

Ensayos de Clasificación de Leches

ING. AGR. JACOBO DEL'HARPE

CATEDRÁTICO DE BROMATOLOGÍA

La nueva reglamentación sobre higienización de la leche establece las condiciones que debe presentar para poder ser pasteurizada antes de ser librada al consumo. La leche debe soportar sin cortarse la mezcla con cantidad igual de alcohol a 90° y no debe contener más de 1 1/2 millón de bacterias por cc³., en el momento de llegar a la usina.

En este trabajo no nos ocuparemos de como se llegará a producir leche en tales condiciones sino de la forma práctica y eficaz al mismo tiempo de determinar si la leche es o no apta para ser pasteurizada, sin que la técnica de inspección detenga o retarde la marcha de la higienización ni acarree transtornos en el trabajo.

La leche debe pasar lo más rápidamente posible a los pasteurizadores y esta operación debe hacerse sin interrupciones de acuerdo con el rendimiento de las máquinas.

En primer lugar nos ocuparemos de la pureza bacteriana, que es el punto más delicado y técnicamente más complicado; pasemos en revista los métodos de que disponemos para hacer el recuento de bacterias:

I — Método de las placas — Consiste en mezclar 1 cc. de una dilución de leche al 100.000, 200.000, 500.000 o 1.000.000 con un medio nutritivo solidificado. Esta mezcla se coloca en una placa de Petri; las bacterias dan nacimiento a las colonias, las cuales se cuentan después de un plazo no menor de 2 días.

Los medios nutritivos son sea el Extracto de carne Liebig con peptona y sal, sea el suero de leche, ambos solidificados con gelatina o agar agar; cuando se emplea gelatina las placas deben guardarse a temperatura inferior a 20° y las de agar pueden colocarse en estufa hasta 37°. El medio que hemos empleado y nos ha dado resultados muy buenos es compuesto de extracto de carne, 5 gr.; peptona de Witte, 5 gr.; sal, 2 1/2 gr.;

para 1 litro, agregando 100 gr. de gelatina. El método oficial Norte Americano emplea el medio: extracto 0,3 %, peptona 0,5 %, agar desecado al horno 1,2 %. Al hablar de los medios es bueno hacer constar que los cultivos hechos sobre el medio llamado "Bacto Nutrient Agar", empleado en Norte América, en sustitución de los indicados, han dado siempre una cantidad mucho mayor de colonias "cabeza de alfiler". Yates y Glover tras largos ensayos, dicen en el 12.º „Annual Report of the International Association of Dairy au Milk Inspectors": "...Siempre por cultivos sobre Bacto Nutrient Agar, los resultados eran más elevados que por cultivo sobre los antiguos medios de antes de la guerra, y siempre la causa era la formación de colonias "cabeza de alfiler".

El método de las placas con buen medio y técnica correcta dará siempre resultados más seguros que los otros.

II — Métodos de numeración directa. — El principio es contar con ayuda del microscopio los microbios contenidos en una porción de leche extendida sobre un porta-objeto y tratada con un colorante, previo desengrasamiento con el xylol u otro disolvente de la grasa.

Actualmente conocemos dos métodos basados sobre este principio y que difieren únicamente por detalles de la técnica: el de Breeds y el de Skar.

Método de Breeds: Después de agitar enérgicamente la muestra, con una pipeta calibrada para dar exactamente 1/100 de cc. de leche, se vierte esta cantidad sobre un porta-objeto colocado sobre una guía con cuadrados de 1 cm.²; con una aguja se extiende la gota exactamente sobre un cm.² y se seca despacio al abrigo del polvo; la desecación debe durar de 5 a 6 minutos a fin de evitar las rajaduras de la película y la formación de círculos. Se sumerge la preparación en xylol por lo menos durante un minuto, se escurre y se seca; se fija mediante un baño de alcohol a 90º y se colorea con azul de metileno (solución alcohólica saturada 30 cc. en 100 de una solución de potasa al 0,01 %; filtrar). La placa se lava y se descolorea un poco con alcohol.

