



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

**ESTUDIO DE LA CONTAMINACION MICROBIANA
EN LA LECHE EN SEIS TAMBOS
DEL DEPARTAMENTO DE FLORES
EN DOS EPOCAS DEL AÑO**

por

Ana Victoria CARBALLO TERZAGHI
Marcelo ILUNDAIN PETRA
José Luis INCIARTE GONZÁLEZ
José María LATASTE HARRIAGUE

T E S I S

1999

MONTEVIDEO

URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN LA
LECHE EN SEIS TAMBOS DEL DEPARTAMENTO DE
FLORES EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO

por

Ana Victoria CARBALLO TERZAGHI
Marcelo ILUNDAIN PETRA
José Luis INCIARTE GONZÁLEZ
José María LATASTE HARRIAGUE

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo
(Orientación Agrícola Ganadera)

MONTEVIDEO
URUGUAY
1999

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Jorge BERMÚDEZ

Dra. Estela REGINENSI

Ing. Agr. Laura ASTIGARRAGA

Fecha: 06 de agosto de 1999

Autor:

Ana Victoria CARBALLO TERZAGHI

Marcelo ILUNDAIN PETRA

José Luis INCIARTE GONZÁLEZ

José María LATASTE HARRIAGUE

AGRADECIMIENTOS

- A CONICYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto 3023 "Fondo Clemente Estable".
- Al Ing. Agr. Jorge Bermudez y la Dra. Estela Reginensi por su permanente apoyo y dedicación.
- A la Sociedad de Fomento Rural La Casilla, a su directiva y en particular a su gerente Ing. Agr. Gustavo Amir.
- A los productores, Alcides Abarno, José F. Berot, Sucesores de Héctor Ilundain, Roger Istebot, Antonio Martínez y Juan J. Placeres.
- A Conaprole, a su técnico regional Ing. Agr. Dardo Esponda.
- A la Intendencia Municipal de Flores, a sus técnicos Ing. Agr. Juan T. Henry y Química Elena Soba.
- A las Sras. Jimena Viejo, Ana Levin y Teresa Tombolini por su colaboración durante el procesamiento de las muestras.
- A las Flias. Ilundain y Lataste, por su apoyo logístico durante los muestreos.
- A nuestras familias, por su calor y apoyo en el no siempre fácil camino de la vida.
- A todos quienes de una u otra forma nos acompañaron y permitieron que llegáramos hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	Página II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 EVOLUCIÓN DEL SISTEMA DE PAGO DE LECHE EN URUGUAY	2
1.2 SITUACIÓN ACTUAL EN LA REGIÓN	3
1.2.1 <u>Brasil</u>	3
1.2.2 <u>Argentina</u>	4
1.3 SITUACIÓN EN OTROS PAÍSES	5
1.3.1 <u>Nueva Zelanda</u>	5
1.3.2 <u>Dinamarca</u>	6
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	8
2.1 MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE CRUDA	8
2.1.1 <u>Microflora inicial de la leche cruda</u>	8
2.1.2 <u>Tipos de microorganismos presentes en la leche cruda</u>	9
2.1.2.1 La microflora termodúrica	10
2.1.2.2 La microflora psicrótrofa	11
2.1.2.3 Microorganismos coliformes	12
2.2 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA	12
2.2.1 <u>Contaminación proveniente de ubre y pezones</u>	12
2.2.1.1 Tipo de microorganismos procedentes de los pezones	13
2.2.2 <u>Contaminación proveniente del ambiente</u>	15
2.2.2.1 Contaminación procedente del aire	15
2.2.2.2 Contaminación por agua	15
2.2.2.3 Contaminación proveniente de la tierra	16
2.2.2.4 Contaminación de la vegetación	16
2.2.3 <u>Contaminación proveniente del equipo de ordeño</u>	17
2.2.3.1 Máquina de ordeño	18
2.2.3.2 Tanque de frío	18
2.2.3.3 Tipo de microorganismos del equipo de ordeño y tanque de frío	19
2.3 INCIDENCIA DEL FRÍO SOBRE LA MICROFLORA DE LA LECHE	20
2.3.1 <u>Multiplicación de bacterias en leche almacenada</u>	20
2.3.2 <u>Almacenamiento refrigerado de la leche cruda</u>	21

2.3.3	<u>Efectos del transporte y almacenamiento subsiguiente</u>	22
2.4	EFFECTOS SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE	24
2.4.1	<u>Proteinasas y lipasas termoestables</u>	24
2.4.2	<u>Proteinasas</u>	25
2.4.3	<u>Lipasas</u>	26
2.4.4	<u>Fosfolipasas</u>	27
2.4.5	<u>Condiciones para la producción y actividad de las proteinasas y lipasas microbianas</u>	28
2.4.5.1	Temperatura	28
2.4.5.2	pH	29
2.4.5.3	Composición del producto	29
2.4.6	<u>Niveles aceptables de enzimas termoestables en leche cruda</u>	30
2.4.6.1	Relación entre actividad enzimática y conteo bacteriano	30
2.5	EFFECTO DE PROTEINASAS Y LIPASAS EN CALIDAD DE PRODUCTOS	31
2.5.1	<u>Proteinasas</u>	31
2.5.1.1	Leche pasteurizada	31
2.5.1.2	Leche UHT	31
2.5.1.3	Quesos	32
2.5.1.4	Productos lácteos cultivados	33
2.5.2	<u>Lipasas</u>	33
2.5.2.1	Leche pasteurizada y UHT	33
2.5.2.2	Crema de leche	34
2.5.2.3	Manteca	34
2.5.2.4	Quesos	35
2.5.2.5	Otros alimentos	36
2.6	CONTROL DE ENZIMAS TERMOESTABLES	36
3.	<u>OBJETIVOS</u>	40
4.	<u>METODOLOGÍA</u>	41
4.1	SELECCIÓN DE TAMBOS	41
4.2	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS	41
4.2.1	<u>Sitios de muestreo</u>	42
4.2.1.1	Muestras de leche	42
4.2.1.2	Muestras de agua	42
4.2.1.3	Hisopados	42
4.2.1.4	Muestras de alimento	42
4.2.1.5	Muestras del ambiente	42
4.2.2	<u>Períodos de muestreo</u>	43
4.3	ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	43

4.3.1	<u>Aislamientos primarios</u>	43
4.3.1.1	Muestras de leche	43
4.3.1.2	Muestras de agua	43
4.3.1.3	Hisopados	44
4.3.1.4	Alimentos	44
4.3.2	<u>Identificación de cepas bacterianas</u>	44
4.3.3	<u>Determinación de la actividad proteolítica en Slide</u>	45
5.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	46
5.1.	PRESENCIA DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS Y PSICRÓTROFOS EN LOS MUESTREOS DE VERANO E INVIERNO...	46
5.2.	IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS EN LA FLORA PRESENTE EN LECHE.....	51
5.3.	EVALUACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA	52
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	54
7.	<u>RESUMEN</u>	56
8.	<u>SUMMARY</u>	58
9.	<u>BIBLOGRAFÍA</u>	60

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro N°	Página
1. Porcentaje de participación de las diferentes categorías de leche en el mercado brasileño	4
2. Estándares de calidad de leche en Nueva Zelanda	6
3. Estándares de calidad de leche en Dinamarca	6
4. Tipos de microorganismos mesófilos aeróbicos de la leche cruda que forman colonias en los medios de Agar para el recuento de la leche	9
5. Incidencia de los principales grupos microbianos en leche cruda con recuentos bajos	9
6. Microorganismos termodúricos y psicrotrofos de la leche	10
7. Influencia de la estabulación y del lavado de los pezones en el recuento bacteriano de la leche (UFC/ml de leche)	13
8. Bacterias productoras de proteinasas termorresistentes	26
9. Bacterias productoras de lipasas termorresistentes	27
10. Conteo promedio de microorganismos mesófilos y psicrotrofos en los muestreos de invierno y verano	51
11. Porcentaje de grupos bacterianos en diferentes puntos del proceso de obtención de la leche en dos épocas del año	52

Figura N°	Página
1. Porcentaje de diferentes géneros de microorganismos mesófilos en invierno y verano	47
2. Porcentaje de microorganismos psicrótrofos en invierno y verano	48
3. Halos de proteólisis (mm) de diferentes géneros en slide de Agar - Caseína	50

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de una mayor participación de nuestros productos lácteos en el comercio exterior, mediante un aumento del valor agregado de los mismos, una mayor diferenciación y una mejora en la eficiencia del proceso industrial, hace relevante incrementar la calidad de la leche producida en los tambos.

Desde hace 20 años, la evaluación de calidad bacteriológica de la leche se realizó por el tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) y por la prueba de lactofiltro que determina el grado de impurezas físicas que puede contener la leche. Estos parámetros fueron confiables para la evaluación de la leche que se remitía en tarros, pero han dejado de tener relevancia por la incorporación del tanque de frío en los establecimientos lecheros. En la actualidad, estos métodos son insatisfactorios para evaluar la calidad de la leche recibida en plantas.

A partir del 22 de febrero de 1995, comenzó una nueva etapa en el país en relación con la calidad de leche, debido al Decreto del Poder Ejecutivo N° 1058 A mediante el cual se crea el "Sistema Nacional de Calidad de Leche". El sistema creado permite calificar el producto de acuerdo con las normas que establece, creando un conjunto de exigencias nuevas para evaluar la calidad de la leche.

De acuerdo al artículo 4 del Decreto, las pruebas de clasificación serán:

- El recuento bacteriano, para evaluar la contaminación microbiana, expresado en colonias por mililitro (UFC/ml).
- El recuento de células somáticas, expresado en células por mililitro, que se relaciona con aspectos de la salud animal, particularmente la presencia de mastitis.

Asimismo el artículo 8 expresa que la leche cruda será objeto de dos tipos de pruebas adicionales:

- Pruebas de aceptación o rechazo (prueba de alcohol, coagulación, propiedades organolépticas, sangre, pus, calostro, etc.).
- Pruebas de adulteración de la leche (aguado, higienizantes e inhibidores).

De esta manera, Uruguay comenzó a utilizar métodos modernos de calificación de leche como en otros países de avanzada en producción lechera.

1.1. EVOLUCIÓN DEL SISTEMA DE PAGO DE LECHE EN URUGUAY.

Las exigencias en cuanto a la calidad higiénica de la leche son cada vez mayores, ya que la tecnología disponible tanto del punto de vista del equipo de ordeño, materiales, como elementos para desinfección, permiten que la leche recibida en planta tenga una menor carga bacteriana. Una buena calidad de leche del punto de vista bacteriológico es esencial para poder obtener productos de excelente calidad. En algunos casos como en las leches ácidas y quesos este aspecto adquiere más relevancia.

Por lo expresado anteriormente, el sistema de pago ha ido variando en forma paulatina teniendo en cuenta la carga bacteriana. En la mayor parte de los países latinoamericanos, se han utilizado las pruebas de lactofiltro y de reductasa (determinación indirecta del número de bacterias por la reducción de azul de metileno). En la mayoría de estos países esa etapa debe darse por concluida y modificar los parámetros, para pago por células somáticas y recuento total de gérmenes. Al haberse alcanzado una mejora sustancial de la leche desde este punto de vista, es necesario incorporar sistemas más sensibles que permitan diferenciar y estimular a aquellos productores de leche de muy buena calidad, fundamentalmente para elaborar productos lácteos confiables, homogéneos y de mayor vida útil.

Las etapas que se han cumplido en el Uruguay respecto a los incentivos por calidad son cronológicamente las siguientes:

- **1963:** Se otorgó un sobreprecio del 15% a todos aquellos establecimientos que tuvieran determinada infraestructura y cumplieran con determinados niveles de sanidad del ganado.
- **1976:** Se inició el pago de la leche considerando dos pruebas: reductasa y lactofiltro, fijándose un sobreprecio del 10% como máximo que continuó vigente hasta el 1° de febrero de 1997. En este período, se realizaban un mínimo de cinco determinaciones de reductasa y dos de lactofiltro por mes. La aplicación de este sistema mejoró sensiblemente la calidad de la leche.

- **1993:** Se iniciaron los estudios para modificar los parámetros, sustituyendo las pruebas de reductasa y lactofiltro, por recuento total y células somáticas.

En la etapa en que se encontraba la lechería en el Uruguay, era trascendente hacer este cambio ya que en ese entonces, la mayor parte de los productores habían accedido a la primera categoría por el sistema vigente. Era necesario considerar el conteo bacteriano directo y las células somáticas, de manera de diferenciar a aquellos productores que producían excelente leche de aquellos de calidad relativamente aceptable, que durante 20 años, por el tipo de pruebas realizadas, estuvieron dentro de la misma categoría. Los cambios en este período se produjeron entre los años 1995 y 1997:

- **1995:** Decreto del Poder Ejecutivo N° 21/995, fijando una normativa genérica para el establecimiento de un Sistema Nacional de Calidad de Leche. En dicho Decreto, se estableció que durante un año la información con los nuevos parámetros para el pago se divulgara a los productores y se evaluara.
- **1996:** Conaprole instaló un laboratorio centralizado que fue habilitado por la Dirección de Laboratorios del MGAP.
- **1997:** En el transcurso del primer trimestre de este año, se empezó a pagar la leche por recuento total y células somáticas.

1.2. SITUACIÓN ACTUAL EN LA REGIÓN.

1.2.1. Brasil.

A los efectos de la clasificación de la leche para la comercialización, existen en Brasil tres categorías:

- **Leche A:** Producida, pasteurizada y embalada en el propio establecimiento. Presenta un alto grado de calidad y representa la integración vertical de la producción.
- **Leche B:** Leche integral con criterios básicos de parámetros de calidad.
- **Leche C:** Leche comercializada con 3% de grasa y baja exigencia de calidad.

En el Cuadro 1 se puede ver la participación de cada una de estas categorías de leche en el mercado brasileño.

Cuadro 1. Porcentaje de participación de las diferentes categorías de leche en el mercado brasileño.

Tipo de Leche	% de participación en el mercado
A	0,3%
B	4,5%
C	94,2%

La leche tipo "A" proviene de un establecimiento lechero con vacas identificadas y fichadas. La leche debe ser sometida a pasteurización inmediata en el tambo, envasada con envoltorio inviolable y distribuida al consumo en las siguientes 12 horas. La contaminación bacteriana total debe ser inferior a 10.000 UFC/ml antes de pasteurizada y 500 UFC/ml después de la misma. Los microorganismos coliformes deben estar ausentes, y los termófilos y psicrófilos no pueden representar más del 10% de los mesófilos.

La leche tipo "B" posteriormente al ordeño, debe llegar a la planta procesadora en un plazo de 9 horas para su rápida pasteurización. La contaminación bacteriana total debe ser inferior a 500.000 UFC/ml antes de la pasteurización e inferior a 150.000 UFC/ml luego de ésta. Existe una tolerancia de coliformes de 0,2/ml. La leche debe ser transportada a la planta a una temperatura inferior a 5°C y mantenida a esta temperatura hasta la pasteurización.

La leche para consumo (tipos A, B y C) debe ser pasteurizada en establecimientos reglamentados. El comercio de leche cruda solo puede existir mediante autorización en las áreas donde no hay oferta y no se dispone de una planta. En este caso, debe provenir de un establecimiento lechero instalado (leche equiparable al tipo C) y ser distribuida al consumo en no más de tres horas de finalizado el ordeño.

1.2.2. Argentina.

Hasta 1991 el pago de la leche se realizaba de acuerdo a un decreto que promovía la mejora de la calidad de leche con el pago de bonificaciones. Los parámetros que se medían eran materia grasa, reductasa, lactofiltro y

temperatura. En 1991 el gobierno, en un marco de desregulación, eliminó esta normativa. Las empresas lácteas, siguiendo el modelo de otros países productores de leche, implementaron un sistema de pago diferenciado según la calidad de leche recibida. Los nuevos parámetros considerados eran, además de la bonificación por frío, el pago por proteínas totales, materia grasa, recuento de células somáticas, conteo bacteriano total, ausencia de aguado y de residuos antibióticos. La propuesta fue producir leche con mayor contenido de proteínas, valores límite para la grasa, estado bacteriológico con un mínimo de gérmenes, menor recuento de células somáticas, ausencia de aguado y de sustancias inhibidoras.

Las empresas han desdoblado el sistema de calificación de leche en: 1) frías y 2) refrescadas y calientes. Para las primeras se ha incorporado el recuento bacteriano, mientras que para las segundas se sigue utilizando la prueba de reductasa. Se realizan entre dos y cinco determinaciones mensuales y la metodología utilizada es el recuento en placa, el recuento microscópico directo o el método instrumental. Es importante también mencionar el esfuerzo de los productores para la instalación de equipos de frío. Se estima que en la actualidad cerca de dos tercios de la leche industrializada es enfriada en los tambos y la tendencia continúa en ascenso.

1.3. SITUACIÓN EN OTROS PAÍSES LECHEROS.

1.3.1. Nueva Zelanda.

En Nueva Zelanda no se bonifica por calidad sino que se hacen descuentos según la escala que se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Estándares de calidad de leche en Nueva Zelanda.

