 14	10'	" "	40'	R T	4.680.000	" "
Nº 15	60'	" "	2 h.	R T	1.920.000	" "
Nº 17	1 h. 20'	" "	2 h. 30'	R T	2.800.000	" "
Nº 25	50'	" "	2 h.	R T	12.400.000	" "
Nº 31	30'	" "	40'	R T	8.000.000	" "
Nº 34	10'	" "	20'	R T	incontable	" "
Nº 36	20'	" "	1 h. 30'	R T	1.280.000	" "
Nº 41	40'	" "	3 h.	R T	1.180.000	" "
Nº 42	10'	" "	1 h. 30'	R T	14.000.000	" "
Nº 43	60'	" "	2 h. 30'	R T	1.660.000	" "
Nº 45	10'	" "	60'	R T	7.940.000	" "
Nº 47	60'	" "	2 h.	R T	5.540.000	" "
Nº 51	30'	" "	1 h. 30'	R T	7.040.000	" "
Nº 52	50'	" "	3 h.	R T	12.960.000	" "
Nº 57	10'	" "	2 h.	R T	12.160.000	" "
Nº 61	60'	" "	3 h.	R T	1.060.000	" "
Nº 62	1 h. 15'	" "	3 h.	R T	230.000	" "
Nº 71	30'	" "	60'	R T	13.640.000	" "
Nº 73	60'	" "	3 h.	R T	1.340.000	" "
Nº 75	20'	" "	2 h. 30'	R T	2.870.000	" "
Nº 77	10'	" "	20'	R T	incontable	" "

ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

CUADRO Nº 2

Muestras	AZUL DE METILENO	RESAZURINA	CONTAJE EN PLACAS
	Más de 8 hrs. de observ.	Más de 8 hrs. de observ.	Colon. c.c. en 48 hrs.
Nº 2	se mantiene azul	Patrón Nº 4	230.000
Nº 7	" " "	" "	4.120.000
Nº 8	" " "	" "	6.040.000
Nº 9	" " "	" "	1.160.000
Nº 11	" " "	" "	320.000
Nº 19	" " "	" "	230.000
Nº 21	" " "	" "	340.000
Nº 26	" " "	" "	390.000
Nº 28	" " "	" "	1.860.000
Nº 29	" " "	" "	160.000
Nº 30	" " "	" "	660.000
Nº 33	" " "	" "	840.000
Nº 35	" " "	" "	880.000
Nº 38	" " "	" "	210.000
Nº 39	" " "	" "	7.000.000
Nº 40	" " "	" "	220.000
Nº 44	" " "	" "	4.680.000
Nº 53	" " "	" "	220.000
Nº 55	" " "	" "	540.000
Nº 56	" " "	" "	640.000
Nº 58	" " "	" "	780.000
Nº 60	" " "	" "	260.000
Nº 63	" " "	" "	700.000
Nº 72	" " "	" "	800.000
Nº 78	" " "	" "	120.000

Observando los cuadros que se adjuntan, relacionados los contajes microbianos en placas, con el test de la resazurina, nos encontramos con una estrecha equivalencia entre los valores señalados. Ello nos permite obtener, de igual forma a lo que en general es opinión de diversos investigadores consultados, una estrecha relación entre las dos pruebas mencionadas y de gran significación en la valoración de las leches higiénicas. Se observa sin embargo, un número de muestras de leche que hacen excepción a lo ya sustentado, pero ello debe obedecer posiblemente a especies microbianas poco reductoras y de escaso desarrollo.

También hemos notado y ello está de acuerdo con observaciones realizadas por diversos autores que muestras de leches con altos contenidos celulares leucocitarios, generalmente actúan con una actividad desusada en los primeros momentos de observación, haciendo progresar rápidamente el test de la resazurina, pero más adelante la reducción se detiene. Estas leches controladas por el método de Breed, realizado de acuerdo a la técnica de Black y Levine nos permiten afirmar lo antes manifestado.

Se desprende de ello, que el test puede tener una variante de gran importancia desde el punto de vista del despistaje de leches, con altos contenidos celulares leucocitarios obedeciendo a leches, de procedencia anormal o patológica.

## RESUMEN

En el presente trabajo se da a conocer el resultado de dos tests biológicos realizados simultáneamente en un total de 80 muestras de leche cruda y comparados sus valores con el contenido microbiano de las mismas. Su finalidad es llegar a un método rápido, seguro y eficaz para la mejor calificación de las leches que llegan a la usina de pasteurización. En ese sentido, hemos podido apreciar, que el test de la resazurina, es el que mejor cumple con nuestros propósitos si bien se observan algunas discrepancias, dadas ya sea, por que los gérmenes que integran la flora microbiana presente en la leche, desarrollan escasa actividad metabólica, operándose por tanto los cambios de óxido-reducción en un mayor tiempo del que debieran de producirse; o por que como ya mencionamos anteriormente, existen otros elementos reductores, como por ejemplo: células leucocitarias, linfocitos, etc., que confieren un carácter particular a la reacción.