El examen microscópico se hace con objetivo de inmersión y según los números de éste y del ocular el campo visual abarca una superficie variable que debe determinarse con el porta-objeto micrométrico. Esta superficie representa 1/n ava parte del cm.² de la preparación; multiplicando el número de bacterias encontradas en un campo por el denominador de este que-

brado, se obtiene el número de bacterias en el 1|100 de cc.³, y multiplicando por 100 se sabe cuantos gérmenes habrá en cada cc. de leche. Es conveniente numerar las bacterias en varios campos, 30 a 50, y calcular el promedio.

Método de Skar. — Es el que sirvió de base a Breed para establecer el suyo. Skar emplea un material microscópico especial compuesto de un porta-objeto sobre el cual se ha trazado una superficie de 500 mm.² y un ocular en el cual están delimitados dos cuadrados y un círculo; se emplea objetivo de inmersión 1|12. Con un porta-objeto micrométrico se regula el largo del tubo del microscopio para que el lado del cuadrado grande sea 50 cc.; la superficie representa entonces 0.0025 mm.² o sea 1|400 de mm.², la superficie del cuadrado pequeño y del círculo son, respectivamente, equivalentes a 1|4000 y 1|40 de mm.².

Sobre la superficie del porta-objeto se extiende 1|50 de cc. (20 mm.³) de leche, que se extienden perfectamente siguiendo la misma técnica de fijación, desengrasamiento, coloración, etc., que en el Breeds. Para facilitar esta parte, Skar recomienda colorear la leche antes de medir el 1|50 agregando a 4.8 cm.³ de leche una mezcla de 0.18 cm.³ de azul de metileno (1 1|2 gr. en 100 de alcohol a 95°) y 0.02 cm.³ de solución de potasa al 30 %. Pero para la numeración se debe tener en cuenta que la película se hace con 19,2 mm.³ de leche en vez de 20; este procedimiento da hermosas placas con fondo azul-cielo sobre el cual las bacterias, fuertemente coloreadas, se destacan admirablemente. Skar recomienda numerar en 10 o 50 campos para establecer el promedio; el cálculo se hace siguiendo la misma marcha que en el de Breeds.

Con cualquiera de estos procedimientos un manipulador muy experto y haciendo varias preparaciones a la vez logra practicar el examen de una leche en 5 a 8 minutos.

III — Método mixto de Frost. — Este consiste en numerar al microscopio las colonias nacidas en una pequeña placa de cultivo mantenida durante 4 a 8 horas en la estufa a 37°5.

Sobre un porta-objeto delimitar una superficie de 4 cm.², que se marca con lápiz de cera, esterilizar a la llama, colocar sobre ella, con una pipeta especial, 0.05 cc. de leche, agregar igual cantidad de agar nutritivo estéril calentado a 42° o 43°, mezclar perfectamente y llevar a la estufa.

Para el examen las placas son desecadas a temperatura inferior a 100°, lavadas con una solución de ácido acético glacial

a 10 % en alcohol a 95° y coloreadas con azul de metileno. Previamente a la numeración se determina exactamente la superficie del campo y se calcula el factor que debe multiplicar el número de colonias de un campo para saber las que hayan en los 4 cm.² o sea en 1|20 de cc.³ lo que multiplicado por 20 da el número de colonias en 1 cc.³. Frost recomienda contar por lo menos 5 campos para hacer un promedio.

Este método es en principio una numeración de colonias en placa de agar, pero en tiempo más corto y con microscopio.

IV — Método de la Reductasa o prueba de reducción del azul de metileno. Se basa sobre el hecho que la coloración que se comunica a la leche agregándole azul de metileno, desaparece en un tiempo más o menos largo, y que la rapidez de la decoloración depende casi exclusivamente de la cantidad de bacterias que hay en la leche. Durante la prueba las muestras deben mantenerse constantemente a la temperatura de 37°.

Para esta prueba se necesita un Azul de Metileno bien puro y de fuerza siempre igual, lo que se consigue empleando las tabletas especiales que preparan ciertas fábricas (National Aniline Company, Blauenfeldt y Tvede).

Se disuelve una tableta en 200 cc. de agua esterilizada y se agrega 1 cc. de esta solución a 10 cc. de leche en un tubo de ensayo. Los tubos se colocan al baño-maría a 37° o en una estufa (habiendo sido calentados previamente a 37° en un baño-maría).