Prueba	Frecuencia	Descuento estándar	Mínima
Recuento total	3/mes	Hasta 50.000	0
		50.000 a 100.000	1
		100.000 a 200.000	2
		200.000 a 500.000	3
Termodúricos	1/mes	Hasta 1.500	0
		1.500 a 5.000	1
		5.000 a 15.000	2
		más de 15.000	3
Coliformes	1/mes	Hasta 500	0
		500 a 1.000	1
		más de 1.000	3
Células Somáticas	3/mes	Hasta 400.000	0
		400.000 a 600.000	2
		600.000 a 800.000	3
		800.000 a 1.000.000	4

En la actualidad la mayor parte de los productores se encuentran por debajo de 50.000 UFC/ml y 210.000 células somáticas/ml.

1.3.2. Dinamarca.

En el siguiente cuadro se muestran los estándares de calidad de este país.

Cuadro 3. Estándares de calidad de leche en Dinamarca.

Categoría	Año 1990		Año 1996	
	Recuento Total	Termodúricos	Recuento Total	Células Somáticas
Muy Buena	30.000	1.000	30.000	300.000
Buena	100.000	3.000	100.000	400.000
Regular	300.000	8.000	300.000	750.000
No Satisfactoria	300.000	8.000	300.000	750.000

A principios de la década, el 65% de los productores estaban en la categoría "muy buena" y un 30% en "buena". Actualmente, el promedio de bacterias es de 50.000 UFC/ml y el de células somáticas 250.000/ml. La categoría "buena" es la que define el precio base. Para la categoría superior existe un sobreprecio de 2,5% y para las categorías "regular" y "no satisfactoria" se establece un descuento del 2,5% y 5%, respectivamente. En el caso de que la leche de un productor se clasifique en forma consecutiva en la cuarta categoría, el descuento se incrementa pudiendo llegar hasta un 50% del valor de la leche.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE CRUDA.

La leche es un medio favorable desde el punto de vista físico para la multiplicación de microorganismos y al ser un producto de origen animal, sujeto a una gran variabilidad y diversidad ambiental en el proceso productivo, se puede contaminar con un amplio espectro de microorganismos. En sistemas de producción de leche de alto grado de desarrollo, se refrigera cada día inmediatamente después del ordeño y para ello se utilizan tanques de frío en el tambo. La calidad microbiológica inicial de la leche varía de acuerdo a las fuentes de contaminación microbiana más comunes de la leche como son las provenientes del interior de la ubre, del exterior de la ubre y pezones, y del equipo de ordeño e instalaciones. El tiempo y temperatura de almacenamiento de la leche en el tambo varía ampliamente, por lo que el número y tipo de microorganismos presentes en ella es muy variable previo a su procesamiento.

En los últimos 25 años, en la mayoría de las zonas lecheras, los métodos de obtención de leche, el equipo de ordeño y la forma de almacenamiento en el tambo han mejorado considerablemente. Sin embargo, a veces la calidad microbiológica de la leche cruda obtenida aparentemente bajo buenas condiciones higiénicas y almacenada bajo refrigeración causa problemas en la leche procesada y en productos lácteos debido a los posibles efectos adversos derivados, por una parte, de un prolongado almacenamiento en refrigeración y por otra, de la mastitis. La refrigeración en el tambo enmascara con mucha frecuencia los efectos de prácticas poco higiénicas entre las que se incluyen la inadecuada limpieza y desinfección del equipo de ordeño.

2.1.1. Microflora inicial de la leche cruda.

La cantidad y tipo de microorganismos presentes en la leche recién ordeñada, refleja directamente la contaminación microbiana durante su obtención. El número de microorganismos de la leche cuando ésta abandona el tambo depende de la microflora inicial, de la temperatura a la cual la leche se ha enfriado, de la temperatura a la que se ha almacenado y del tiempo transcurrido hasta la recolección. Cuando la leche se enfría y se mantiene a menos de 4°C se previene la multiplicación de bacterias por un periodo de 24

horas y la microflora es, por lo tanto, similar a la presente originalmente, tras el ordeño.

El recuento total de bacterias puede variar desde valores iniciales elevados, por ejemplo mayores a 100.000 UFC/ml, lo cual refleja faltas graves en la producción higiénica, hasta recuentos menores a 10.000 UFC/ml, que indican alto control de las condiciones higiénicas.

2.1.2. Tipos de microorganismos presentes en la leche cruda.

En el Cuadro 4 y 5 se describen los principales grupos de microorganismos, detectados a partir de aislamientos en recuento en placa a 30-37°C, que componen la microflora de la leche proveniente de diversos tambos.

Cuadro 4. Tipos de microorganismos mesófilos aeróbicos de la leche cruda que forman colonias en los medios de agar para el recuento de la leche.

Micrococcos	Streptococcos	Bacilos Gram + no esporulados	Esporulados	Bacilos Gram -	Miscelánea
<i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Enterococcus</i> (fecales) Grupo N <i>Str. Agalactiae</i> <i>Str. Uberis</i> <i>Str. Dysgalactiae</i>	<i>Microbacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Kurtzia</i>	<i>Bacillus</i> (esporas)	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Aerobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Serratia</i> <i>Alcaligenes</i>	<i>Streptomyces</i> Levaduras Mohos

Cuadro 5. Incidencia de los principales grupos microbianos en leche cruda con recuentos bajos.

Grupo	Incidencia %
Micrococcos	30 - 99
Streptococcos	0 - 50
Bacilos Gram + no esporulados	< 10
Bacilos Gram - (incluidos coliformes)	< 10

Esporas de <i>Bacillus</i>	< 10
Misceláneos (incluidos estreptomicetos)	< 10

Diferentes observadores han reportado que existen amplias variaciones en la incidencia de microorganismos termodúricos y psicrotófos en la leche cruda, algunas pueden ser de carácter regional y estacional, mientras que otras están asociadas a los métodos de limpieza y desinfección del equipo de ordeño.

CUADRO 6. Microorganismos termodúricos y psicrotófos de la leche.

Géneros termodúricos	Géneros psicrotófos
<i>Microbacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>
Esporas de <i>Bacillus</i>	<i>Flavobacterium</i>
Esporas de <i>Clostridium</i>	<i>Aerobacter</i>
<i>Alcaligenes (A. tolerans)</i>	<i>Alcaligenes</i>
	<i>Bacillus</i>
	<i>Arthrobacter</i>

2.1.2.1. La microflora termodúrica.

El Cuadro 6 muestra los géneros que sobreviven a la pasteurización efectuada en el laboratorio. En el caso de *Microbacterium lacticum* y de las esporas bacterianas la supervivencia es normalmente del 100%, mientras que algunas especies del género *Micrococcus* son algo menos termorresistentes y sólo el 1-10% de las cepas de *Alcaligenes tolerans* puede soportar dicho tratamiento. Ciertas especies de estreptococos, de lactobacilos y algunos corineformes son termorresistentes, soportando tratamientos de 60°C durante 20 minutos, pero solo un pequeño porcentaje, probablemente inferior al 1%, puede sobrevivir tras un tratamiento de 63°C durante 30 minutos.

Los *Micrococcus* y *Microbacterium*, a diferencia de las esporas, derivan casi exclusivamente del equipo de ordeño que algunas veces llega a estar tan contaminado de estos microorganismos que el recuento de termodúricos excede a 5×10^4 UFC/ml. La mayoría de los microorganismos termodúricos no

se multiplican con facilidad en la leche cruda ni tampoco a temperatura ambiente, por lo que un elevado recuento de termodúricos de una leche de 24 horas indica de forma contundente que ha existido una gran contaminación procedente del equipo de ordeño y del tambo.

2.1.2.2. La microflora psicrótrofa.

Los psicrótrofos que con mayor frecuencia se encuentran en la leche cruda se detallan en el Cuadro 6. *Pseudomonas* spp. constituyen el 50% de los géneros de bacterias Gram negativas y la especie *P. fluorescens* es la que predomina, aunque también se detectan *P. putida*, *P. fragi* y *P. aeruginosa*. Los géneros *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter* y *Alcaligenes*, junto a los coliformes, comprenden la mayoría del 50% restante de bacterias Gram negativas (Juffs, 1973; citado por Cousins y Bramley, 1981). Algunos de estos psicrótrofos, cuando crecen en leche refrigerada, elaboran lipasas y proteinasas extracelulares termorresistentes cuya actividad es muy variable, como en el caso de las cepas de *P. fluorescens* con actividad lipolítica y caseinolítica. Los psicrótrofos Gram negativos se destruyen durante la pasteurización pero sus enzimas no se desactivan.

Algunos autores señalan diferencias en la población de psicrótrofos en verano e invierno. Swart y Mostert (1989) encontraron en promedio $2 \cdot 10^5$ UFC/ml en verano y $1,7 \cdot 10^5$ UFC/ml en invierno. Los psicrótrofos, expresados como una proporción de la población total, variaron de 63% en verano a 69% del total en invierno.

La microflora psicrótrofa que deriva de la superficie de los pezones es muy poco definida pero es probable que entre ella existan esporos, microorganismos corineformes y bacilos Gram negativos. La fuente principal de bacilos psicrótrofos Gram negativos está constituida por la inadecuada limpieza y desinfección del equipo de ordeño. Sin embargo, los psicrótrofos se encuentran en todas partes, por lo tanto el agua, la tierra, las plantas y los mismos animales son fuentes naturales de estos microorganismos (Ingraham et al., 1959; citado por Suhren, G., 1989).

Estos microorganismos pueden hacer que la leche o cualquier producto lácteo se deteriore antes de lo previsto, incluso manteniendo la leche a bajas temperaturas en el tanque pueden crecer desde unas pocas bacterias a más de un millón UFC/ml en 6 días y provocar problemas luego en el producto

almacenado (Craven H., 1998). El problema es que muchos de los tests microbiológicos usados por industrias lácteas en el mundo son muy lentos y detectan con dificultad este tipo de microorganismos. El uso de pruebas rápidas de determinación de psicrótrofos por la industria láctea, garantizará a ésta y al consumidor que el producto elaborado alcanzará el tiempo estimado de duración sin echarse a perder. Actualmente se considera que la leche puede mantenerse fresca por dos semanas si se almacena en frío. Pero si el producto está garantido de no tener psicrótrofos puede alcanzar tres semanas sin echarse a perder (Craven, H., 1998).

2.1.2.3. Microorganismos coliformes.

La incidencia de coliformes y *Escherichia coli* en la leche cruda ha recibido una atención considerable por diversas razones. Por una parte, debido a su asociación a las contaminaciones de origen fecal; por otra, debido a que su crecimiento en leche a temperatura ambiente puede dar lugar a la alteración. La presencia de coliformes en la leche no constituye un indicio de contaminación fecal directa, por lo tanto, no se puede confiar en su determinación para detectar la falta de limpieza de los pezones antes del ordeño. Los coliformes crecen rápidamente en residuos de leche y en equipos de ordeño húmedos, constituyendo las principales fuentes de contaminación de la leche. Algunas de las especies incluidas en los géneros que constituyen el grupo coliforme son bacterias psicrótrofas (Cuadro 6), las cuales representan entre el 10 y el 30% de la microflora aislada a 5-7°C a partir de la leche cruda. La mayoría de estos coliformes pertenecen al género *Aerobacter*.

2.2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA.

2.2.1. Contaminación proveniente de ubre y pezones.

En el espacio de tiempo existente entre dos ordeños, los pezones de las vacas se ensucian con estiércol, barro y restos del material de las camas, tales como paja, viruta o arena. Si no se elimina antes del ordeño todo este material pasará, junto a la gran cantidad de microorganismos que contiene, a la leche. El número y tipo de microorganismos asociados a este material variará de acuerdo con el tipo y cantidad del mismo que están adheridos a los pezones. La leche de las vacas con los pezones sucios de estiércol presentará una carga bacteriana próxima a 100.000 UFC/ml, si no se han limpiado previamente en forma adecuada. Aunque el material que sirve como cama de las vacas estabuladas en invierno pueda estar aparentemente limpio y seco, la carga

microbiana que contiene es muy alta, de 10^9 - 10^{10} UFC/g de material. En verano, cuando las vacas retornan al pasto, disminuye de una forma marcada el nivel de contaminación predominando los termodúricos (Cuadro 7).

CUADRO 7. Influencia de la estabulación y del lavado de los pezones en el recuento bacteriano de la leche (UFC/ml de leche).

Condiciones	Pezones	Total	Psicrótrofos	Coliformes	Microorganismos Termodúricos	Esporas de Bacilos
Cama de arena	Sin lavar	31.700	1.500	43	120	18
	Lavados	15.500	990	61	110	14
Pastando	Sin lavar	4.250	280	19	990	7
	Lavados	3.530	270	26	750	5

Los efectos directos del lavado de los pezones en los recuentos de la leche se estudiaron en animales exentos de enfermedades de la ubre y ordeñados con un equipo esterilizado. En estas condiciones, las medias de los recuentos totales variaron de 7.000 UFC/ml en la leche obtenida de ubres cuyos pezones no se lavaron o se hizo con agua y se dejaron húmedos, a 1.500 UFC/ml en leche de ubres cuyos pezones se rociaron con una solución de hipoclorito y se secaron después con paños (Cousins et al., 1981). La dificultad de controlar tanto las condiciones ambientales como la eficacia del lavado de los pezones quizás sea la razón por la que diversos estudios realizados para mostrar la eficacia de los lavados no ha permitido establecer relaciones claras entre ellos y la carga bacteriana de la leche (Luck, 1972; citado por Cousins y Bramley, 1981). En verano, cuando los animales salen a las praderas, la omisión del lavado de los pezones tiene poco efecto en la carga microbiana total de la leche que por otra parte, es mucho más baja que en invierno (Cuadro 7).

2.2.1.1. Tipo de microorganismos procedentes de los pezones.

En invierno, cuando las vacas están estabuladas, la carga bacteriana se sitúa entre 10^5 y 10^7 UFC /pezón. Los micrococcos y *Staphylococcus coagulasa* negativos son los grupos predominantes. Se encuentran también en grandes proporciones los *Streptococcus*, sobre todo los de tipo fecal, pero las bacterias Gram negativas, incluidas las coliformes, son mucho menos numerosas (Thomas et al., 1971; citado por Mottar, 1989). Los psicrótrofos, estimados por incubación de las placas a 5°C durante 10 días, varían de 10^3 UFC/pezón, en pezones lavados de las vacas que están pastando, a 10^6 UFC/pezón en los pezones sin lavar de vacas estabuladas (Cousins et al., 1981). La flora psicrótrofa de la superficie de los pezones está constituida por un grupo de microorganismos escasamente definido; comprende corineformes y bacilos Gram negativos. Los microorganismos termofílicos aerobios de la superficie de los pezones son casi exclusivamente esporas del género *Bacillus*.

Es obvio que la superficie de los pezones constituye también una fuente de esporas de clostridios. Su tasa es mucho más baja en leche cuando los animales están pastando que aquellos que están estabulados. Derivan principalmente del alimento ensilado de pobre calidad y pueden difundirse mediante las heces a la superficie de los pezones de las vacas que lo consumen y de aquí pasar a la leche (Bergère, 1979; citado por Cousins y Bramley, 1981).

Las medidas fundamentales para minimizar la contaminación bacteriana de la leche procedente de los pezones son: prevenir el contacto de los pezones con suelos muy contaminados entre ordeñes, practicar el lavado y el secado de los pezones antes del ordeño. El número y tipo de bacterias en la piel del pezón guarda relación directa con la incidencia y tipos de infecciones intramamarias que se establecen en la glándula. Consecuentemente, las prácticas que tiendan a reducir la exposición del pezón a los organismos patógenos, disminuirán sustancialmente las nuevas infecciones. Dentro de estas prácticas, la desinfección de pezones post-ordeño con un agente germicida aplicado individualmente, es la medida higiénica más efectiva para reducir el índice de nuevas infecciones. Este tipo de desinfección elimina los microorganismos presentes en la punta del pezón, impidiendo la colonización del orificio del mismo (Acuña y Calvino, 1998). La aplicación del desinfectante puede hacerse en forma de inmersión del pezón en una solución, o pulverización de la misma sobre la piel del pezón.

La eficacia de la desinfección de los pezones difiere según los tipos de microorganismos presentes, lo cual se debe a diferencias epidemiológicas de los mismos. De acuerdo con sus características de distribución e interacción

con el pezón, los microorganismos se han clasificado en contagiosos y ambientales. Estas características determinan que microorganismos contagiosos como *S. aureus* y *S. agalactiae*, disminuyan marcadamente en la piel del pezón tras la aplicación del antiséptico, fundamentalmente en vacas en pastoreo. Sin embargo, la incidencia de nuevas infecciones a causa de microorganismos ambientales, que toman contacto con la piel del pezón cuando el poder germicida disminuye es poco influenciada por esta práctica (Acuña y Calvino, 1998).

2.2.2. Contaminación proveniente del ambiente.

2.2.2.1. Contaminación procedente del aire.

El aire no constituye una fuente importante de contaminación bacteriana de la leche aunque pueden llegar hasta ésta mediante el aire que ingresa a las máquinas de ordeño durante su uso. La proporción de bacterias del aire en los tambos, raramente excede a 200 UFC/litro de aire y habitualmente es mucho más baja. Los micrococcos constituyen más del 50% de la flora del aire aunque también existen corineformes, esporas de *Bacillus* y pequeñas proporciones de *Streptococcus* y bacilos Gram negativos. Los cálculos realizados basándose en los niveles de contaminación del aire y el volumen de éste que ingresa a la máquina de ordeño indican que el número de bacterias procedentes de esta fuente es normalmente inferior a 5 UFC/ml de leche (Benham et al. 1970; citados por Cousins y Bramley, 1981). Estos niveles de contaminación son despreciables en relación con la derivada de la superficie de los pezones.

