

EL presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Villa María –LABVIMA- en carácter de pasantía para obtener el título de microbióloga.

ALUMNA:

Romina Audano -----

DIRECTOR:

Dra. Susana G. Bettera -----

CODIRECTORES:

Dr. Cesar Bonetto -----

Dra. Cecilia Frigerio -----

JURADO:

Dra. Silvia M. Zanon -----

Dra. Claudia Raspanti -----

Dra. Susana G. Bettera -----

**Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nac. 36 - Km. 601 Río
Cuarto- Córdoba, Argentina.
Diciembre de 2006.**

DEDICATORIAS:

A mis padres, por su apoyo, paciencia y cariño incondicional.

*- Al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Villa María - LABVIMA-
por la oportunidad que me dieron de realizar mi trabajo final, y por la confianza que depositaron en mí.*

- A mis compañeros, en especial aquellos que me despertaban en clase.

- A mis amigos, los que hacían que me durmiera en clases.

- A María, Mamá y Marcelo, las 3 M que más me han alentado en este último tramo de mi carrera.

RESUMEN

La leche es el primer alimento de nuestras vidas, representándose así la importancia que ésta y sus derivados tienen en la dieta alimentaria. De aquí, que el control de su calidad es de gran importancia para la industria. Sumado a esto, encontramos que la lechería es uno de los pilares de la economía Argentina, por el mercado de consumo interno y por las exportaciones y convenios en los que se encuentra implicada.

La calidad higiénica de la leche es fundamental por su posible impacto en la salud pública y como determinante de la calidad de los productos lácteos.

Todos los eslabones que participan en la cadena de producción resultan fundamentales para garantizar dicha calidad, lo que implica que pueden ser considerados posibles puntos críticos en el caso de que la misma no se cumpla, esto requiere un compromiso de todas las partes desde la extracción de la leche hasta que el producto terminado llegue a la góndola.

La presente pasantía se realizó en un laboratorio especializado en el diagnóstico veterinario, en donde también se hizo determinaciones microbiológicas a leches y sus derivados. La principal característica de dicho laboratorio es el análisis de muestras particulares de terceros.

Se analizaron muestras de leche cruda y pasteurizada, leche en polvo, fermento, yogurt, queso, suero, salmuera y agua. Las determinaciones realizadas para cada caso respondieron al pedido del cliente.

Se pudo verificar que los microorganismos principalmente aislados del diagnóstico de mastitis fueron *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.* demostrando una deficiente sanidad animal, lo que se refleja en la calidad higiénico-sanitaria de la leche.

Así mismo, las muestras en general presentaron regular calidad microbiológica, sobrepasando los límites permitidos por el Código Alimentario Argentino, o presentando insuficiente número de determinaciones..

ÍNDICE

1	Introducción	
1.1	Que es la leche	2
1.1.2	La leche alrededor del mundo	2
1.1.3	Características de la producción lechera en la Argentina	3
1.1.3.1	Cuencas lecheras	3
1.1.3.2	Participación de las provincias en la producción anual de leche	4
1.1.4	Destino de la leche cruda	5
1.1.5	Composición de la leche	8
1.1.6	Importancia de la leche en la nutrición	10
1.1.7	Sanidad de la leche	11
1.1.8	Microorganismos presentes en la leche	13
1.1.9	Microorganismos que intervienen en el procesamiento y deterioro de los alimentos	18
1.2	Derivados lácteos	20
1.2.1	Leche en polvo	20
1.2.2	Fermentos	21
1.2.3	Yogurt	22
1.2.4	Quesos	23
1.3	Agua	26
2	Hipótesis	27
3	Objetivos	
3.1	Objetivos generales	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	Métodos y materiales	
4.1	Métodos	28
4.1.1	Análisis realizados en las muestras de leche y derivados lácteos	28
4.1.2	Análisis bacteriológico del agua	31
4.2	Materiales	33
5	Resultados y discusión	
5.1	Origen de las muestras	35
5.2	Análisis de leche cruda	35
5.2.1	Diagnóstico de mastitis	35

5.2.2	Recuento de bacterias totales	37
5.2.3	Recuento de Coliformes totales	38
5.2.4	Recuento de microorganismos Psicrófilos	39
5.2.5	Determinación de microorganismos termófilos	39
5.2.6	Determinación cualitativa de microorganismos anaerobios	40
5.3	Análisis de leche en polvo	40
5.3.1	Determinación de Staphylococcus	40
5.4	Fermento	41
5.4.1	Determinación de Coliformes totales	41
5.4.2	Determinación de Hongos y Levaduras	42
5.4.3	Determinación de muestras contaminadas	43
5.5	Yogurt	43
5.6	Quesos	44
5.7	Suero	45
5.8	Salmuera	45
5.9	Agua	45
6	Conclusión	46
7	Bibliografía	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿QUÉ ES LA LECHE?