Se observan los tubos a intervalos determinados y se comparan con el tubo testigo para apreciar bien la desaparición total del color. Se han hecho muchos ensayos para relacionar el tiempo de decoloración con el número de bacterias (método de las placas) y se ha comprobado que no hay una concordancia que autorice a emplear el método de la reductasa para determinación bacteriana. Además, como se verá por los datos que siguen, este procedimiento requiere también algunas horas.

Se admite la siguiente clasificación de leche:

1 — **Leche buena** no decoloreada en 5 1|2 horas, contiene, por lo general, alrededor de 500.000 bacterias.

2 — **Leche de buena calidad mediana** decoloreada entre 2 y 5 1|2 horas, de 500.000 a 4.000.000 de bacterias.

3 — **Leche mala** decolorada entre 20 minutos y 2 horas. De 4 a 20 millones de bacterias.

4 — Leche muy mala decolorada en menos de 20 minutos. Más de 20 millones de bacterias.

Esta clasificación empleada en ciertas queserías es aún demasiado simple, pudiendo hacerse subdivisiones con decoloración en fracciones de 30 minutos, por ejemplo. Pero con todo la reductasa no es más que un método aproximado, hoy en desuso, para leche de consumo.

Siempre que se quiera sostener que el **examen debe preceder la pasteurización**, tesis que parece ser la que adopta la Dirección de Salubridad, (punto sobre el cual volveremos más adelante), veamos como podemos "analizar" las leches a su llegada a la usina. ¿Podemos emplear el método de cultivo en placas? De ninguna manera; pues solo conoceremos el resultado a los dos días, por lo menos, y además éste nos indica el **número de colonias** nacidas de 1 cc. de leche y no el número de gérmenes. Efectivamente una colonia puede nacer de 1 bacteria como también de 2 o más, y lo que buscamos es saber **cuantas bacterias** hay en la leche. En Norte América admiten que la relación entre las colonias nacidas en la placa y el número de bacterias es de 1 a 2 hasta 1 a 6; por lo general adoptan el promedio de 1 a 4. Esta relación deberá ser determinada para nuestras leches, pues en las que hemos examinado encontramos muy pocas veces bacterias sueltas, sino conglomerados de 8, 10, 50 y hasta innumerables, así como cadenas de streptococcus lacti con numerosos elementos. Pues bien, estos conglomerados y cadenas arrolladas nos darán cada uno, en la placa, una sola colonia; será necesario hacer un recuento exacto de los elementos de estos conglomerados cuando se quiera determinar la riqueza bacteriana; y determinar la relación a colonias para control de la numeración directa. Este control es necesario efectuarlo de cuando en cuando porque dentro de lo relativo de la numeración bacteriana el método de la placa es el más exacto por los motivos siguientes: Se aplica a una cantidad mayor de leche 1 cc. contra 1|100 de cc. Se observa la totalidad de la parte diluida mientras que bajo el microscopio quedan muchos campos inexplorados, aún haciendo el recuento en 50 campos de los que representan la película de 1|100 de cc. (Nótese que el examen de 50 campos ya es mucho para el que tenga que examinar 2 veces por día un gran número de muestras con gran rapidez para no demorar la pasteurización).

Primer punto: Las placas deben ser eliminadas por ser un método lento y no revelar el número de bacterias.

¿Puede emplearse la reductosa? No. Por carecer en absoluto de exactitud y ser también largo, pues las leches buenas demoran varias horas en descolorearse.

Por este mismo motivo debemos rechazar el método de Frost, ya que las plaquitas permanecen, por lo menos, 4 horas en la estufa y también por ser una técnica engorrosa (cuenta con 3 tiempos: 1.º Preparación de la placa con leche y agar; 2.º Cultivo en la estufa; 3.º Desecación, fijación y coloración).