Por otra parte, la alimentación en el tambo suele ser portadora de importante cantidad de bacterias, más aún cuando se trata de concentrados finamente molidos. La incidencia de este factor ha sido estudiada alimentando animales durante y después del ordeño, resultando la leche más contaminada cuando fueron alimentados durante el ordeño. La leche proveniente de vacas alimentadas con ensilaje tuvo mayor contaminación bacteriana y un mayor nivel de psicrótrofos. El número de bacterias butíricas varió de 1.300 UFC/ml a 70.000 UFC/ml para vacas con dietas sin y con ensilaje, respectivamente (Vujicic y Vulic, 1989).

En cuanto a alimentos groseros, los heno aportan sobre todo gérmenes esporulados: bacilos y clostridios. Los ensilados aportan bacterias butíricas

perjudiciales para la transformación en quesos. Los excrementos son ricos en gérmenes variados, y constituyen la principal fuente de enterobacterias nocivas, principalmente en condiciones de estabulación.

2.2.2.2. Contaminación por agua.

El agua que se utiliza en establecimientos lecheros debe ser bacteriológicamente potable. Muchos productores confían en el agua sin tratar proveniente de pozos, lagos, ríos, etc. Algunos pueden estar contaminados con microorganismos de origen fecal, por ejemplo coliformes, estreptococos fecales y clostridios. Además pueden existir en ellos una amplia variedad de microorganismos saprófitos procedentes del suelo o de la vegetación, entre los que cabe destacar *Pseudomonas spp.*, coliformes y otros bacilos Gram negativos, esporas de *Bacillus*, etc. (Cousins y Bramley, 1981). Aún estando el agua libre de contaminación bacteriana, ésta puede proceder de los tanques de almacenamiento del agua que no están protegidos adecuadamente de roedores, pájaros, insectos y polvo.

Algunos investigadores afirman que el agua utilizada diariamente para lavar la máquina de ordeño y el tanque de frío es una de las fuentes más importantes de contaminación de la leche con psicrótrofos. En un estudio realizado en Rusia, se tomaron 18 muestras de agua de industrias lácteas y 26 muestras de agua de diferentes tambos, encontrando elevados niveles de psicrótrofos en todas las muestras, variando desde 28.000 UFC/ml hasta 365.000 UFC/ml, donde la especie más común fue *P. fluorescens* (Yakubchak, 1994).

Si el agua sin tratar llega a la leche o si se usa para el lavado del equipo de ordeño, cualquier microorganismo presente en ella pasará a la leche. La contaminación puede ser insignificante en términos de UFC/ml de leche pero la multiplicación de cierto tipo de bacterias procedentes del agua en cualquier residuo acuoso del equipo de ordeño dará lugar a una contaminación más grave, lo que puede conducir al desarrollo de microorganismos no deseables en el equipo de ordeño, tales como bacterias psicrótrofas Gram negativas (Von Bockelmann, 1981; citado por Suhren, 1989).

Por estas razones, en los países que se sabe que el agua que llega al tambo es de una calidad bacteriológica deficiente, la desinfección química del equipo de ordeño se efectúa siempre inmediatamente antes del ordeño y la solución desinfectante se vierte antes del comienzo del ordeño. Esta medida previene la recontaminación derivada del agua de lavado con agua sin tratar.

2.2.2.3. Contaminación proveniente de la tierra.

La microflora del suelo probablemente es el reservorio de donde sale la mayoría de los psicrótrofos encontrados en agua contaminada (Thomas, 1966; citado por Suhren, G., 1989). Los corineformes constituyen el 60% de los aislamientos provenientes de muestras de suelo. También se ha reportado la presencia de *Achromobacter*, *Pseudomonas* y flavobacterias.

2.2.2.4. Contaminación de la vegetación.

En diferentes fuentes alimenticias vegetales como el pasto, heno y granos se ha encontrado una población promedio de psicrótrofos de entre 5×10^5 y 2×10^8 UFC/g (Thomas 1966; citado por Suhren, 1989). El conteo de esporas de psicrótrofos fue mayor en la tierra que en el pasto (McKinnon, et al., 1983; citado por Suhren, G., 1989).

2.2.3. Contaminación proveniente del equipo de ordeño.

El origen más importante de las bacterias de la leche después de que ha abandonado la ubre y hasta el momento de su recogida está constituido por las paredes del equipo de ordeño que contactan con la leche si éste ha sido desinfectado de una forma inadecuada.

Las vacas se ordeñan normalmente, dos veces al día y las máquinas ordeñadoras se limpian después de cada ordeño. Debido a su complejidad, la limpieza y en particular la desinfección de las mismas puede que no siempre sea perfecta por lo que los residuos de leche y las bacterias asociadas a ellos no se eliminan totalmente del equipo, tendiendo a acumularse diariamente. Excepto cuando el clima es muy frío, las bacterias que han permanecido en el equipo se multiplican entre ordeños, incrementándose sus tasas rápidamente antes que se hagan visibles los residuos. Por ello, la contaminación bacteriana no puede detectarse mediante una simple inspección visual.

Evidentemente, cuando el equipo de ordeño es el principal responsable de altos recuentos, por ejemplo mayores a 50.000 UFC/ml de leche, la limpieza y desinfección del mismo han sido desarrollados en forma defectuosa. Por otra parte, rara vez el equipo de ordeño está contaminado de manera uniforme; las bacterias y residuos lácteos se acumulan en zonas difíciles de limpiar. Partes del equipo como juntas, finales ciegos y empalmes se necesitan desmontar

periódicamente porque no se pueden limpiar bien estando ensamblados. Por el contrario, las superficies lisas de recipientes y tuberías se limpian con facilidad simplemente haciendo circular soluciones a través de la máquina.

Existe una importante variación en la microflora del equipo de ordeño entre tambos, particularmente en los casos en los que la limpieza de estos equipos no es adecuada. Se ha demostrado que esta variación se debe al tipo de detergente y desinfectante utilizado, al método de limpieza, a la temperatura de la solución, al diseño de la máquina de ordeño, a la condición de las piezas de goma y al nivel de contaminación (Druce et al., 1972; citados por Suhren G., 1989).

2.2.3.1. Máquina de ordeño.

El uso de vapor para la esterilización, aunque anteriormente se ha utilizado, no se efectúa más en la actualidad debido a su costo y al tiempo que se necesita para ello, si bien es un método muy eficaz desde el punto de vista bacteriológico. Este método de limpieza fue reemplazado al desarrollarse otros procedimientos razonablemente eficaces, basados en la circulación de soluciones detergente-desinfectantes. Se observó que la calidad bacteriológica de las máquinas limpiadas por circulación era menor que si se usaba la esterilización con vapor, no obstante, de esta forma se lograba el ahorro de trabajo y era más barato que el método de vapor, por lo que rápidamente alcanzó una gran popularidad. Los estudios realizados en la década de 1960 mostraron que el lavado por circulación con soluciones detergente-desinfectantes calientes (temperatura inicial 75-80°C) incrementaba la eficacia y hoy día todavía se recomienda. En el Reino Unido se utiliza también un método alternativo, limpieza con agua hirviendo acidificada (ABW) que se basa solamente en la desinfección por calor (Cousins, 1979; citado por Cousins y Bramley, 1981). Cualquiera de estos dos métodos, si su aplicación es correcta, es adecuado para lograr una limpieza y desinfección aceptables de las máquinas ordeñadoras. Estudios realizados demuestran que algunas máquinas están excesivamente contaminadas, atribuible a defectos de diseños, a una inadecuada disposición de sus piezas o a una utilización de soluciones insuficientemente calientes. La importancia de las piezas de goma en la máquina de ordeño ha sido enfatizada por muchos investigadores. Éstas contribuyen a la contaminación de la leche de 10 a 117 veces más que las partes de metal (Palmer, 1981; citado por Suhren G., 1989). Las bacterias son

protegidas del calor de los procesos esterilizantes en los poros de la goma (Jackson et al., 1965; citado por Suhren G., 1989).

2.2.3.2. Tanque de frío.

La mayoría de los tanques de frío de los tambos son de superficies lisas de acero inoxidable que son más fáciles de limpiar que las máquinas ordeñadoras. Por otra parte, la superficie contaminante del tanque de frío es menor que la de la máquina de ordeño. Los accesorios tales como agitador, llaves de salida, válvulas, pueden causar problemas. En el Reino Unido los tanques de la mayoría de los tambos son de "paredes frías" o preparados para la colocación de bloques de hielo, por lo que no se pueden utilizar soluciones calientes para su limpieza dado que se enfriarían rápidamente al contactar con las paredes del tanque. Estos tipos de tanques se limpian mediante rociados manuales o mecánicos usando soluciones iodóforas frías o por cepillado manual. En Norteamérica y otras áreas, los sistemas de limpieza de los tanques son diferentes de los existentes en el Reino Unido, siendo más habitual la limpieza en caliente. No obstante, existe poca información acerca de las condiciones bacteriológicas de los tanques limpiados con soluciones calientes.

Hasta alrededor de 1970, los recuentos totales de bacterias que se obtenían en el agua de lavado de los tanques, independientemente de si la limpieza era manual o mecánica (automática), eran en término medio inferiores a $2,5 \times 10^6$ UFC/m² y se consideraba que la limpieza mecánica era más eficaz que la manual (Druce et al., 1972; citado por Suhren, G., 1989). Estas observaciones han sido confirmadas por otros trabajos posteriores (Panes, 1979, citado por Cousins y Bramley, 1981).

2.2.3.3. Tipos de microorganismos del equipo de ordeño y tanque de frío.

Los géneros de microorganismos capaces de formar colonias en el recuento total que se han encontrado en las paredes del equipo, concuerdan con los hallados en la leche cruda (Cuadro 4). La temperatura de las soluciones utilizadas para la desinfección y limpieza influye en la microflora modificando su composición, de acuerdo a la resistencia individual. El equipo que se somete a un proceso de limpieza ABW (Agua Ácida Hirviendo) se pasteuriza, por lo que sobreviven los microorganismos termodúricos. La aplicación de soluciones detergente-desinfectantes muy calientes tienen efecto similar. En la práctica, no siempre se llega durante las limpiezas a temperaturas pasteurizantes pero después de un lavado con alta temperatura,

predominan microorganismos termorresistentes tales como *Bacillus spp.*, bacilos Gram positivos no esporulados (probablemente *Microbacterium spp.*), micrococcos y estafilococos. Los bacilos Gram negativos incluidos los coliformes, que son termolábiles, son poco frecuentes. Si la microflora que se recoge en los lavados es fundamentalmente termolábil, es evidente que parte del equipo no se ha calentado lo suficiente, lo que proporciona una buena guía para aplicar medidas correctoras.

Las pezoneras de la ordeñadora con recipientes pequeños para recoger la leche que muestran residuos y costras de leche, presentan con frecuencia un elevado recuento de bacterias termodúricas (Cousins y Bramley, 1981). En estos lugares, las bacterias muchas veces se protegen de las soluciones detergentes utilizadas y esto permite que se multipliquen (Palmer, 1981; citado por Suhren, 1989).

El contenido total de bacterias de los tanques de frío es más bajo que el de las máquinas ordeñadoras e igualmente la proporción de termodúricos (menor a $1 \cdot 10^5$ UFC/m²), ya que éstos no pueden multiplicarse en el ambiente frío del tanque. La proporción de bacilos Gram negativos y de psicrótrofos es, sin embargo, mucho más elevada que en las máquinas de ordeño (Cousins et al., 1981; citado por Suhren G., 1989). A pesar del creciente interés e importancia de la proporción y tipos de psicrótrofos de la leche, es sorprendente la falta de información acerca de la incidencia de este tipo de microorganismos en el equipo de ordeño, del efecto de la desinfección y limpieza en la viabilidad de los mismos en las paredes del equipo que contactan con la leche. Sin embargo, es fácil deducir que cuando la carga bacteriana del equipo es baja, las proporciones de microorganismos psicrótrofos son también bajas.

2.3. INCIDENCIA DEL FRÍO SOBRE LA MICROFLORA DE LA LECHE.

En la mayoría de los tambos, rutinariamente se procede a refrigerar la leche inmediatamente después de su obtención, manteniendo la misma en el tanque de frío. La recogida de la leche puede ser diaria, en días alternos o más raramente a intervalos más largos; se efectúa en vehículos equipados con grandes tanques (cisternas) isoterms que recogen la leche producida en varios tambos. Por ello existe el riesgo de que un defecto no detectado en la leche de algún tambo pueda alterar la totalidad de la carga. A la llegada a su

destino, la leche enfriada en el tambo se transfiere a silos de almacenamiento donde se mantiene hasta su tratamiento térmico y posterior procesado.

2.3.1. Multiplicación de bacterias en leche almacenada.

La temperatura y duración del almacenamiento, la proporción y tipo de bacterias presentes y en menor medida, los sistemas de inhibición naturales de la leche, influyen en la multiplicación de las bacterias que tiene lugar en la leche almacenada. Debido a la amplia variación de la flora inicial y a las condiciones bajo las cuales se almacena la leche, sólo se pueden hacer ciertas generalizaciones acerca de los cambios de la microflora de la leche durante el transporte y almacenamiento.

La temperatura a la que se almacena la leche es uno de los factores más importantes y se constituye en un factor esencial si su almacenamiento va a ser superior a 12 horas. Los microorganismos que deterioran al producto que predominan a 25-30°C son principalmente estreptococos y coliformes. Ambos tipos originan un incremento de la acidez de la leche. Los bacilos Gram negativos y los micrococcos pueden también multiplicarse a menos que la acidez desarrollada alcance un valor inhibitorio para ellos. A bajas temperaturas de almacenamiento, la leche puede presentar un aspecto normal durante 2 o 3 días aunque lo más probable es que se haya producido una multiplicación bacteriana considerable. Algunos investigadores estudiaron el efecto de almacenar leche cruda durante 48 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo la proporción de psicrótrofos del total de bacterias había aumentado de un 47% a un 80%, junto con un aumento de la población de bacterias lipolíticas y proteolíticas. La actividad enzimática fue mayor en leche con dos días de almacenaje en frío que en leche fresca, lo que aumentó el número de ácidos grasos y disminuyó el pH (Celestino, 1996).

En otro estudio se almacenaron durante 48 horas muestras de leche a diferente temperatura: 3-5°C, 7-8°C y 10-12°C. Las muestras almacenadas a 10-12°C fueron las que tuvieron la mayor tasa de multiplicación bacteriana, pero el crecimiento de los psicrótrofos en relación a la población total fue mayor en las muestras almacenadas a 3-5°C (Kuzin et al., 1992). No existe duda alguna que la leche producida con el mínimo de contaminación externa es la que muestra los más bajos incrementos en la tasa bacteriana durante el almacenamiento en un amplio rango de temperaturas. Las propiedades inhibitorias intrínsecas de la leche juegan también cierto papel en este efecto y la multiplicación bacteriana se retrasa, incluso en leche moderadamente

contaminada, durante las 2-3 primeras horas a 30°C y por períodos más largos a temperaturas más bajas.

2.3.2. Almacenamiento refrigerado de la leche cruda.

La refrigeración inhibe el crecimiento microbiano enmascarando los efectos de la obtención de leche en condiciones poco higiénicas; en climas templados, la inadecuada eficiencia de refrigeración conduce a problemas de acidificación. La recogida en días alternos es una práctica muy difundida, de tal forma que cuatro adiciones de leche sucesivas se encuentran en el tanque, por lo tanto, alrededor de un cuarto del total se obtuvo dos días antes de la recogida. Los estudios sobre la recogida en días alternos mostraron que no era perjudicial para la calidad bacteriológica de la leche, siempre que la leche añadida se enfriara rápidamente a menos de 4°C (Thomas et al., 1971; citado por Cousins y Bramley, 1981). El almacenamiento a 5-7°C unido a una gran contaminación por psicrótrofos conduce a un marcado incremento del número total en el momento de la recogida.

Investigadores Australianos estudiaron los tipos y niveles iniciales de psicrótrofos termodúricos capaces de crecer a 3°C y a 12°C. Se recolectó leche cruda de seis localidades durante un año. Estas muestras fueron pasteurizadas para destruir las bacterias termosensibles. Se determinaron los niveles iniciales de psicrótrofos termorresistentes y luego se almacenaron unas muestras durante 8 semanas a 3°C (temperatura ideal de almacenaje) y otras durante 10 días a 12°C, para luego estudiar el crecimiento. El promedio de los microorganismos presentes en leche después de la pasteurización fue de $2,4 \times 10^3$ UFC/ml. De este número, la mayoría creció en condiciones de almacenamiento a 12°C, pero solo una pequeña parte ($5,2 \times 10^2$ UFC/ml) creció cuando se almacenó a 3°C (Cromie, 1994). El conteo inicial puede parecer bajo, pero son capaces de crecer rápidamente durante el almacenamiento, alcanzando altas poblaciones que deterioran la leche.

Bacillus circulans fue la única especie aislada de las muestras almacenadas a 3°C, mientras que *B. circulans* y *B. cereus* se encontraron en las muestras almacenadas a 12°C. Estas especies fueron también las únicas aisladas de productos lácteos comerciales, lo que le da mayor valor a la investigación. *B. cereus* no apareció en las muestras almacenadas a la temperatura correcta (3°C), lo que es importante ya que se trata de una especie que puede hacer echar a perder la leche. La refrigeración retrasa la

germinación de esporas que debe ocurrir para que se de el crecimiento microbiano (Cromie, 1994).