En general los tests de resazurina, azul de metileno y el contaje en placas, se corresponden hasta donde lo permiten los hechos

ya establecidos, como son las diferencias óxido-reductoras, de diferentes bacterias, cantidad, etc..

### SUMMARY

This article gives the results of two biological tests, carried out simultaneously on a total of 80 samples of raw milk, and a comparison of the values obtained with the number of microbes contained. The object is to find a quick, sure and efficient method for the better classification of the milk which reaches the pasteurizing plant. We have found that the resazurin test is the one which best fulfils our purposes, even though there are some discrepancies. These are due either to the microbes in the milk possessing a low metabolic activity, so that the oxidizing and reducing changes take place more slowly than they should, or, as already mentioned, to the presence of other reducing agents such as leucocytes, linfocytes, etc., which give a particular characteristic to the reaction.

In general, the resazurin test, the methylene blue test and the slide count agree as far as is allowed by the facts mentioned, such as variations in oxidization and reduction for different bacteria, quantity, etc..

### RESUME

Le présent travail expose les résultats de deux tests biologiques réalisés simultanément sur un total de 80 échantillons de lait cru, leurs valeurs étant comparées au contenu microbien de ces échantillons. Le but de cette expérience est d'obtenir un moyen rapide, sûr et efficace pour un meilleur classement des laits arrivant à l'usine se pasteurisation. Dans ce sens, nous avons pu constater que le test de la resazurine est celui qui sert le mieux à nos fins, bien que l'on puisse constater quelques divergences, soit que les germes faisant partie de la flore microbienne du lait aient une faible activité métabolique, ce qui rendrait plus lents les changements d'oxydo-réduction, soit que, comme nous l'avons mentionné, il se trouve d'autres éléments réducteurs (cellules leucocytaires, lymphocytes, etc.) donnant un caractère particulier à la réaction.

En général, les tests de résazurine, du bleu de méthylène et du comptage par plaques donnent des résultats assez similaires, dans la mesure où le permettent les faits déjà établis, tels les différences oxydoréductrices, les différentes bactéries, les quantités, etc.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Standards methods for the examination of dairy products.* — Ninth Edition. 1948.
- MONVOISIN, A. — *Le lait et les produits dérivés.* Paris 1925.
- GODED y MUR. — *Industrias derivadas de la leche.* Colección Agrícola Saivat.
- HUNZIKER. — *Condensed milk and milk powder.* 6ª. Edition. . . . .
- SOMMER Hugo. — *Market milk and related products.* 2nd. Edition.
- US DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. — *Milk and ordenance and code.* 1953.
- HEMPLER Poul. — *Resazurin as indicator in reduction tests of milk.* Copenhague.
- RIVAS, José G. y MERZARI, Anibal. — *La rezasurina en la determinación rápida de la calidad de la leche.* Industria lechera N°310.
- LING, Edgar, R. — *Dairi chemistry.* Año 1956.
- GOLDIN, N. S. — *Grading milkwith the resazurin tests.* Journal of milk and food technology Vol. 12. N°1.
- HARVEY, CLUNE, W. — *Milk production and control,* and Hill, H. año 1956.
- DAVIES, W. L. — *The chemistry of milk.* London. (1939).
- SHERN, Kurt. — *Capítulos seleccionados sobre Higiene Moderna de la Leche.* 2ª Edición.
- MESSNER, Emilio. — *Examen de la leche.* Año 1934.
- ELLIKER, Paul. — *Practical dairy bacteriology.* First Edition.
- HAMMER, Bernard. — *Dairy bacteriology.* Third Edition.
- THIEULIN et VILLAUME, R. — *Elements pratiques D'Analyse et D'Inspection du lait.* 2ª Ed.
- ROCHAUX, A. et TAPERNOUX. A. — *Le lait et ses dérivés, chimie, bacteriology hígylene.* 2ª Ed.
- HASTING, E. G. — *Methylene blue test.* Circular 316.
- FOSTER, E. M. and FRAZIER, W. E. — *Laboratory manual for dairy bacteriology.*
- RENCO, Paolo. — *Microbiología del latte e dei latticini.* Ulrico Huepli, Milano. *Principios de la Legislación y el Control Lechero.* — F A O. Roma. (1956). *Comité mixto F A O O M S de expertos en Higiene de la Leche.* — 1ª Información. Roma.
- Pasteurización de la leche.* — Roma. Año 1954.
- PORNER, W., DEMONT, P., CHAVANES, D. — *Microbiologie laitiere.*
- ROSSEL DOS SANTOS. — *Métodos analíticos de Laboratorio Lactológico y microbiología de las Industrias Lácticas.* Año 1925.
- SANZ EGAÑA, C. — *Inspección Veterinaria en los mataderos, mercados y vaquerías.* 3ª Ed.
- WECKEL, K. G. and JACKSON, H. C. — *Laboratory Book. Milk composition and test.* University of Wisconsin.
- Codex Bromatológico.* — Provincia de Buenos Aires. 2ª Edición.
- PORCHER, Ch. — *Revue, le lait.* Varias.