Habiendo eliminado los tres procedimientos anteriores por inconvenientes insalvables, nos quedan únicamente como aceptables los métodos de numeración directa: el Skar y su modificación el Breeds. Forzosamente deberá adoptarse uno u otro apesar de sus inconvenientes: fracción muy pequeña $1/100$ o $1/50$ de cc. que se examina; pequeñas dificultades en la preparación exacta de la superficie de película; muy pequeña superficie (y desde luego cantidad) de leche examinada bajo el microscopio (trabajando según Breeds con un ocular y un objetivo $1/12$ Zeis, 15 y 90 respectivamente, el cm.^2 de película representa 17.214 campos de los cuales solo se examinan 50!!) y, en fin, el inconveniente del cansancio de la vista del observador después de un cierto número de muestras en cada una de las cuales se han examinado 30 o 50 campos.

A continuación van dos cuadros con los resultados del examen de leches a su llegada a una lechería de Montevideo. Comparé los tres métodos: reductosa, cultivo en placas de gelatina (extracto de carne y peptona) y el de Breeds.

Ensayo del 21 de Diciembre de 1929
Comparación de los tres procedimientos

MUESTRAS	Reductora (horas para la decoloración)	Bacterias por C. C. (numeración según Beeds)	Colonias por C. C. (cultivo en placas)
I tarro <i>a</i>	5 h 20	7.402.020	3.000.000
» <i>b</i>	5 h 35		
II » <i>a</i>	5 h 35	5.336.340	6.000.000
» <i>b</i>	7 h 05		
III » <i>a</i>	5 h 20	4.475.640	4.000.000
» <i>b</i>	5 h 47		
IV » <i>a</i>	3 h 35	20.140.380	4.000.000
» <i>b</i>	5 h 45		
V » <i>a</i>	0 h 43	17.386.140	63.000.000 *
» <i>b</i>	7 h 55		
VI » <i>a</i>	7 h 35	3.012.450	8.000.000
» <i>b</i>	5 h 47		

* Colonias «cabezas de alfiler» innumerables en ciertas regiones de la placa; probablemente una infección por tarro sucio lo que explica la decoloración en 43 minutos.

Ensayo del 16 de Mayo de 1930

MUESTRAS	Bacterias por C. C. (numeración según Beeds)	Colonias por C. C. (cultivo sobre placa)	Acidez de la leche (Dornic)
Tarro 1	10.131.500	1.000.000	17°
» 2	8.810.000	1.000.000	18°5
» 3	29.954.000	5.000.000	17°5
» 4	29.549.000	2.000.000	18°
» 5	12.334.000	1.000.000	17°
» 6	10.043.400	10.000.000	17°

En ambos ensayos las placas fueron examinadas a las 60 horas, manteniéndolas entre 17° y 20°. En el ensayo del 21 de diciembre, en cada lote de leche tomé muestra de dos tarros separadamente para la reductosa y en mezcla para las placas y el Breeds. En el ensayo del 16 de Mayo tomé separadamente

para los dos controles, muestras de 6 tarros de un mismo lote de leche. Todas las operaciones se efectuaron con la mayor prolijidad y empleando material esterilizado dos veces a 120° durante 1¼ de hora.

En el ensayo del 21 de diciembre (en el que por falta de tiempo no hicimos el Breeds y las placas separadamente por cada tarro) vemos que la prueba de la reductosa muestra diferencias grandes de un tarro al otro en 4 leches: la 2 con 1 h 30', la 4 con h 10', la 5 con 7 h 08' y la 6 con 1 h 50'. La diferencia más notable es la del lote 5, del cual un tarro dió la decoloración en 0 h 43' y el otro en 7 h 55', indicando que si la leche de un tarro era buena la del otro estaba cargadísima de bacterias. Ahora bien, observando las placas correspondientes a esta leche (mezcla de los 2 tarros) ví que presentaba una cantidad asombrosa de colonias "cabeza de alfiler", tan numerosas que no se podían contar; ciertas regiones de la placa se parecían a la vía láctea. Eso demuestra que había habido una infección muy intensa, probablemente un resto de leche en el tarro o en la enfiadora o el filtro, ya que sabemos que estas colonias se forman de preferencia donde hay falta de limpieza.