2.3.3. Efectos del transporte y almacenamiento subsiguiente.

Las cisternas que se utilizan para el transporte de la leche son isotermas por lo que la temperatura de los grandes volúmenes de leche en ellas transportados no aumenta de una forma marcada durante el transporte siendo, por lo tanto, dependiente de la temperatura que tenía la leche en los tanques de frío de los tambos al ser recolectada. Muchas partidas de leche llegan a su destino con temperaturas menores a 5°C, pero con frecuencia la leche llega a las plantas con temperaturas comprendidas entre 6 y 9°C. Los recuentos bacterianos de muestras tomadas de las cisternas transportadoras y de los silos de las fábricas mostraron la importancia de mantener la leche a una temperatura tan baja como sea posible, si se quiere minimizar la multiplicación bacteriana en los silos de almacenamiento.

La proporción total de psicrótrofos y coliformes en la leche de las cisternas de transporte al llegar a las plantas de procesamiento es demasiado elevada en comparación con la de la leche procedente de los tanques de frío de los tambos, pero no existe gran diferencia en la proporción de termodúricos (Thomas, 1974; citado por Cousins y Bramley, 1981).

No está claro en qué extensión la contaminación bacteriana de las cisternas de transporte, mangueras, bombas, etc. contribuyen al incremento de la contaminación de la leche que llega a los silos de almacenamiento de las plantas. Debido a los grandes volúmenes de leche, cualquier incremento significativo de la proporción por ml de leche indica una muy elevada contaminación. Si la leche procedente de uno o dos tambos está contaminada, evidentemente influye en la contaminación global de la leche de la cisterna. Si el transporte dura más de 12 horas y si la leche contiene una elevada tasa de psicrótrofos, la multiplicación de los mismos influye poderosamente en la carga microbiana total cuando la temperatura de la leche es superior a 4°C.

Durante el almacenamiento en la planta, la multiplicación de los psicrótrofos contribuirán al contenido total de la leche. Si se añade leche fresca a tanques que ya contenían leche de 24 horas o más y si esta leche se almacena durante un período adicional, los recuentos bacterianos probablemente alcanzarán niveles no deseables más rápidamente que si la leche se hubiera colocado en un tanque limpio y vacío. Si se pretende asegurar

que la calidad bacteriológica de la leche cruda no se deteriore seriamente durante el almacenamiento, la temperatura de la leche debe ser inferior a 5°C. Los tanques de frío de los tambos y sus accesorios, las cisternas transportadoras y los silos de las plantas deben limpiarse y desinfectarse eficazmente una vez vacíos y debe evitarse el almacenamiento prolongado de la leche y abandonar la práctica de rellenar tanques con leche de recolecciones previas.

La leche mantenida durante 2 o 3 días en los silos de las plantas después de su transferencia, posee una microflora que generalmente está dominada por microorganismos psicrótrofos. Existirán esporas de psicrótrofos pertenecientes al género *Bacillus* pero no es probable que germinen y se desarrollen de una forma significativa a la temperatura y durante el tiempo que la leche cruda permanece almacenada antes de su procesamiento. Los géneros y especies de psicrótrofos que predominan pueden variar pero derivan siempre de los presentes originalmente en la leche cruda (Cuadro 6). *Pseudomonas spp.* es el género de psicrótrofos que ha sido descrito con mayor frecuencia en la leche almacenada. Dentro del género, *P. fluorescens* es la especie más común aunque este hecho puede deberse a la facilidad con que esta especie se caracteriza en lugar de su verdadera distribución (Law, 1979; citado por Cousins y Bramley, 1981)

La pasteurización destruye las bacterias psicrótrofas pero no necesariamente desactiva a las enzimas resultantes de su metabolismo. Los experimentos a escala de laboratorio han mostrado que la termorresistencia de las enzimas de estas bacterias pueden afectar adversamente al rendimiento y a la calidad de ciertos productos lácteos.

2.4. EFECTOS DEL ENFRIAMIENTO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE.

2.4.1. Proteinasas y lipasas termoestables.

El enfriamiento y almacenamiento de leche en el tambo es una práctica productiva generalizada. Normalmente se utilizan temperaturas de almacenamiento entre 4 y 6°C. Esta temperatura fluctúa, especialmente cuando entra al tanque leche a temperatura de ordeño o durante el transporte de leche desde el tambo hasta la planta. También ocurre un almacenamiento de casi 24 horas de la leche cruda en la planta, previo a un tratamiento con calor. El almacenamiento en frío evita el deterioro al minimizar el crecimiento de

bacterias acidolácticas y otros patógenos. Sin embargo el almacenamiento y refrigeración de la leche le da la oportunidad de crecer a las bacterias psicrótrofas. Debido a que estas producen enzimas extracelulares, tienen potencial de causar deterioro. Estos microorganismos pueden multiplicarse a temperaturas por debajo de 7°C (Thomas et al., 1974, citados por Mottar, 1989).

El crecimiento de bacterias psicrótrofas en leche no produce de por sí problemas serios de deterioro en la leche. La mayoría son bacilos Gram negativos termolábiles que mueren en la pasteurización. Sin embargo sus enzimas producidas extracelularmente pueden resistir el calor y degradar importantes constituyentes de la leche. Estas enzimas microbianas pueden afectar la calidad de muchos productos lácteos, causando y/o acelerando reacciones físico-químicas de deterioro durante el almacenamiento de leche. La higiene durante el ordeño, la baja temperatura (4°C) durante el almacenamiento, la termización, la inoculación con bacterias acidolácticas son algunos de los métodos recomendados para controlar estos microorganismos (Shah, 1994).

Los grupos de enzimas de mayor importancia económica son las proteinasas y lipasas (incluidas las fosfolipasas) producidas extracelularmente y pueden actuar en la caseína micelar o en los glóbulos de grasa de la leche. Su acción se presenta durante el crecimiento de psicrótrofos en leche cruda, en leche tratada con calor o en los productos lácteos obtenidos. Además de estas enzimas microbianas, la leche también contiene proteinasas y lipasas naturales. La lipasa natural de la leche es inactivada con la pasteurización, mientras que la proteinasa natural es termoestable (Chandan et al., 1964; citado por Mottar, 1989). La ocurrencia de enzimas bacterianas termorresistentes en leche depende de la presencia de microorganismos psicrótrofos en la leche cruda que son los capaces de producirlas. Esto varía dependiendo del tipo y número de microorganismos presentes, las condiciones en que la leche es producida y la longitud del periodo de almacenamiento previo a ser procesada (Cousin, 1982; citado por Mottar, 1989). La leche producida en buenas condiciones sanitarias contiene menos del 10% del total de la flora bacteriana como psicrótrofos, pero leche producida bajo condiciones sanitarias insatisfactorias puede contener más del 75% como psicrótrofos. Las bacterias Gram negativas son las más comúnmente encontradas como deteriorantes en la industria láctea (Richter et al., 1981; citado por Mottar, 1989). De una población inicial de 10^4 /ml (Mabbit, 1981; citado por Mottar, 1989), el conteo de psicrótrofos puede superar 10^6 /ml transcurridos 2 y 3 días a

7 y 5°C, respectivamente. La existencia de almacenamiento mayor a 3 días antes de la pasteurización es común debido a factores económicos y sociales.

La amplia presencia de Gram negativos psicrótrofos sugiere que la incidencia de proteinasas y lipasas termorresistentes en leche es algo común (Cogan, 1977; citado por Mottar, 1989). La cantidad de enzimas presentes en leche depende de varios factores que regulan su producción. Es muy importante el estado fisiológico de la célula. Rowe, 1982 (citado por Mottar, 1989) demostró que la producción extracelular de proteinasas y lipasas se da hacia el final de la fase exponencial de crecimiento o en la fase estacionaria de crecimiento.

2.4.2. Proteinasas.

Las proteinasas son enzimas que actúan en las proteínas causando su ruptura y transformación en péptidos de menor tamaño. Existen diferentes tipos de proteinasas en la leche, algunas originadas por microorganismos y otras transferidas de la sangre a la leche. Son varios los factores que afectan la concentración de estas enzimas como ser la crianza, la nutrición y el estado sanitario del animal (Aslam et al., 1996).

La leche refrigerada disminuye el crecimiento bacteriano, pero las bacterias psicrótrofas (principalmente *P. fluorescens*) que sobreviven al frío pueden producir proteinasas termorresistentes que pueden provocar cambios indeseables en leche y productos lácteos. Estas proteinasas bacterianas afectan principalmente la κ -caseína, mientras que la β -caseína es menos susceptible. La proteólisis afecta el coagulado de leche, la maduración del queso así como también el sabor y textura de varios productos lácteos (Aslam et al., 1996)

Los datos indican que la mayor parte de la leche cruda contiene proteinasas termoestables. Se ha reportado que entre el 70-90% de las muestras de leche cruda obtenidas de un tambo y dos plantas industriales contenían psicrótrofos capaces de producir proteinasas termorresistentes (Adams, 1975; citado por Mottar, 1989). La producción de proteinasas termoestables por parte de bacterias psicrótrofas ha sido reportada por varios autores (Cuadro 8).

CUADRO 8. Bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.

<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Achromobacter spp.</i>
<i>P. putida</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Flavobacterium spp.</i>
<i>P. putrefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>

Existen una gran cantidad de trabajos que muestran la relación entre el número de bacterias Gram negativas en leche y la presencia de enzimas termorresistentes. Los trabajos de Law, 1977 (citado por Mottar, J., 1989) mostraron que *Pseudomonas* y *Acinetobacter spp.* en cantidad aproximada a 10^7 UFC/ml producían suficiente proteinasa para degradar la β -caseína y γ -caseína. Otros investigadores reportaron que la caseína era degradada por especies proteolíticas de *Pseudomonas* y demostraron que, en general, la degradación de κ -caseína era detectable antes que la población bacteriana alcanzara 10^4 UFC/ml (Adams et al., 1976; citado por Mottar, 1989). La β -caseína fue más degradada que α -caseína en la mayoría de los casos. Las dispares opiniones pueden deberse al uso de diferentes métodos de detección, con sensibilidad y tiempos de incubación también distintos para la reacción de la enzima con el sustrato.

2.4.3. Lipasas.

La hidrólisis de los triglicéridos con liberación de ácidos grasos, es el resultado de una acción enzimática que puede aparecer en todos los productos lácteos y es la causa de uno de los grandes defectos: el enranciamiento. Esto se debe a que durante la lipólisis se producen ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácido butírico. Normalmente entran en juego dos clases de lipasas, las que existen de forma natural en la leche y las producidas por determinados microorganismos (psicrótrofos). En la leche la acción de las lipasas naturales se halla limitada por la protección que ofrece la membrana globular. Los tratamientos que la alteran favorecen la lipólisis (homogeneización, agitación, cambios bruscos y repetidos de temperatura) y por lo tanto el enranciamiento. Todas las medidas tomadas para reducir la turbulencia de la leche tibia tienen por consecuencia un retardo en la lipólisis natural, llegando incluso a impedirla. A nivel industrial, es recomendable homogeneizar la leche inmediatamente antes o después de la pasteurización y

evitar mezclar leche homogeneizada con leche fresca, que favorecería la lipólisis.

Muchas bacterias psicrótrofas producen enzimas lipolíticas. Proteinasas y lipasas extracelulares son generalmente producidas por la misma bacteria (Stead, 1986; citado por Mottar, 1989). Las lipasas son extremadamente termorresistentes y por eso es que producen lipólisis en productos lácteos, aún cuando estos fueron tratados con calor. Los psicrótrofos Gram negativos capaces de producir lipasas termorresistentes son listadas en el cuadro 9. Las lipasas microbianas pueden atacar los glóbulos de grasa y causan lipólisis sin ninguna activación previa.

CUADRO 9. Bacterias productoras de lipasas termorresistentes.

<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Achromobacter spp.</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Alcaligenes viscolactis</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
<i>P. putrefacie</i>	<i>Serratia marcescens</i>

Los resultados muestran que aproximadamente un tercio de los aislamientos realizados en leche enfriada son lipolíticos. La lipólisis que ocurre en leche mal almacenada, según Muir, 1978 (citado por Mottar, 1989) se correlaciona con el total de bacterias psicrótrofas antes de comenzar el almacenamiento. Driessen, 1983 (citado por Mottar, 1989) encontró que para la producción de lipasas por parte de bacterias Gram negativas, el conteo bacteriano debía superar los 10^6 UFC/ml. Muchos autores han reportado concentraciones altas de ácidos grasos libres en leche almacenada donde bacterias psicrótrofas estuvieron multiplicándose.

2.4.4. Fosfolipasas.

Varias bacterias psicrotróficas producen fosfolipasas extracelulares. Las más relevantes en la leche son *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus* (Phillips et al., 1981; citado por Mottar, 1989). La mayoría de ellas producen fosfolipasa C, algunas fosfolipasa A y lisofosfolipasas. La mayor parte de las fosfolipasas C producidas por *Pseudomonas* tienen considerable termoestabilidad y no son destruidas por la pasteurización. Las fosfolipasas son potencialmente

importantes en la leche y sus productos, por su habilidad de degradar los fosfolípidos de la membrana globular de la leche.

Chrisope, 1976 (citado por Mottar, J., 1989), demostró que la fosfolipasa C producida por *Pseudomonas fluorescens* mejora la actividad lipolítica. Esto sugiere que las fosfolipasas extracelulares producidas por psicrótrofos, creciendo en leche cruda almacenada tienen potencial de agravar el problema de rancidez. A pesar de esta especulación no se ha demostrado que como mecanismo de degradación sea causa de sabores desagradables en la leche y sus productos. Otros autores citan que las fosfolipasas ayudan de alguna forma a las lipasas a degradar los ácidos grasos. Investigaciones posteriores concordaron con Law, 1979 (citado por Mottar, J., 1989) que plantea que en helados y crema batida el daño de la membrana globular de la grasa puede causar defectos físicos y organolépticos. Las fosfolipasas producidas por *Bacillus cereus* y *B. mycoides* han sido encontrados responsables del sabor amargo en la leche pasteurizada.

2.4.5. Condiciones para la producción y actividad de las proteinasas y lipasas microbianas.

El ambiente afecta la producción de enzimas por parte de las bacterias psicrótrofas, así como también la actividad de éstas (Law, 1979; citado por Mottar, 1989). La temperatura de almacenamiento, el pH y la composición del sustrato son los factores más importantes al respecto. La leche es un excelente medio tanto para el crecimiento de bacterias psicrótrofas, como para la producción extracelular de enzimas (Fox et al., 1983; citado por Mottar, 1989). Los parámetros óptimos para la actividad enzimática son conocidos y reportados por la literatura, pero desde que se sabe que bajas cantidades de enzimas pueden actuar por un tiempo prolongado bajo condiciones subóptimas, los parámetros mínimos para su actividad son de igual o mayor importancia.

2.4.5.1. Temperatura.

De acuerdo con Mc Kellar, 1981 (citado por Mottar, 1989), la producción de proteinasas por *P. Fluorescens* es tan alta a 5 como a 20°C, mientras que Juffs et al., 1968 (citado por Mottar, 1989) encontró un descenso en la producción de proteinasas cuando la temperatura de incubación bajaba de 20 a 5°C. Las proteinasas producidas por *Pseudomonas* son mayormente activadas en rangos de temperaturas entre 37 y 45°C. Stepaniak et al., 1982 (citado por

Mottar, 1989) encontró que algunas proteinasas producidas por *P. fluorescens* mantenían aproximadamente el 30% de la máxima actividad a 7°C y el 16% a 4°C. Las proteinasas producidas son muy estables y luego de tres meses de almacenamiento a temperatura ambiente, se encontró una actividad considerable de proteinasas producidas por *Pseudomonas*.

La temperatura óptima para la actividad de lipasas por bacterias negativas se encontró en el rango 30-40°C. La actividad lipolítica de ciertas enzimas se encontró entre un 27 y 41% de la máxima entre los 20 y 25°C, respectivamente (Adams et al., 1976; citado por Mottar, 1989). Las lipasas parecen ser muy estables a temperatura menor a 8°C. A 20°C se puede mantener el 50% de la actividad inicial luego de tres meses de almacenamiento.

2.4.5.2. pH.

Las proteinasas de *P. fluorescens* y *P. fragi* tuvieron la mayor actividad a pH entre 6,5 y 8 (Adams et al., 1975; citado por Mottar, 1989). Este amplio rango demuestra que estas bacterias producen varios tipos de proteinasas. A pesar de esto, las proteinasas bacterianas tienen un importante actividad al pH normal de la leche. El pH óptimo para la mayoría de las lipasas bacterianas parece encontrarse entre 7 y 9 (Stead, 1986; citado por Mottar, 1989).

La estabilidad en un amplio rango de pH demuestra que las proteinasas y lipasas termorresistentes permanecerán activas por largos períodos en muchos productos lácteos, y esto, asociado a la alta actividad que mantienen aún a bajas temperaturas puede tener serias implicancias para todos los productos lácteos almacenados.