La definición de leche puede ser muy amplia, dependiendo de los aspectos que se tengan en cuenta; sabemos que nos alimenta desde el momento después del nacimiento y su aporte nutricional resulta de tal importancia que su consumo o el de sus derivados, es fundamental a lo largo de toda la vida.

La leche es un tipo de secreción de alto valor nutricional, propio de los mamíferos, adecuadamente adaptado a las necesidades de los recién nacidos y única fuente de alimentos durante los primeros meses de vida.

Se considera leche apta para el consumo humano, la obtenida fuera del período correspondiente a los diez días antes, durante y después del parto.

Así mismo, el Código Alimentario Argentino, en su Art.554. (Res 22,30.01.95) establece: “Con la denominación de Leche sin otro calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño completo e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, provenientes de tambos inscriptos y habilitados por las Autoridades Sanitarias Bromatológicas Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie.”

1.1.2 LA LECHE ALREDEDOR DEL MUNDO

La producción mundial de leche cruda alcanzó en el año 2004, un volumen de 515.84 millones de toneladas, de los cuales, un 64% ingresó en el circuito industrial para la elaboración de productos lácteos, un 34% se utilizó como leche fluida y el 2% restante como alimento animal. (9)

La Argentina participa con el 2% de la producción mundial con 9,2 millones de toneladas, ubicándose en el onceavo lugar a nivel mundial, y en el segundo lugar de América del Sur, después de Brasil.

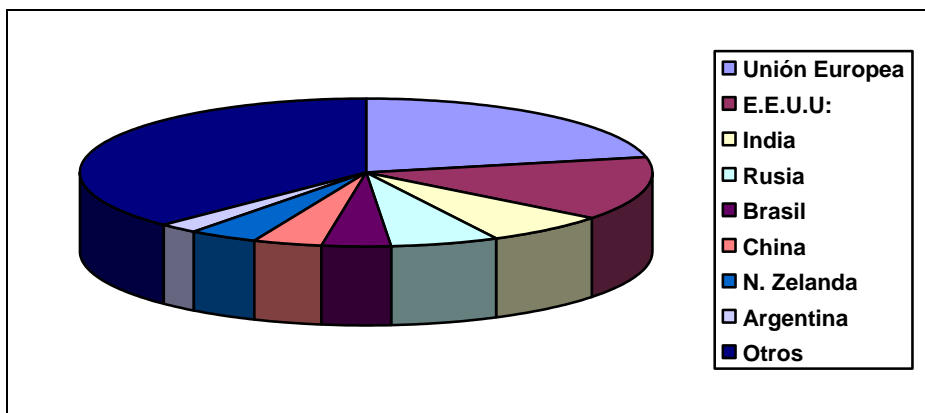


Figura 1: Proporción de la producción de leche en los distintos países. (9)

1.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN LECHERA EN LA ARGENTINA

En la Argentina la industria láctea, con sus 848 plantas industriales y 30000 empleados, se ubica en tercer lugar dentro de las industrias de alimentación del país, aportando un 2,1% del empleo, el 2,1% de las exportaciones y el 0,1% de las importaciones a la industria nacional. (9)

La principal característica de las industrias en la Argentina es la coexistencia de numerosas pequeñas empresas la mayoría artesanales y que participan en el circuito informal de la producción, tales como cooperativas regionales; Y por otro lado, grandes y medianas empresas responsables de la mayor parte de la producción.

1.1.3.1 CUENCAS LECHERAS

La producción láctea de la Argentina se concentra en las provincias de: *Buenos Aires* (1. Mar y Sierras, 2. Oeste, 3. Abasto Sur, 4. Abasto Norte), *Santa Fe* (7. Sur, 8. Central), *Córdoba* (9. Sur, 10. Villa María, 11. Noreste), *Entre Ríos* (5. Cuenca "B", 6. Cuenca "A"), *La Pampa* (12. La Pampa) y *Tucumán* (13. Cuenca de Trancas) (SAGPyA, 2003). Puede observarse en la figura 2 la distribución de dichas zona en el mapa.

Estas regiones lecheras reciben su denominación según la especialización, quedando conformadas dos grandes cuencas lecheras: la "*cuena de abasto*", la cual produce mayoritariamente leche fresca para consumo, y la "*cuena de la industria*" especializada en la elaboración de productos industriales tales como quesos y manteca.

Actualmente el 80% de las plantas industriales se concentran en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. (9)

La participación relativa de las principales provincias (Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y La Pampa) ha ido variando en función del tiempo. Si bien todas han mostrado crecimiento en los últimos años, la provincia de Buenos Aires ha perdido participación relativa. Esto puede explicarse, principalmente, por la mayor tasa de crecimiento que ha presentado la provincia de Santa Fe. Por otro lado, Córdoba mantiene su posición al igual que Entre Ríos, La Pampa y otras provincias.