Como consecuencia de este hecho saco la conclusión que el ensayo bacteriológico a que obliga la nueva reglamentación, deberá, para ser estricto y justo al mismo tiempo, hacerse tarro por tarro a los fines de la aceptación o rechazo de la leche. ¿A que consecuencias nos llevará semejante examen en una lechería importante? A la imposibilidad práctica de la aplicación de la ordenanza en forma estricta y diaria. Efectivamente el número de muestras a examinar en una lechería, aún de 20.000 litros, para poder efectuar el examen en una hora, que sería el máximo de tiempo que la leche podría ser detenida, obligaría a tener un personal tan numeroso (hemos dicho que un operador no puede examinar más de 7 a 10 muestras en una hora) que nadie ha encarado el problema de esta manera. La misma comisión que lo estudió y planeó la reglamentación, nunca pensó que el examen debía preceder la pasteurización, sino que la leche se pasteurizaba y que al conocer el resultado del examen se rechazarían en las remesas siguientes las leches que no venían en condiciones. Además, veamos como proceden los norteamericanos. En las usinas se hace diariamente un cierto número de análisis no repitiéndolo sino después de varios días para las leches que llegan en condiciones; en cambio se persigue por el análisis diario seguido las leches en malas condiciones.

Me parece que tal conducta es la que deberán seguir los técnicos encargados de la clasificación de las leches en Montevideo. Además por lo que constato en mis observaciones, creo que será muy difícil conseguir que dentro del plazo de 1 año, la leche llegue a las usinas con menos de 1 1/2 millón de bacterias, sobretodo mientras no se adopte un modo más enérgico de enfriamiento que el con agua de pozo, y medios de transportes más rápidos y en mejores condiciones. Respecto al agua de pozo mis investigaciones en varios tambos durante el verano, me hicieron constatar que muy raras veces posee una temperatura inferior a 20°, llegando en muchos tambos a 24° y 25°.

Volviendo al ensayo del 16 de mayo cabe hacer observar que en la muestra del tarro 6 encontramos una sola aglomeración en los 20 campos, lo que explicaría la similitud de los resultados. En la leche del tarro 3 relación 1 a 6 había en los 20 campos 6 aglomeraciones, la mayor de 65 bacterias y muchas bacterias sueltas. En las muestras de los tarros 1, 2 y 5 encontramos 4, 5 y 4 aglomeraciones y pocas bacterias sueltas; las relaciones fueron en cifras redondas, 1|10, 1|9 y 1|12, respectivamente.

La muestra 4 con relación 1 a 15, presentó en 20 campos diez aglomeraciones con número de bacterias de 19 a 60.

Este ensayo demuestra claramente la necesidad de examinar tarro por tarro la leche de los lotes.

Ahora bien, estas leches que hubieran sido rechazadas las 6, si estuviera en vigencia la reglamentación, tenían una acidez perfectamente normal y las seis se coagularon espontáneamente después de 30 horas sin formación de gases ni separación del suero, y hervidas a las 12 horas después de su llegada no se coagularon apesar de no haberse enfriado la muestra y de haberse guardado a la temperatura del ambiente. Doy estos detalles para hacer ver que estas leches aún con gran número de bacterias no se habían acidificado porque su refrigeración en el tambo había sido buena (su temperatura a la llegada a la lechería era de 16°), y una vez pasteurizadas podrían entregarse al consumo sin peligro para los consumidores.

En ambos ensayos constatamos que estamos aún lejos de la cifra de 1 1/2 millón que exigirá la reglamentación dentro de un año, y que es necesario aclarar bien el concepto de la numeración directa en lo que se refiere a las aglomeraciones, si se contarán como **una unidad bacteriana** o si se tomará el número de las bacterias que las componen. En efecto trabajando con

ocular 15 y objetivo de numeración 90 basta un promedio de una sola bacteria entre los campos observados para pasar ligeramente el límite de 1 1/2 millón; supongamos que en 20 campos examinados encontramos 19 libras de bacterias pero en uno un conglomerado de 30 bacterias (caso muy frecuente), eso bastaría para hacer rechazar una leche que sin embargo deberíamos considerar como muy apta para la pasteurización.