2.4.5.3. Composición del producto.

La composición de un producto determina el aprovechamiento de un sustrato por parte de proteinasas y lipasas. Las proteinasas actúan en los sustratos proteicos de la leche. Las caseínas son fácilmente hidrolizable por proteinasas (Law, 1979; citado por Mottar, 1989). Las lipasas bacterianas actúan en sustratos de triglicéridos emulsionados. Son capaces de hidrolizar triglicéridos de los glóbulos grasos, capacidad que no poseen las lipasas naturales de la leche.

2.4.6. Niveles aceptables de enzimas termoestables en leche cruda.

Es difícil determinar un nivel aceptable de enzimas termoestables tanto en leche cruda, pasteurizada o UHT (Ultra High Temperature) que no cause luego defectos en los productos procesados (Suhren, 1983; citado por Skura, 1989). Parecería que la leche UHT debería contener menos de 0,3 ng/ml de proteinasas termoestables de manera de poder conservarse el tiempo necesario. Establecer un estándar o un límite en la concentración de lipasas y proteinasas en leche requiere mayor investigación en varios puntos, especialmente en determinar los niveles mínimos de actividad de proteinasas y lipasas que puedan afectar la estabilidad de la leche UHT y pasteurizada así como también de otros productos durante su almacenamiento.

2.4.6.1. Relación entre actividad enzimática y conteo bacteriano.

Tradicionalmente el conteo microbiano se ha relacionado con el tiempo potencial de almacenamiento de alimentos hechos con ingredientes crudos. En muchos casos, el conteo microbiano tiene poca relación con la concentración y actividad de enzimas extracelulares y no brinda ninguna indicación de la habilidad de estas enzimas de sobrevivir a procesos como la pasteurización y el UHT. Juffs, 1975 (citado por Skura, 1989) reportó que no hubo relación entre la población de psicrótrofos en leche y los valores de tirosina que fueron usados como una medida de proteólisis en leche. Tampoco se encontraron correlaciones entre la población de psicrótrofos en leche cruda y el contenido de ácidos grasos libres en leche UHT.

Gebre-Egziabher et al., 1985 (citado por Skura, 1989) encontró que el conteo de psicrótrofos proteolíticos tenía un coeficiente de correlación de 0,65 con los valores de TCA-equivalente tirosina soluble en leche cruda. A pesar de esto, se encontraron bajas correlaciones entre esos conteos y la actividad de lipasas en leche cruda. Según Mottar, 1989, el conteo microbiano no es un indicador confiable de la presencia de proteinasas y lipasas en leche, y no da ningún indicio de su actividad si es que están presentes. Tampoco da ninguna indicación de la resistencia al calor que puedan tener las enzimas que produzcan. Christen et al., 1986 (citado por Skura B., 1989) sostienen que se necesitan mejores métodos de medición de la actividad enzimática en leche, desde que se conoce que dicha actividad tiene una relación mucho mayor con el mantenimiento de la calidad de la leche UHT que la población microbiana de la leche cruda.

2.5. EFECTO DE PROTEINASAS Y LIPASAS EN CALIDAD DE PRODUCTOS.

La mayor parte de la leche cruda producida contiene proteinasas y lipasas termorresistentes o bacterias capaces de producirlas (Adams et al., 1975; citado por Mottar, 1989). La presencia de enzimas microbianas termorresistentes en la leche, que permanecerán activas en los productos lácteos luego de un tratamiento con calor (pasteurización), obviamente es de considerable importancia comercial, no solo por el riesgo de su deterioro organoléptico sino por los posibles problemas tecnológicos. Existen reportes que indican que el deterioro de la leche debido a psicrótrofos ocurrió con poblaciones desde $1 \cdot 10^2$ hasta $1 \cdot 10^8$ UFC/ml. Se observaron cambios en el sabor cuando la población fue mayor a 10^8 UFC/ml (Lawrence, 1967; citado por Mottar, 1989). La mayoría de los psicrótrofos causan cambios en el sabor de la leche cuando sus poblaciones superan 1.000.000 UFC/ml. Sin embargo, algunos investigadores encontraron que aún con conteos altos la leche estaba aceptable, indicando que lo importante no es la cantidad de bacterias sino el tipo de bacterias que son capaces de degradar los componentes de la leche. Además del deterioro en el sabor de la leche, la presencia de enzimas bacterianas en la leche cruda traerá problemas tecnológicos para la industria durante el procesamiento y el almacenamiento de productos lácteos.

2.5.1. Proteinasas.

2.5.1.1. *Leche pasteurizada.*

Las proteinasas bacterianas pueden tener actividad a bajas temperaturas, y el pH de la leche está muy cercano al óptimo para la actividad proteolítica. No se han reportado defectos en leche pasteurizada debido a estas enzimas ya que el período de almacenamiento es demasiado corto para que haya cambios en el sabor. Leloup et al., 1980 (citado por Mottar, 1989) encontraron que las proteinasas bacterianas podrían modificar el sabor durante períodos prolongados de almacenamiento de la leche pasteurizada

2.5.1.2. *Leche UHT.*

Mottar et al. (1989) concluyó que la vida útil de la leche UHT estaba principalmente limitada por la acción de proteinasas termorresistentes durante el almacenamiento. Muchos investigadores encontraron relaciones entre la presencia de proteinasas termoestables y la vida útil de la leche UHT y otros productos lácteos. El sabor puede tornarse amargo y finalmente puede gelatinizarse la leche.

Driessen, 1983 (citado por Mottar, 1989) encontró que agregándole un cultivo de enzimas proteolíticas *P. fluorescens* 22F, equivalente a 5×10^5 UFC/ml, hubo un cambio en el gusto de la leche tornándose amarga y finalmente gelatinizando luego de 7 semanas de almacenamiento a 20°C . McKellar et al., 1981 (citado por Mottar, 1989) también encontró proteólisis y gusto amargo en la leche UHT causado por proteinasas producidas por bacterias psicrótrofas. En leches con caseína que había sido severamente degradada por proteinasas, coagularon durante el tratamiento UHT, mostrando así alguno de los problemas tecnológicos que trae aparejada la proteólisis por enzimas termorresistentes (Adams et al., 1976; citado por Mottar, 1989). Para que esto ocurra el conteo bacteriano en leche cruda estuvo aproximadamente en 10^8 UFC/ml, que es un número superior a lo que normalmente se encuentra.

La influencia del tiempo de almacenamiento de la leche cruda en la vida útil de la leche UHT fue investigada por Mottar (1989). Se encontró que para un mínimo de vida útil de la leche UHT de 3 meses a 20°C , el máximo tiempo de almacenamiento de la leche cruda fue de 72 horas a $4-6^\circ\text{C}$ cuando la leche tenía inicialmente menos de 10^5 UFC/ml. Si la leche cruda tenía un nivel bacteriano mayor, el tiempo máximo de almacenamiento de la leche cruda era de 48 horas, ya que tiempos mayores serían suficientes para la producción de proteinasas que limitarían la vida útil de la leche UHT.

2.5.1.3. Quesos.

Las proteinasas bacterianas también pueden ser importantes en la producción de quesos. Algunos investigadores no han encontrado problemas en la producción de quesos de buena calidad (Fairbairn, 1986; citado por Mottar, 1989). Otros encontraron cambios en el sabor y textura atribuidas a un crecimiento de psicrótrofos en la leche destinada a su producción. Numerosos autores mencionan el efecto de las proteinasas en el rendimiento de los quesos debido a una pérdida importante de nitrógeno en el suero. Un bajo rendimiento está generalmente asociado a un prolongado tiempo de almacenamiento de la leche y a una población psicrótrofa elevada. Para la producción de quesos suaves, Feuillant et al., 1976 (citado por Mottar, 1989) obtuvieron que un conteo de psicrótrofos de 10^6 UFC/ml causaba grandes pérdidas de nitrógeno en el suero, aproximadamente el 5%. Contrariamente, Law et al., 1979 (citado por Mottar, 1989) no encontró ninguna influencia en pérdidas de nitrógeno en el suero o en el rendimiento de queso cheddar, inclusive cuando la leche contenía una población de psicrótrofos de 10^7 UFC/ml. Yates et al., 1977 (citado por Mottar, 1989) calculó que el crecimiento de bacterias psicrótrofas en

leche produjo pérdidas de nitrógeno en el suero equivalentes a una reducción de entre 2,75 - 4,70% en la proteína disponible.

Existen algunos ensayos sobre el efecto de proteinasas bacterianas en la calidad del queso durante su almacenamiento. White, 1973 (citado por Mottar, 1989) encontró proteólisis y escaso sabor en queso cheddar hecho con leche incubada con proteinasa de *P. fluorescens* equivalente a 10^5 UFC/ml. Problemas de textura también han sido asociados a proteólisis, pero solamente cuando fueron hechos con leche altamente contaminada. Las lipasas parecen tener mayor efecto en el valor comercial del queso cheddar que las proteinasas.

2.5.1.4. Productos lácteos cultivados.

Existen pocos trabajos que evalúen el efecto de las proteinasas en productos cultivados debido a que estas enzimas tienen su máxima actividad a pH neutro y temperaturas cercanas a 40°C, mientras que los productos cultivados son ácidos y se almacenan a temperaturas menores a 10°C. El sabor de los helados y manteca no fue afectado por proteinasas termorresistentes (White, 1973; citado por Mottar, 1989). Se concluyó que el azúcar y la vainilla que contenían los helados enmascararon el deterioro del sabor, y que el bajo nivel de proteínas (aproximadamente 1%) de la manteca explica el bajo efecto de las proteinasas.

Los yogures pueden tener sabores desagradables cuando son hechos con leche contaminada con psicrótrofos. Se observaron yogures cuajados en esos casos, aunque no fue probado que se debiera a la presencia de proteinasas termorresistentes. Se estudió el desarrollo de bacterias psicrótrofas en muestras de yogur comercial. Los conteos iniciales de psicrótrofos fueron mayores a 10 UFC/g en el 10% de las muestras. Luego de 30 días de almacenadas a 7°C, entre un 20 a 30% de las muestras superaba las 10 UFC/g (Jordano, 1988; citado por Mottar, 1989).

2.5.2. Lipasas.

2.5.2.1. Leche pasteurizada y UHT.

El deterioro de la leche que es sometida a un tratamiento térmico debido a actividad lipolítica ha sido muy estudiado. Defectos causados por lipasas provenientes de psicrótrofos se dan solamente en productos almacenados por

mucho tiempo y en los que la grasa es susceptible. El sabor rancio es causado principalmente por los ácidos grasos de cadenas C4 - C12. Cadenas más largas (C14 - C18) tienen poco efecto en el sabor, sin embargo Deeth, 1983 (citado por Mottar, 1989) demostró que los ácidos grasos de cadenas C10 y C12 eran responsables del sabor amargo y jabonoso (saponáceo) de la leche lipolizada. Desde que los productos lácteos hechos con leche pasteurizada son almacenados a bajas temperaturas, la rancidez producida por este tipo de lipólisis puede darse solamente si son almacenados por un período relativamente largo, por ejemplo varias semanas. Los niveles elevados de ácidos grasos libres en productos hechos con leche pasteurizada son debidos a una actividad residual de las lipasas de la leche.

Las lipasas termoestables han sido relacionadas con cambios en el sabor durante el almacenamiento de la leche UHT. Cuando este tipo de leche contiene 3,5% de grasa y es almacenada a 20°C por más de cuatro meses puede ocurrir una lipólisis importante. Sin embargo, se demostró que las lipasas termoestables fueron de menor importancia que las proteinasas termoestables. Adams, 1981 (citado por Mottar, 1989) detectó lipólisis en leche UHT con niveles de psicrótrofos de 10^4 y 10^5 UFC/ml almacenadas a 25 y 40°C respectivamente. La lipólisis y consecuentemente la rancidez pueden desarrollarse desde 1 a 7 meses luego del tratamiento UHT, dependiendo de la temperatura alcanzada en el proceso UHT y de la temperatura de almacenamiento. Pero puede llegar a ocurrir lipólisis incluso en aquella leche cuya temperatura en el proceso de UHT haya sido mayor a la normal.

2.5.2.2. Crema de leche.

El deterioro de este producto vía lipólisis está dado tanto por su elevado contenido de grasa como también por la preferencia de las lipasas bacterianas por este producto. Thomas, 1970 (citado por Mottar, 1989) encontró que el deterioro del sabor de la crema de leche se debía a una lipólisis producida por lipasas termorresistentes de origen bacteriano. Otros consideran que la crema de leche se deteriora cuando la población de psicrótrofos supera $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. La lipólisis también puede crear problemas tecnológicos en la elaboración de este producto. Se vieron dificultades para lograr crema de leche a partir de leche lipolizada. Se forma demasiada espuma y puede llevar un tiempo cinco veces mayor alcanzar el punto que usando leche no lipolizada.

2.5.2.3. Manteca.

Un nivel elevado de ácidos grasos libres en la manteca es causado por microorganismos lipolíticos (Driessen, 1983; citado por Mottar, 1989). Se debe realizar una diferenciación entre la manteca agria y la manteca dulce. La microflora de estos dos tipos de manteca es muy diferente. El crecimiento de microorganismos depende principalmente de la distribución de la mezcla en la manteca. Si la distribución es buena habrá poco crecimiento, pero si la distribución es inadecuada crecerán mohos y levaduras en las mantecas agrias, y bacterias Gram negativas en las dulces. Las lipasas que liberan ácidos grasos de cadena corta (C4 y C6) causan los mayores efectos en el sabor de la manteca (Deeth, 1973; citado por Mottar, 1989).

La presencia de bacterias lipolíticas en la manteca no es la única causa del enranciamiento. Las lipasas que sobreviven la pasteurización también deterioran la manteca. Se encontró que en aquellas mantecas que contenían actividad lipolítica residual hubo hidrólisis de grasa aun a temperaturas de -10°C en almacenamiento. Según Kishonti, 1970 (citado por Mottar, 1989), las lipasas producidas por *Pseudomonas* migraban principalmente hacia la crema en el proceso de batido. Estimaron que aproximadamente el 80% de las lipasas de *Pseudomonas* se encontraba en la crema y consecuentemente en la manteca. Los microorganismos Gram negativos asociados a lipólisis que produce el enranciamiento de la manteca son *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi* y *A. lipoliticum*.

2.5.2.4. Quesos.

Los ácidos grasos liberados por la lipólisis de la grasa de la leche son muy importantes en el desarrollo de diferentes sabores en los quesos (Mikolajcik, 1979; citado por Mottar, 1989), pero una lipólisis excesiva puede causar sabores desagradables. Estas lipasas se concentran en el cuajo durante la elaboración del queso. Durante el almacenamiento puede ocurrir una lipólisis excesiva que produzca un sabor rancio. La presencia de lipasas termorresistentes producidas por psicrotrofos en la leche cruda pueden causar defectos en el sabor en quesos que requieren un período de maduración de entre 3 y 12 meses a 12 y 14°C. Los quesos que fueron hechos con leche que estuvo almacenada por 48 horas a 3,5°C previo a la pasteurización y elaboración del queso, mostraron defectos organolépticos, así como también un elevado conteo de ácidos grasos libres (Mikolajcik, 1979; citado por Mottar, 1989). Un queso suave hecho con esa leche y almacenado a 5°C se enranció rápidamente debido a la alta concentración de ácidos grasos libres de cadena larga y ácidos grasos volátiles.

Muir, 1984 (citado por Mottar, 1989) definió el nivel de psicrótrofos de 5×10^6 UFC/ml como el límite para el rechazo de leche. A partir de las probables tasas de crecimiento en leche cruda almacenada a 4, 6 y 8°C, determinaron los tiempos máximos de almacenamiento para que los psicrótrofos no alcancen esos niveles. El crecimiento de *P. fluorescens* a $3-5 \times 10^6$ UFC/ml en leche previo a la pasteurización produjo suficientes lipasas termorresistentes para causar enranciamiento en queso cheddar luego de 6-8 meses. Cousins et al., 1977 (citado por Mottar, 1989) considera que si los conteos de psicrótrofos exceden 10^7 UFC/ml, lipasas activas estarán presentes en el queso. Kuzdzal, 1975 (citado por Mottar, 1989) afirma que el nivel de ácido caprónico (C6) es la mejor manera de medir la lipólisis del queso. Los defectos organolépticos aparecieron a partir de los siguientes niveles de ácido caprónico (mg/100g de MS): 8 para Emmental, 14 para Gruyere y 25 para Camembert.

Algunas variedades de quesos mostraron características organolépticas correctas cuando fueron hechas con leche que había sido termizada a 58, 65 y 72°C, luego mantenida durante 96 horas a 5°C para luego ser pasteurizada. En los casos en los que no se realizó termización, el queso mostró problemas de sabor (rancio) y de estructura. La temperatura óptima de termización fue 65°C (Zalazar, et al., 1990).

Además de las consecuencias en el sabor, la lipólisis también trae problemas tecnológicos en la elaboración de los quesos. Se puede retardar o retrasar la acidificación si se usa leche lipolizada debido a que ésta inhibe las bacterias responsables de la acidificación, por ejemplo *Streptococcus lactis* es inhibida por leche lipolizada. También puede bajar el rendimiento del queso.

2.5.2.5. Otros alimentos.

Generalmente el crecimiento bacteriano se detiene a un aw (actividad de agua) menor a 0,9, por lo que un producto como la leche en polvo con aw = 0,6 no debería tener problemas. Sin embargo, puede ocurrir presencia de lipasas bacterianas en leche en polvo. Se encontró lipólisis en leche en polvo luego de 18 meses de almacenamiento (Jensen, 1975; citado por Mottar, 1989). Estas lipasas también actúan cuando la leche en polvo es un ingrediente de otros alimentos como postres, helados, cremas, productos de panadería, etc., incluso a baja temperatura de almacenamiento y baja actividad de agua (aw).

2.6. CONTROL DE ENZIMAS TERMOESTABLES.

Los métodos propuestos para controlar las bacterias psicrotróficas y sus enzimas extracelulares, incluyen:

- 1) Inactivación de las enzimas con baja temperatura (LTI).
- 2) Termización.
- 3) Control o modificación de la atmósfera de almacenamiento de la leche cruda (CMA).
- 4) Uso del antagonismo biológico para detener y/o demorar el crecimiento de los psicrotrofos.
- 5) Activación del sistema lactoperoxidasa en la leche cruda.

Aunque las proteinasas de *Pseudomonas spp.* son marcadamente termoestables a altas temperaturas, aparecen la mayoría de las veces como muy inestables a menores temperaturas y son rápidamente inactivadas entre 50 y 60°C. En un estudio de Vanderzant, 1957 (citado por Skura, 1989), proteinasas producidas por *P. putrefaciens* fueron inactivadas entre 55 y 60°C. A 55°C la pérdida de la actividad de la proteinasa se desvía hacia una desnaturalización por calor. La pérdida de actividad proteolítica fue más rápida en buffer que en la leche y el efecto de este método dejó de estar en ventaja después de una hora a 55°C (Barach et al., 1976; citado por Skura, 1989). A esta temperatura la pérdida de actividad proteolítica se mostró como un proceso de dos etapas, incluyendo cambios de conformación en la proteinasa que indujeron su autólisis y además la agregación de la proteinasa alterada con micelios de caseína a través de interacciones hidrofóbicas. Este fenómeno no fue inducido por temperaturas mayores a 60°C. La mayoría de las proteinasas termoestables fueron inactivadas a 55°C.

En un estudio de 20 proteinasas termoestables el 55% tuvo la máxima inactivación a 55°C, el 35% en temperaturas mayores a 60°C y el restante 10% por debajo de 50°C. Kroll, 1984 (citado por Skura, 1989) recomendó en este estudio que el tratamiento LTI (Inactivación a baja temperatura) debería ser a 55°C, siendo mejor realizarlo antes del proceso UHT que después del mismo. El LTI disminuye el grado de proteólisis y lipólisis en leche UHT, pero no previene necesariamente la gelatinización relacionada al tiempo de elaboración. El precalentado de la leche que contiene proteinasas termoestables previo al LTI, estabiliza las enzimas contra la inactivación a 55°C. Las lipasas parecen ser más resistentes que las proteinasas al LTI 55°C. Fitzgerald et al., 1982 (citado por Skura, 1989) concluyeron que el LTI no sería efectivo contra los problemas que presentan las lipasas en la leche. Se propuso un tratamiento UHT modificado que incluye al convencional seguido de un enfriado de la leche hasta 60°C por 5 minutos, ésto para inactivar las lipasas extracelulares de

Pseudomonas spp. no fluorescentes. La actividad de las lipasas se redujo entre 40 y 50%. Mientras que el tratamiento inverso tuvo poco efecto en la actividad de las lipasas. La actividad de las fosfolipasas de los psicótrofos no fue afectada por el LTI a 55°C. Basado en los datos disponibles, el LTI no parece tener valor comercial para inactivar y controlar las fosfolipasas termoestables de los psicótrofos en la leche.

La termización es un tratamiento con calor moderado seguido inmediatamente por un proceso de enfriado con el propósito de disminuir la actividad de las enzimas producidas por las bacterias psicrotróficas, causando el menor cambio posible en las propiedades químicas y físicas de la leche. Los tratamientos usuales emplean de 62 a 65°C durante 10 a 20 segundos. La termización es por tanto un proceso de sub-pasteurización el cual aumenta el tiempo máximo de almacenaje previo a posteriores procesos (pasteurización, etc.). Este incremento se logra al eliminarse una porción de la microflora de la leche en particular las bacterias psicrotróficas que producen las enzimas problema. El objetivo de la termización es aumentar el tiempo posible de almacenaje antes que la población de psicrotrófos supere 10^6 UFC/ml., a partir de cuando se detectan enzimas extracelulares. La termización de la leche cruda con temperaturas entre 62 y 72°C retardan el arranque de la proteólisis y lipólisis de la leche, mientras que la termización por encima de 62°C con cortos tiempos de detención, no fue efectiva en demorar el arranque de estos procesos. Zall, 1983 (citado por Skura, 1989) proponen el uso de termizaciones (73,9°C durante 10 segundos) de la leche cruda en el tambo, demostrando que se puede almacenar la misma manteniendo buenos niveles de calidad durante 7 días a 3°C.

La termización a 65°C por 15 segundos o a 65.6°C durante 10 segundos permite almacenar la leche por 4 días a 4°C sin crecimiento sustancial de psicótrofos. La termización es exitosa solo si se aplica sobre leche cruda de buena calidad, no debiendo superar su carga inicial de bacterias de 5×10^5 UFC/ml.

El método de CMA ha sido evaluado como medio de prevención de la acumulación de enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por bacterias psicrotróficas en la leche cruda. El CO₂ extiende el tiempo de almacenaje de leche cruda fría, aunque estos trabajos no mencionan cuál es el efecto del CO₂ sobre las enzimas extracelulares.

La atmósfera controlada de N₂ flotante previene la acumulación de proteinasas extracelulares durante el almacenaje de la leche cruda, aunque no

tiene efecto sobre el crecimiento de psicrotrofos proteolíticos (Murray et al., 1983; citado por Skura B., 1989). En leche estéril inoculada con *P. fluorescens* previno la acumulación de proteinasas, mientras que el crecimiento bacteriano fue algo menor que el control aeróbico. (Skura et al., 1989) La interrupción de esta atmósfera controlada y la reexposición de la leche al aire estimula tanto el crecimiento de *P. fluorescens* como la acumulación de proteinasas extracelulares.

El CO₂ está reportado por tener algunos efectos inhibidores sobre lipasas de *Candida cylindracea*, mientras que Ar, N₂ y CO no fueron inhibitorios. El efecto del CO₂ y otros gases sobre proteinasas producidas por psicrotrofos no es conocido, sin embargo es razonable asumir que el N₂ no tiene ningún efecto inhibitorio sobre las proteinasas desde que las lipasas de *C. cylindracea* no fueron afectadas por éste. Si esto es así, probablemente la inhibición de la acumulación de proteinasa extracelular en atmósfera controlada de leche almacenada, no se deba a la inhibición de la actividad proteolítica por la atmósfera de N₂ empleada.

Una fuerte caída en el O₂ disuelto en un medio lácteo simulado, resultó en un temprano arranque de la producción de proteinasas y lipasas por parte de *P. fluorescens* (Rowe, 1983; citado por Skura, 1989). Antes de que esta producción sea detectable, el contenido de O₂ decrece rápidamente. Estos investigadores sugirieron que la tensión de O₂ en la leche puede ser una forma práctica de detectar las enzimas que intervienen en la degradación de la leche. Es importante remover el O₂ temprano en la fase de crecimiento de las bacterias psicrotrofas ya que previene la acumulación de proteinasas, mientras que bajas en el O₂ del medio en la fase tardía del crecimiento algorítmico estimula la producción de proteinasas.

La aereación en medios de cultivo ha sido reportada como estimulante del crecimiento y producción de proteinasas de bacterias psicrotrofas (Stepaniak et al., 1987; citados por Skura B., 1989). Los estudios antes mencionados sugieren que la acumulación de proteinasa puede ser minimizada si la aereación de la leche cruda es mantenida en un mínimo y el O₂ disuelto es limitado. Por otro lado, mantener la leche cruda aereada fue propuesto como forma de suprimir la acumulación de proteinasas y lipasas en la leche. Aunque el O₂ parece ser un factor importante en la acumulación de proteinasas y lipasas en la leche, su rol no está claramente entendido. Concluyendo, la tensión de O₂ ha probado ser útil como método indicador en leche cruda.

4. METODOLOGÍA

La parte experimental de la presente tesis se desarrolló en el departamento de Flores debido a las ventajas operativas encontradas en el mismo para las etapas correspondientes a la preparación de las muestras en el laboratorio, las que se realizaron en la Intendencia Municipal de la ciudad de Trinidad. Asimismo, se recibió apoyo por parte de los técnicos regionales y de los productores en cuyos predios se realizaron los muestreos.

4.1. SELECCIÓN DE LOS TAMBOS.

Para seleccionar los tambos donde se realizaron los muestreos se consideraron los siguientes aspectos:

- 1) Productores que dispusieran de más de 80 vacas en ordeño.
- 2) Tambos que fueran representativos de los diferentes niveles de calidad existente. Para elegirlos se analizaron los registros de recuentos microbianos y células somáticas de los meses previos al inicio del trabajo, de varios establecimientos.
- 3) Por último, se tomaron en cuenta los aspectos operativos tales como las horas en las cuales se realiza el ordeño, los días en los cuales se recolecta la leche por el camión cisterna y la distancia entre los tambos.

Considerando estos criterios, se seleccionaron seis predios lecheros en los cuales se realizaron los muestreos planificados, en dos períodos diferentes.

4.2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.

4.2.1. Períodos de muestreo.

Los muestreos fueron realizados en los meses de junio de 1998 y febrero de 1999 de forma de cubrir dos momentos contrastantes del año en términos climáticos.

En el muestreo realizado en junio, la recolección de muestras en cada uno de los predios fue enviada refrigerada a 4°C directamente al laboratorio de la

Varios métodos como LTI, Termización y Atmósfera controlada en el almacenaje, se muestran como promisorios para controlar los niveles de enzimas extracelulares durante el almacenaje previo al procesado de la leche cruda. Estos métodos deben ser más evaluados, incluso por su económica y técnica factibilidad y seguridad.

Intendencia Municipal de Flores para su procesamiento inicial y posteriormente se trasladaron al laboratorio de Tecnología de los Alimentos en la Facultad de Agronomía. En el mes de febrero, las muestras fueron acondicionadas en recipientes con refrigerantes y se enviaron directamente al laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía, donde fueron procesadas. En todos los casos, las muestras acondicionadas fueron procesadas en un lapso no mayor a 6 horas posteriores a su obtención.

4.2.2. Sitios de muestreo.

Los sitios de muestreo en cada uno de los tambos y los procedimientos implicados en la extracción de las muestras fueron los siguientes:

4.2.1.1. *Muestras de leche.*

Las muestras de leche fueron obtenidas en frascos de 50 c.c. previamente esterilizados (121°C durante 15 minutos), en tres sitios diferentes:

- En primer lugar, se extrajeron muestras de leche de tres vacas elegidas al azar en cada uno de los tambos seleccionados. La leche fue extraída manualmente posteriormente al lavado y a la eliminación de los primeros chorros. De cada animal se obtuvieron aproximadamente 40 ml de leche.
- En segundo lugar, una muestra fue obtenida a la entrada de la leche al tanque frío durante el proceso de ordeño.
- La tercera muestra de leche obtenida correspondía a la almacenada en el tanque de frío.

4.2.1.2. *Muestras de agua.*

Se obtuvieron en un recipiente estéril aproximadamente 100 ml de agua provenientes del tanque de depósito y aquella proveniente de las mangueras utilizadas en la fosa.

4.2.1.3. *Hisopados.*

Las muestras para el análisis de superficies expuestas a contaminación fueron obtenidas en dos sitios:

- Se realizaron hisopados de tres pezoneras elegidas al azar en cada uno de los tambos, cubriendo la superficie aproximada a 1 cm².
- También fue hisopada la pared interior del tanque frío de cada uno de los establecimientos, cubriendo una superficie de 1 cm².

Se utilizó caldo nutritivo estéril para el transporte de los hisopos.

4.2.1.4. Muestras de alimento.

Se tomaron muestras de 100 g cada una, de la ración que se suministraba en el tambo, tanto en los muestreos de invierno como en los de verano y del ensilaje de las vacas, solo en los de invierno. Estas muestras fueron trasladadas en recipientes estériles.

4.2.1.5. Muestras del ambiente.

Para la determinación de la contaminación ambiental del tambo, se colocó una caja de Petri con medio de Agar Malta estéril en la sala de ordeño que fue abierta por un período de 10 minutos.

4.3. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

4.3.1. Aislamientos primarios.

4.3.1.1. Muestras de leche.

Las muestras obtenidas fueron homogeneizadas mediante el uso de un Vortex por un período de 5 minutos en cada caso. Se realizaron diluciones decimales en tubo (10^{-1} a 10^{-5}) utilizando 9 ml de solución salina fisiológica (0.85% cloruro de sodio, p/v). Las muestras preparadas en la forma detallada anteriormente fueron transferidas por duplicado a placas de Petri utilizando el método de siembra en superficie, con distintos medios de cultivo según los objetivos que se detallan a continuación:

- a) Conteo de mesófilos aerobios, sobre Agar Caseína (1%).
- b) Conteo de enterobacterias, sobre Agar Mac Conkey.
- c) Conteo de *Staphylococcus*, sobre Agar Sales Manitol.

Estas muestras sembradas se mantuvieron durante un período de incubación de 48 horas en estufa a 35°C.

- d) Conteo de levaduras y hongos, sobre Agar Malta. Estas últimas incubadas a 27°C durante 7 días.
- e) Conteo de psicrótrofos, solo en Agar Caseína e incubados durante 10 días a 7°C.

Una vez cumplido el período correspondiente de tiempo para cada caso, se procedió al recuento de bacterias viables (UFC/ml).

4.3.1.2. Muestras de agua.

En el caso de las muestras de agua se realizó el cálculo del Número Más Probable (NMP/100 ml), mediante diluciones dobles de caldo Mac Conkey para cuantificar coliformes totales y fecales. La presencia de *Pseudomona aeruginosa* se constató por medio de aislamientos en Agar Cetrimide. Asimismo, se evaluaron contaminantes ambientales como enterobacterias en Agar Mac Conkey, *Staphylococcus* en Agar Sales Manitol y hongos y levaduras en Agar Malta. Estas muestras fueron incubadas de la misma forma que para las muestras de leche.

4.3.1.3. Hisopados.

El procedimiento fue muy similar al empleado con las muestras líquidas, tomando 1 ml del caldo en el cual fue transportado el hisopo, para luego realizar las diluciones decimales y los aislamientos correspondientes en Agar Caseína, Mac Conkey, Agar Sales Manitol y Agar Malta.

4.3.1.4. Alimentos.

La ración y el ensilaje se analizaron utilizando 1 g en 9 ml de solución salina fisiológica (0.85% NaCl) y sus respectivas diluciones para determinar la predominancia de géneros microbianos.

4.3.2. Identificación de cepas bacterianas.

Diferentes pruebas de laboratorio fueron utilizadas para la determinación de géneros bacterianos predominantes. Los géneros fueron agrupados de acuerdo a diferentes pruebas bioquímicas y pruebas complementarias que se detallan a continuación:

- Tinción de Gram
- Oxidasa

- Catalasa
- Oxidación-fermentación (O/F)
- Hidrólisis de gelatina
- Detección de pigmentos en King A y King B
- Crecimiento en Mac Conkey
- Identificación por BBL Crystal para enterobacterias no fermentativas y fermentativas.

4.3.3. Determinación de la actividad proteolítica en Slide.

Se realizó una estimación cuantitativa de la actividad proteolítica de las diferentes cepas por el micrométodo de difusión en Slide (Lawrence y Sanderson 1969). Se midieron los diámetros de los halos de hidrólisis de caseína (20°C por 4 días), obtenidos de los centrifugados y filtrados (0.22micras) de las cepas aisladas.

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1. PRESENCIA DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS Y PSICRÓTROFOS EN LOS MUESTREOS DE VERANO E INVIERNO.

En la Figura 1 se presenta la distribución porcentual de los diferentes géneros bacterianos aislados en los sitios de muestreo analizados en las dos épocas estudiadas. Como se aprecia, el género *Staphylococcus* predomina en ambos casos constituyendo el 19.8% y 22.4% para la época de verano e invierno, respectivamente. Los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* y *Microbacterium*, la especie *Escherichia coli* y las levaduras presentaron contribuciones intermedias y variables según la época del año analizada. Otros géneros como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter* y *Hafnia* presentaron porcentajes bajos. Las variaciones encontradas para los diferentes géneros en las dos épocas del año indican que durante el muestreo de verano se encontraron porcentajes mayores de levaduras, *Microbacterium*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*, respecto a sus correspondientes porcentajes en el muestreo de invierno. Los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus*, y *Escherichia coli* presentaron mayores porcentajes en el invierno, respecto a sus respectivos porcentajes en el verano. Es importante mencionar que durante los meses de verano las especies presentes poseen mayor diversidad, lo cual se manifiesta por los aislamientos que solo fueron detectados en el muestreo realizado en este período (*Aeromonas*, *Citrobacter* y *Hafnia*).