Quiero también hacer algunas consideraciones respecto a la prueba del alcohol. La ordenanza establece que se rechazarán las leches que cortan cuando se mezclan en partes iguales con alcohol a 70°. Esta prueba es la que usan ya corrientemente las lecherías, y podría ser sustituida por la dosificación de la acidez con soda en presencia de fenoltaleina. ("La Martona" en su lechería de Vicente Casares acepta o rechaza la leche mediante esta prueba). La del alcohol es más completa, pues si la leche ácida coagula en presencia del alcohol, corta también la de acidez normal pero demasiado cargada de sales. En esta categoría de leches entran las con calostro, que es conveniente eliminar del consumo, de manera que el alcohol presenta esta ventaja sobre la fijación acidimétrica. Pero también cortan leches de vacas viejas paridas, muy salinas, pero no malas, sobretodo si se mezclan con otra. He podido observar en un tambo vacas muy adelantadas en su lactación, produciendo aún un respetable litraje, cuya leche cortaba con el alcohol. Sin embargo, la acidez era perfectamente normal, de 14 a 16° Dornic, de manera que la cortada era debida a exceso de sal. Hice dos ensayos con leches buenas, que no cortaban, agregándoles cantidades determinadas de Na Cl seco y esterilizado.

I — A 10 cc. de una leche de densidad 1031,2 acidez 16°5 D. y conteniendo 0,681 % de substancias minerales, agregué 0 gr. 005, 0 gr. 010, 0 gr. 019, 0 gr. 038 y 0 gr. 075, observando lo siguiente:

Con 0.005 no corta con cantidad igual ni doble de alcohol.

Con 0.010 no corta con cantidad igual de alcohol, corta en granos finísimos con cantidad doble.

Con 0.019 corta en granos finos con cantidad igual, corta grueso con cantidad doble.

Con 0.038 corta grueso con cantidad igual, corta muy grueso con cantidad doble.

Con 0.075 corta muy grueso con cantidad igual.

II — A 10 cc. de una leche de densidad 1031,7, acidez 17% D. y conteniendo 0.685 % de substancias minerales, agregué 0 gr. 005, 0 gr. 010, 0 gr. 015, 0 gr. 020 y 0 gr. 025 de Na Cl.

Con 0 gr. 005 no corta ni con igual ni con doble cantidad.

Con 0 gr. 010 corta finísimo con igual cantidad, corta más grueso con doble cantidad.

Con 0 gr. 015 corta fino con igual cantidad, corta grueso con doble cantidad.

Con 0 gr. 020 corta grueso con igual cantidad.

Con 0 gr. 030 corta muy grueso con igual cantidad.

De manera que basta agregar a una leche 0 gr. 1 por ciento para que la prueba al alcohol dé resultado positivo. Eso nos hace pensar si realmente hay derecho en rechazar una leche que en vez de 0.7 contenga 0.8 de substancias minerales, sobretodo si su acidez y demás condiciones son normales, y si se expende en mezcla con otras leches, obteniéndose así un contenido de substancias minerales que oscila dentro de los límites normales. Sin embargo, en vista de la facultad de la prueba del alcohol de desechar las leches colostrales o alcalinas por enfermedad de la vaca, que se deben rechazar, debe mantenerse la obligatoriedad de esta prueba completándola con la prueba de la acidez, la determinación de la densidad, etc., para las leches que al examen organoléptico no se presentan como sospechosas.

Recomendamos el estudio de este punto a los investigadores e interesados.

Estaba ya escrito este artículo cuando el Decano de la Facultad de Agronomía, Ing. Agr. Menéndez Lees, me hizo recordar que en tiempos en que nos ocupábamos de la confección de la "Reglamentación Municipal", él se dedicaba a estudiar este punto especial, habiendo llegado a idénticos resultados.

Como se vé hay aún varios puntos de la futura reglamentación que requieren estudio, y es necesario que los reglamentos y los que aplicarán estos reglamentos se pongan en un terreno práctico para llegar a una solución que permita su aplicación en bien de la población sin caer en lo absurdo e inaplicable. Yo quedaría muy satisfecho si con esta modesta exposición de constataciones y referencias hechas en la labor diaria, pueda contribuir a la solución de este importante problema.