En la Figura 2 se presentan los resultados de la contribución porcentual de microorganismos psicrótrofos durante los muestreos de verano e invierno. Respecto a las especies mesofílicas presentadas en la Figura 1, es notoria la reducción en la presencia de *Staphylococcus* y *Escherichia coli* por la baja resistencia de estos géneros a las temperaturas bajas. Estos cambios registrados corresponden a la selección que se produce durante el mantenimiento de la leche bajo condiciones de frío que favorecen a los microorganismos psicrótrofos. Durante el invierno, el género *Pseudomonas* (31%) predomina claramente en relación con los otros géneros microbianos. Los géneros *Acinetobacter* (17.2%), *Flavobacterium* (13.8%) y las levaduras (13.8%) presentan contribuciones porcentuales intermedias, mientras que *Enterobacter* (3.4%), *Bacillus* (3.4%), *Staphylococcus* (3.4%), *Aeromonas* (6.9%) y *Microbacterium* (6.9%) se presentaron en porcentajes bajos. Durante el muestreo de verano no se presentó una predominancia clara de alguno de los géneros, con contribuciones similares de *Enterobacter* (17.5%),

FIGURA 1. Porcentaje de diferentes géneros de microorganismos mesófilos en invierno y verano

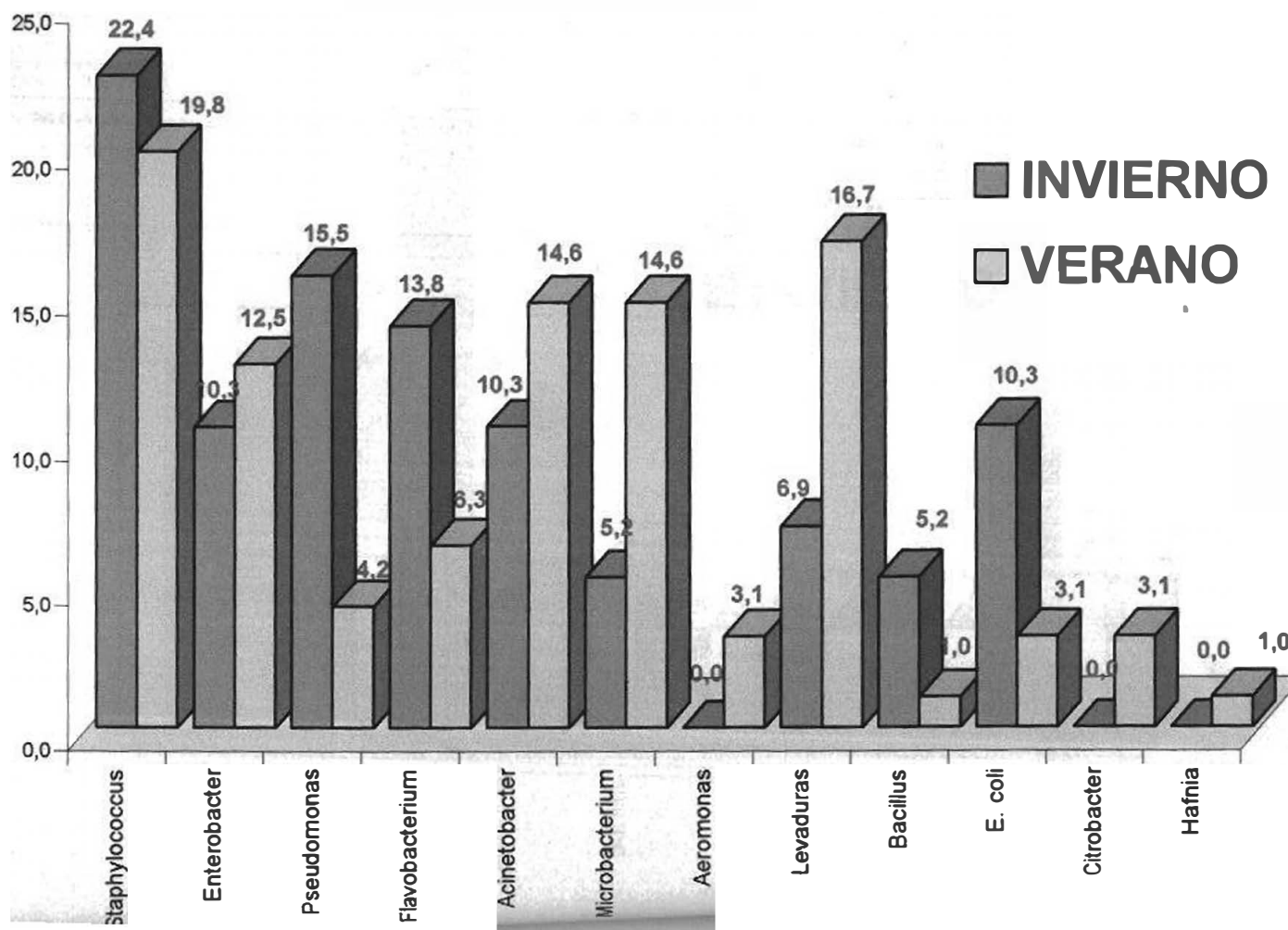
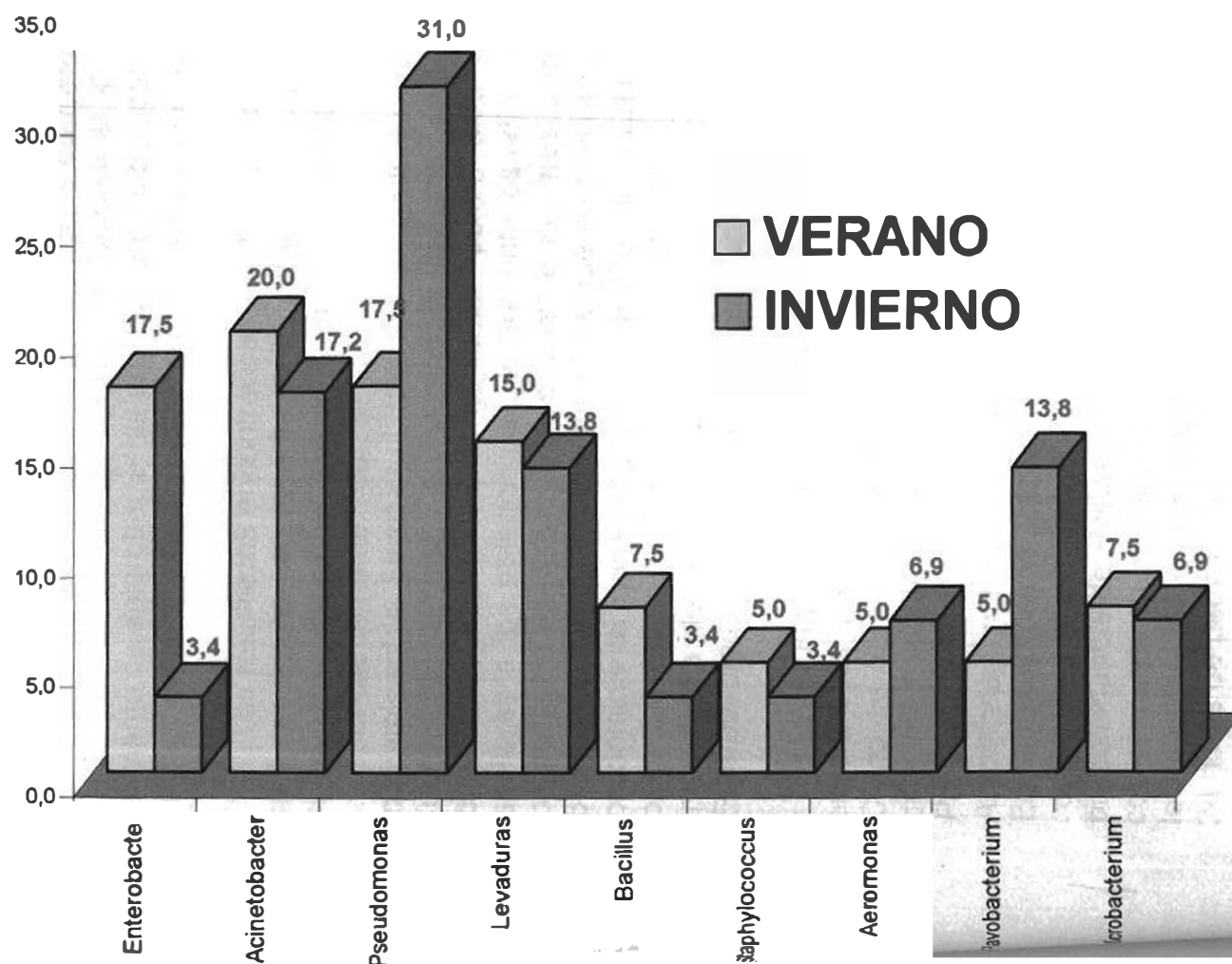


FIGURA 2. Porcentaje de microorganismos psicrótrofos en invierno y verano

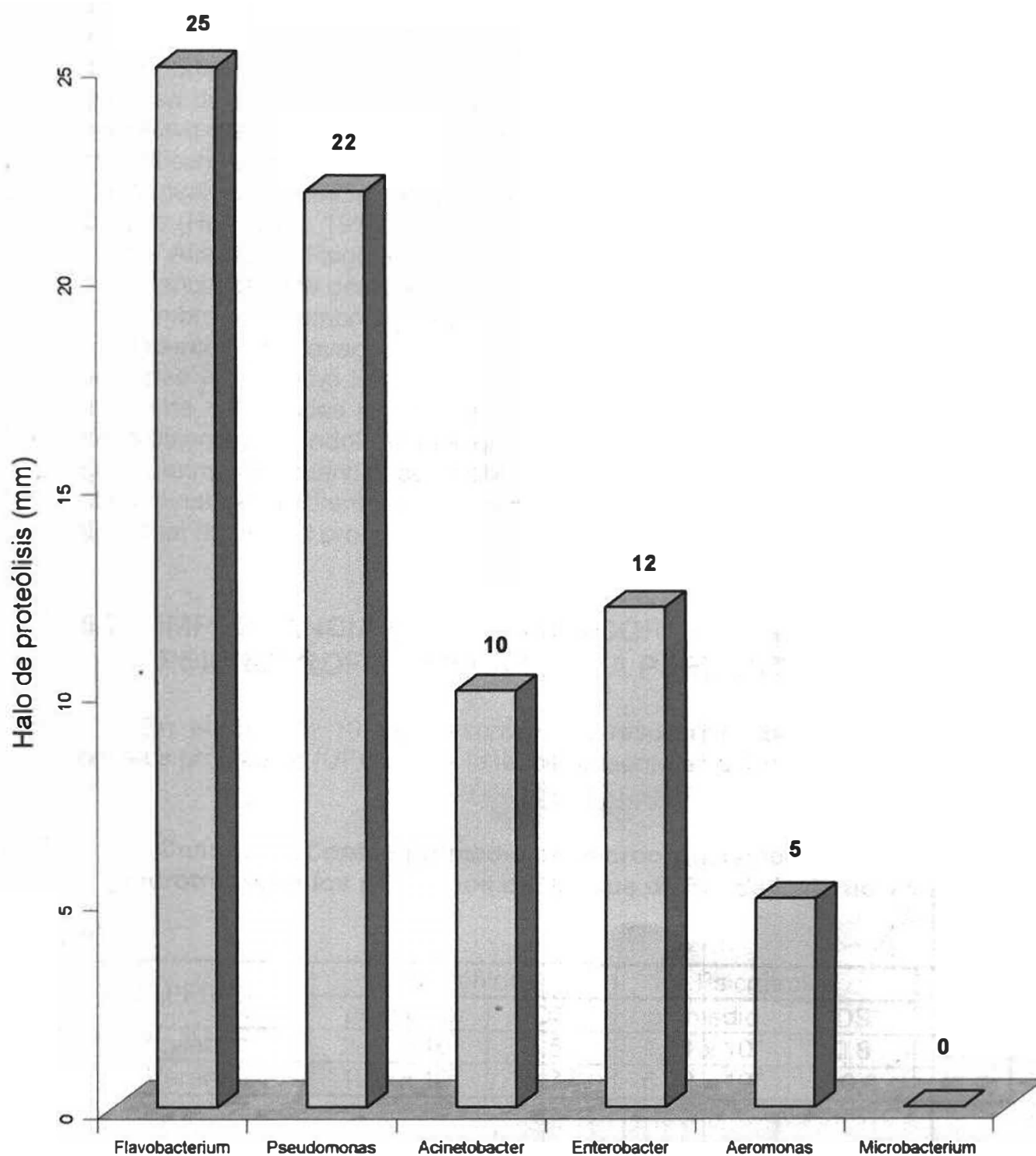


Acinetobacter (20%), *Pseudomonas* (17.5%) y levaduras (15%). Otros géneros como *Bacillus* (7.5%), *Staphylococcus* (5%), *Aeromonas* (5%), *Flavobacterium* (5%) y *Microbacterium* (7.5%) se encontraron en porcentajes bajos. El incremento encontrado en las proporciones de *Enterobacter* en el muestreo de verano coincide con los reportes de Bainotti et al. (1990) que encontraron un aumento de enterobacterias en el verano asociados a las condiciones higiénico-sanitarias de producción y manejo en períodos de alta temperatura ambiental.

Los resultados encontrados en este trabajo indican que la composición de la flora microbiana presente en la leche puede variar a lo largo del año, lo cual tiene consecuencias desde el punto de vista de la calidad del producto, independientemente de la concentración (UFC/ml) de microorganismos contaminantes. Swart et al. (1989) trabajando con muestras de leche cruda que fueron recolectadas en verano e invierno, realizaron determinaciones de conteos totales y microorganismos psicrótrofos que muestran resultados similares a los obtenidos en el presente estudio. Los conteos de psicrótrofos presentaron medias mayores durante los meses de invierno constituyendo el 69.7% del total de la flora, mientras que en el verano se redujo a 63.3%. La flora predominante fueron *Pseudomonas* (30.1%) y *Enterobacteriaceae* (17.9%). Las bacterias Gram positivas predominaron durante el verano, con una marcada importancia de las *micrococcaceae*, mientras que en las Gram negativas las *Enterobacteriaceae* (25.8%) predominaron frente a las *Pseudomonas* (18.2%).

En la Figura 3 se presentan los halos de degradación en Agar Caseína encontrados para bacterias de algunos géneros obtenidos en este estudio. Como se aprecia los halos obtenidos en un período de 24 horas presentan diferentes dimensiones para los géneros *Flavobacterium* (25 mm) y *Pseudomonas* (22 mm), respecto a menores tamaños de halo en *Enterobacter* y *Aeromonas*, mientras que *Microbacterium* no presentó actividad proteolítica. Estos resultados indicarían que los cambios encontrados en el invierno pueden conducir a una mayor probabilidad de deterioro de la leche por la predominancia de *Pseudomonas* y *Flavobacterium* en este período, en relación con el muestreo de verano. Es importante señalar que todas las muestras de leche obtenidas en los muestreos realizados en este trabajo tenían menos de 24 horas de permanencia en el tanque de frío, lo cual indicaría que en períodos mayores estas especies pueden incrementar su porcentaje por las condiciones de crecimiento a las temperaturas del tanque de frío. Las especies encontradas en el invierno indican una mayor capacidad potencial de deterioro de la leche como lo muestran los resultados presentados en la Figura 3 para el grado de proteólisis, así como la potencialidad del género *Pseudomonas* por su actividad lipolítica reportada en la literatura (Deeth y Fitz-Gerald, 1983).

FIGURA 3. Halos de proteólisis (mm) de diferentes géneros en slide de Agar-Caseína.



La proporción del género *Microbacterium* durante el invierno y verano es baja, y su capacidad de deterioro de la leche puede considerarse como inerte por no tener efectos proteolíticos o lipolíticos sobre la leche cruda. Sin embargo, su importancia radica en sus condiciones de especie termodúrica (resiste el proceso de pasteurización de laboratorio 63°C por 30 minutos) con 100% de sobrevivencia respecto a otras especies termodúricas. Normalmente no se multiplican en forma apreciable en leche cruda, aún a temperatura ambiente, por lo cual su presencia responde a mala higiene de los equipos utilizados en el ordeño (Hull et al., 1992). Trabajos realizados en el laboratorio de Tecnología de los Alimentos (Reginensi et al., datos no publicados) permiten confirmar la importancia de este género en los muestreos de verano, que en algunos meses (noviembre y diciembre) puede aparecer como el género predominante. Los aislamientos de levaduras en verano e invierno presentaron porcentajes similares y si bien no tiene efectos en la alteración de la leche, constituyen un índice de deficiencias higiénico-sanitarias y conduce a la presencia potencial de problemas de índole tecnológico en su posterior transformación industrial, particularmente cuando se elaboran quesos (Saubois et al., 1991). La contaminación ambiental en el manejo de la planta constituye un problema adicional durante el procesamiento de la leche a los diferentes productos.

5.2. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS EN LA FLORA PRESENTE EN LECHE.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados correspondientes a los conteos promedios (UFC/ml) de la leche presente en el tanque frío.

Cuadro 10. Conteo promedio de microorganismos mesófilos y psicrótrofos en los muestreos del tanque de frío de invierno y verano.

PERIODO	Mesófilos		Psicrótrofos		%
	promedio	DS	promedio	DS	
Invierno	2.07×10^5	1.55	1.11×10^5	0.8	54.6
Verano	1.54×10^5	2.77	6.22×10^4	10.8	42.7

Los menores conteos registrados en los meses de verano, probablemente estén asociados a la necesidad de los productores de una continua mejora de la calidad para la obtención de mejores precios. Estos menores conteos no son coincidentes con los obtenidos por Garat et al. (1989) en tambos de la

República Argentina en la cual se encontraron promedios menores en los meses de invierno. En nuestro país las exigencias crecientes en calidad han sido notorias en los últimos 3 años y algunos de los tambos muestreados presentaron las mejoras mencionadas. La presencia porcentual de psicrótrofos en la leche fue de 54.6% en invierno y 42.7% en el verano. Si bien esta tendencia puede ser considerada dentro del marco de la mejora de la calidad de la leche, los resultados presentados anteriormente en relación a los géneros bacterianos presentes es de esperar que los porcentajes de psicrótrofos sean superiores en los meses de invierno. Resultados previos obtenidos en el laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Agronomía indican porcentajes superiores al 70% de la flora psicrótrofa en los meses de invierno (Reginensi et al., datos no publicados). Como se mencionó anteriormente, debe considerarse que las muestras de leche obtenidas disponían de menos de 24 horas de frío en los tambos muestreados.

5.3. EVALUACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA.

En el Cuadro 11 se presentan los resultados correspondientes a las diferentes fuentes de contaminación bacteriana, considerando los porcentajes de psicrótrofos, *Staphylococcus* y enterobacterias en las dos épocas del año en que se realizaron los muestreos:

Cuadro 11. Porcentaje de grupos bacterianos en diferentes puntos del proceso de obtención de la leche en dos épocas del año.

Fuente	Psicrótrofos	<i>Staphylococcus</i>	Enterobacterias
Leche directa de la ubre			
Invierno	5.3	73.2	21.5
Verano	2.0	59.8	38.2
Leche recibida en tanque			
Invierno	21.5	54.8	23.7
Verano	18.0	42.3	39.6
Agua general			
Invierno	1.3	29.9	68.8
Verano	0.9	25.6	73.5
Hisopado de tanque			
Invierno	44.9	34	21.1
Verano	33.8	9.7	56.4

La información que se presenta en el Cuadro 11 muestra en forma clara las fuentes de contaminación de psicrótrofos. La leche obtenida directamente de la ubre mediante ordeño manual y el agua utilizada en el tambo son fuentes de menor importancia para este grupo bacteriano, siendo la fuente principal los depósitos de tanque frío y el equipo de ordeño cuyos porcentajes alcanzan niveles de 44.9% y 33.8% en invierno y verano, respectivamente. Los aislamientos realizados en el total de psicrótrofos obtenidos mediante hisopados del tanque de frío y las pezoneras, el 56% correspondieron al género *Pseudomonas*, presentando menores proporciones de *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* y *Enterobacter*. En relación con este grupo los porcentajes encontrados tendieron en todos los casos a ser superiores en los meses de invierno. La leche obtenida al llegar al tanque y la contenida fría en el mismo presentó niveles porcentuales de 21.5% en invierno y 18% en verano. Comparando estas cifras con las presentadas en el Cuadro 10, podemos concluir que el proceso de selección que se da por el enfriamiento de la leche más que duplica los porcentajes de este tipo de flora. El grupo correspondiente al género *Staphylococcus* tiene como fuente principal la ubre de la vaca y se relaciona directamente a la presencia de mastitis subclínica en el rodeo. Las enterobacterias tienen como fuente principal la contaminación del agua, aunque no pueden descartarse la proveniente del animal y la higiene del equipo de ordeño.

Otros aspectos considerados en el estudio fue la presencia de hongos y levaduras en el ambiente y en los diferentes puntos del proceso. Hongos y levaduras presentaron niveles importantes en todos los puntos estudiados a excepción de los muestreos realizados en agua. Como se mencionó anteriormente, su importancia no se relaciona en forma directa con el deterioro de la leche cruda sino más bien con sus potenciales efectos sobre el proceso tecnológico que se desarrolla en la planta industrial, particularmente cuando la transformación se asocia a la producción de queso.

Los alimentos aportados al animal, particularmente en forma de silo o ración, constituyen una fuente importante de contaminación. La ración que se brinda al animal en la sala de ordeño tiene por sus características físicas (alimento seco) un alto potencial de riesgo para la contaminación de la leche. Esta potencialidad puede ser manifiesta cuando por condiciones de la construcción de la sala de ordeño se originan corrientes de aire que dispersen el alimento en el ambiente del tambo • cuando los cuidados en el aporte del alimento en los comederos no consideran los riesgos potenciales que implica como fuente de contaminación. En algunos casos, el aporte de la ración en forma húmeda puede resolver los problemas relacionados con la dispersión del alimento en el ambiente del tambo

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten realizar diversas consideraciones que pueden conducir al logro de una mejora en la calidad de la leche desde el punto de vista microbiológico que se manifieste en un menor potencial de deterioro de la leche.

En primera instancia, surge en forma clara la existencia de un cambio sustancial en los géneros predominantes en la flora de la leche en los períodos de invierno y verano, particularmente cuando se considera el deterioro potencial de los microorganismos involucrados en cada uno de estos períodos de estudio. Los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium* presentan un alto potencial de deterioro sobre la proteína de la leche, lo cual tiene efectos importantes en la eficiencia del proceso industrial y en la calidad del producto. Asimismo, *Pseudomonas* es reconocido como un género de alto potencial de actividad lipolítica cuyos efectos también pueden afectar la calidad del producto. Estos elementos junto a los resultados presentados permiten concluir que durante los meses de invierno existe una necesidad de realizar un esfuerzo adicional en el control de las UFC presentes en leche si se quieren evitar efectos deteriorantes sobre el producto, asumiendo que existen conteos similares entre épocas. Adicionalmente y para reafirmar este concepto, existe una tendencia clara a que el número de microorganismos psicrótrofos presente una mayor importancia porcentual en el total de microorganismos presentes durante los muestreos de invierno.

Los resultados de este trabajo así como también los reportados por varios autores citados en la revisión bibliográfica, evidencian que el suministro de alimentos secos y finamente molidos en la sala de ordeño es una importante fuente de contaminación, tanto de microorganismos mesófilos como psicrótrofos. Resulta entonces importante cuestionarse la conveniencia del suministro de este tipo de alimentos en sala, y en caso de que se considere conveniente encontrar alternativas que disminuyan su dispersión en el ambiente como ser, estudiar el diseño de la sala en lo referente a las corrientes de aire, manejar la alternativa del humedecimiento o peletizado de los alimentos, verificar que la ubicación de los depósitos de esos alimentos sea adecuada, etc.

Otro elemento que valdría la pena cuestionarse, es la recolección de leche en días alternos, práctica que está muy difundida por razones económicas (menor costo de fletes). Si bien hay estudios que demuestran que esta práctica no sería perjudicial para la calidad de leche, si ésta es rápidamente enfriada a 4°C, consideramos que ésta no es la realidad a nivel de tambo en nuestro país.

La poca eficiencia de los equipos de enfriamiento en muchos casos, hace que llevar la temperatura de la leche a 4°C sea un proceso lento. Aparte la entrada de leche caliente proveniente de los siguientes ordeñes hace que la temperatura vuelva a subir. Otros estudios (Celestino, 1996) demostraron que al almacenar leche cruda durante 48 horas a 4°C la proporción de psicrótrofos sobre el total de bacterias creció de 47% a 80%, trayendo las consecuencias negativas sobre procesos industriales y productos lácteos mencionadas en este trabajo.

La principal fuente de contaminación bacteriana son los equipos de ordeño y enfriamiento de la leche. La complejidad de la máquina (juntas, codos, finales ciegos, partes de goma, etc.) hace de su limpieza y desinfección una operación imperfecta, por lo cual los residuos de leche y sus bacterias asociadas tienden a acumularse en la misma. Las muestras obtenidas a nivel de la superficie interior del tanque de frío y órganos de ordeño (hisopados), indican que el "biofilm" puede ser uno de los principales focos a atacar. El biofilm no es detectable a simple vista y esto lleva a que su control durante la limpieza sea deficiente principalmente durante los meses de invierno.

Es importante señalar que los sistemas de limpieza de equipos de ordeño a nivel de tambo (productos químicos usados y su frecuencia de uso, temperatura y volúmenes de agua, tiempo de circulación, etc.) ofrecen una amplia variabilidad. La implementación de diferentes sistemas de limpieza sin duda hará que la presencia de un determinado tipo de microflora y su incidencia en el leche varíe de un tambo a otro. Esto demuestra la ausencia a nivel de tambo de información clara de cuál sería el sistema de limpieza ideal, lo que hace que a las plantas procesadoras llegue leche de calidad desuniforme lo que entorpece los procesos industriales. Otro elemento que reafirma la necesidad de profundizar en aspectos de limpieza es la presencia de enterobacterias, *Staphylococcus* y *Microbacterium* cuyos niveles son normalmente mayores en verano y su presencia es consecuencia de una limpieza y desinfección defectuosa. Todos estos elementos parecen conducir a la necesidad de profundizar la investigación en sistemas de limpieza aportándole beneficios al productor y a la industria, ya que mediante una buena limpieza del equipo de ordeño se ataca al principal reservorio de psicrótrofos que se ha encontrado.

7. RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Estudiar los principales géneros involucrados en la contaminación de la leche en dos períodos diferenciados (invierno y verano).
- 2) Evaluar el potencial de deterioro de la leche en relación a la cantidad y proporción de psicrótrofos.
- 3) Identificar los puntos del proceso (desde extracción de la leche hasta su procesamiento) con mayor potencial contaminante.

Los muestreo se realizaron en los meses de junio, 1998 y febrero, 1999 en seis tambos del departamento de Flores los cuales fueron seleccionados en base a su tamaño y a sus niveles de calidad de leche, de manera que fueran representativos. En cada uno de éstos, se tomaron muestras de leche de diferentes partes del equipo de ordeño y tanque de frío, muestras de agua, de alimento (concentrado y ensilaje) y del medio ambiente. A su vez, se realizó un hisopado de la pared interior del tanque de frío y de tres pezoneras elegidas al azar.

La composición de la flora microbiana presente en leche varió a lo largo del año. *Staphylococcus* fue el género predominante tanto en verano como en invierno. Durante el muestro de verano se encontró mayor proporción de levaduras, *Microbacterium*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*, mientras que los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus* y la especie *E. coli*, presentaron mayores proporciones en invierno. En condiciones de frío, prevalecieron los microorganismos psicrótrofos siendo *Pseudomonas* el género predominante en invierno, mientras que en verano no se presentó una predominancia clara de ninguno de los géneros. Nuestros resultados que muestran una mayor proporción de psicrótrofos en invierno (54,6%) que en verano (42,7%), concuerda con los de otros autores.

Los géneros con mayor actividad proteolítica resultaron ser *Flavobacterium* y *Pseudomonas*, lo que indica una mayor probabilidad de deterioro de la leche en el invierno debido a la predominancia de estos géneros. En este sentido es importante cuestionarse la conveniencia de recolectar la leche de los tambos en días alternos.

En cuanto a las fuentes de contaminación, los depósitos de leche en el tanque de frío y la máquina de ordeño resultaron ser la principal fuente de psicrótrofos, por lo que la implementación de un sistema eficiente de limpieza y desinfección tendría un gran impacto tanto en el productor como en la industria.

Por el contrario, el ambiente y la propia vaca resultaron ser la principal fuente de contaminación con mesófilos. El suministro de concentrados en la sala de ordeño también resultó ser una fuente importante tanto de mesófilos como de psicrótrofos, por lo que la conveniencia de esta práctica debe ser profundamente analizada.

8. SUMMARY

The objectives of this work are:

- 1) Identify the main bacterial genus involved in milk contamination in two different seasons (winter and summer).
- 2) Evaluate the potential milk deterioration related to quantity and proportion of psychrotrophes.
- 3) Identify the procedure step (from extraction to final industrialization) with highest contamination potential.

Samples were collected in June, 1998 and February, 1999 in six dairies in Flores state which had been selected according to their sizes and milk quality background in order to get a significant representation. These samples were obtained from milk in different parts of the milking equipment and the bulk tank, from water, food (concentrates and silage) and from environment. Moreover, samples with an hisope were taken from the inside layer of the bulk tank and from three nipple-shield selected at random.

The microbiological composition in milk varied during the year. *Staphylococcus* was the most prevalent both in winter and summer. During summer sampling a higher proportion of yeasts, *Microbacterium*, *Acinetobacter* and *Enterobacter* were founded, while the genus *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus* and *E. coli* were more prevalent during winter. In refrigerated conditions psychrotrophes microorganisms were the most prevalent in winter especially *Pseudomonas*, while during summer not a clear prevalence was identify. Our results showed a higher proportion of psychrotrophes in winter (54,6%) than in summer (42,7%). Their agree with those obtained by other authors.

The genus with higher proteolytic activity were *Flavobacterium* and *Pseudomonas* which indicates a higher probability of deterioration of milk in winter due to the higher prevalence of these organisms. This is why collection in alternate days in winter must be discussed.

Regarding contamination sources, milk depots in bulk tanks and milking machines were the main sources of psychrotrophes; therefore, implementations of efficient cleaning and disinfection systems are essential both for producer and industry.

On the other hand, environment and cows resulted as the main sources for mesophiles. Concentrates in the milking yard resulted as another important

source of mesophiles and psychrotrophes; therefore, real convenience of this practice should be deeply analyzed.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ACUÑA, C.; CALVINHO, L. 1999. Prohibir el paso. Infortambo. 121: 146-150.
2. ASLAM, M.; HURLEY, W. 1996. Proteases in milk. www.ansci.uiuc.edu/
3. BAINOTTI, A, CARRASCO M., SIMONETTA A. 1990. Calidad microbiológica de leche cruda. II. Incidencia de enterobacterias, bacterias coliformes y Staphylococcus aureus. Revista Argentina de Lactología: 3: 15-28.
4. CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. 1996. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. Australian Journal of Dairy Technology. 51 (2): 59-63.
5. COUSINS, C.M.; BRAMLEY, A.J. 1981. Microbiología de la leche cruda. In Microbiología lactológica. Robinson, R.K. Zaragoza, Acribia. pp. 109-150
6. CRAVEN, H. 1998. Keeping milk fresher, longer. www.csiro.gov.au/
7. CROMIE, S. 1994. Spoilage by heat-resistant, cold-tolerant bacteria. www.drdc.aust.com/
8. DEETH, H. C., FITZ-GERALD C. H. 1983. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In: Developments in Dairy Chemistry - Lipids. FOX P: F: (Ed.). Applied Science, London. Pp. 195-239.
9. GARAT, M., FAVALE M., BASILICO J. C., SIMONETTA A., SBODIO O. 1989. Calidad microbiológica de leche cruda. I. Incidencia de bacterias aerobias mesófilas, termodúricas y lácticas. Revista Argentina de Lactología, 2:39-50.
10. HULL, R., TOYNE S, HAYNES I., LEHMANN F. 1992. Thermoduric Bacteria: A re-emerging problem in cheesemaking. Australian J. Dairy Technol., 47:91-94.
11. JORDANO, R. 1988. Incidence and evolution of psychrotrophic bacteria in commercial yoghurt kept in cold storage. Microbiology, Aliments, Nutrition. 6(4):407-409.

12. KUZIN, A.A.; GUDKOV A.V.; SHERGIN N.A. 1992. The influence of the temperature and duration of storage of raw milk on its total bacterial count and the multiplication of psychrotrophic microorganisms. *Molochnaya promyshlennost.* 6: 19-22
13. MOTTAR, J.F. 1989 Effects on the quality of dairy products. *In* Enzymes of psychrotrophs in raw food. McKellar, R. Florida, CRC Press. pp. 227-243.
14. NORBIS, H.M. s.f. Producción de leche higiénica. Paysandú. Facultad de Agronomía. 4 p.
15. SAUBOIS, A., BASILICO J.C., SIMONETTA A. 1991. Calidad Microbiológica de la leche cruda. III. Incidencia de bacterias esporuladas aerobias y anaerobias, levaduras y hongos. *Revista Argentina de Lactología.* 5: 79-90.
16. SHAH, N.P. 1994. Psychrotrophs in milk: a review. 1994. *Milchwissenschaft.* 49 (8): 432-437.
17. SKURA, B.J. 1989. Standards, control, and future outlook. *In* Enzymes of psychrotrophs in raw food McKellar, R. Florida, CRC Press. pp. 245-263.
18. SUHREN, G. 1989. Producer microorganisms. *In* Enzymes of psychrotrophs in raw food. McKellar, R. Florida, CRC Press. pp. 3-34.
19. SWART, G.J.; JOOSTE, P.J.; MOSTERT, J.F. 1989. The occurrence and seasonal distribution of psychrotrophic and certain mesophilic bacterial types in the bulk milk supply of the Pretoria area. *Suid Afrikaanse Tydskrif vir Suiwelkunde.* 21(1): 1-8.
20. URUGUAY. INSTITUTO PLAN AGROPECUARIO. 1997. Seminario regional de calidad de leche. Montevideo. 248p.
21. VUJICIC, I.F.; VULIC, M. 1989. Effect of silage feeding on the microbiological quality of milk. *Zbornik Radova.* 19: 313-317.
22. YAKUBCHAK, O.N. 1994. Contamination of milk with psychrotrophic microorganisms. *Problemy veterinarnoi sanitari i ekologii.* 94: 80-82
23. ZALAZAR, C.A.; MEINARDI, C.A.; CANDIOTI, M.C. 1990. Thermization and refrigeration of milk for cheesemaking. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia.* 41(6): 495-509.