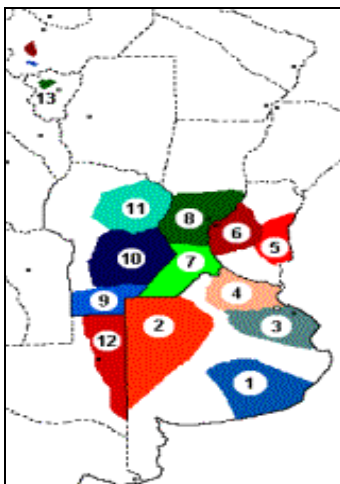


Figura 2: Ubicación geográfica de las cuencas lecheras en Argentina

1.1.3.2 PARTICIPACIÓN DE LAS PROVINCIAS EN LA PRODUCCIÓN ANUAL DE LECHE

Existe gran diversidad entre los rendimientos según la provincia que se considere y también entre zonas de una misma provincia.

1.1.3.2.1 Santa Fe: es la principal provincia lechera del país, tanto por su volumen de producción como por la importancia que tradicionalmente tuvo la actividad en el desarrollo de algunas ciudades. La productividad en los tambos ha venido creciendo en forma sostenida. A pesar de poseer menor número de bovinos por tambo, producir menor cantidad de leche cruda y tener menor número de plantas industriales que Córdoba, es la que tiene mayor capacidad instalada, con 15,8 mill. de lts/día y la que procesa más litros de leche. Otras características de esta provincia son la especialización en la producción de quesos y la mayor participación en la exportación de commodities. La provincia cuenta con dos cuencas: Santa Fe Centro y Santa Fe Sur que aportan el 90% y el 9% respectivamente de la producción total de la provincia. (9; 19)

1.1.3.2.2 Córdoba: es la principal productora de leche cruda, aportando el 27% de la producción nacional, lo que representa un tercio de la misma; por lo que se ubica en el segundo escalón de las provincias productoras de leche del país. Dentro de las 3 cuencas que posee la provincia, la de mayor importancia es la de Villa María, que se continúa con la cuenca Santa Fe Sur, aportando el 50% de la producción. La industrialización de la leche se realiza en unas 340 plantas, que reúnen una capacidad de procesamiento de más de 9 mill. de lts/día. Una característica común a la provincia de Santa Fe es la alta proporción de la leche cruda que es destinada a la elaboración de quesos (60%) y de leche en polvo (20%). Se estima que la cantidad de tambos está en el orden de los 4.800. (9; 31; 39)

1.1.3.2.3 Buenos Aires: es la tercera provincia en cuanto a la producción de leche cruda, aportando el 22% y su participación relativa en el total nacional se ha ido reduciendo a favor de la mayor participación de Santa Fe. De las 4 cuencas de la provincia, el Oeste es la más importante con el 51% de los tambos y 54% de la producción. Le sigue Abasto Sur, Abasto Norte y en el último escalón se encuentra Mar y Sierras con el 9% de los tambos y el 11% de producción. La provincia está siendo afectada, al igual que otras zonas, por la reducción en la cantidad de tambos y la tendencia de establecimientos con mayores escalas de producción. El destino de la producción de esta provincia es la elaboración de productos frescos para el consumo interno como leche fluida, yogur y quesos blandos. Para ello cuenta con 276 plantas industriales las que, en total, dan una capacidad instalada para procesar 7,5 mill. de lts/día.(9; 19)

1.1.3.2.4 Entre Ríos: ocupa el cuarto lugar en importancia en el sector lechero, con un aporte aproximado de 3,5% de la producción nacional, volumen que representó un total de 278 mill. de lts/en el año 2003; cuenta para ello con dos cuencas, Oeste y Este. En cuanto a las industrias, existen 54 establecimientos elaboradores de lácteos, los que poseen, en total, una capacidad instalada de 1,2 mill. de lts/día.(9)

1.1.3.2.5 La Pampa: cuenta con 1 cuenca que a su vez puede ser dividida en 3 (Norte, Centro y Sur), todas ubicadas en la franja oriental de la provincia. Su producción primaria representa el 1% de la producción nacional. Cuenta con 24 plantas industriales que suman una capacidad instalada para procesar 185 mil lts/día. Sin embargo, se estima que un 35 a un 40% de la leche cruda sale de la provincia como leche enfriada, para continuar su proceso industrial en las provincias de Buenos Aires y Córdoba. (9; 19; 39)

1.1.3.2.5 Tucumán: tiene una cuenca de importancia relativa menor que el resto de las ya mencionadas. (19)

1.1.4 DESTINO DE LA LECHE CRUDA.

Entre los años 1993 y 1998 ocurre en la Argentina un fuerte crecimiento del sector industrial, en donde se da el ingreso de empresas multinacionales de la mano de grandes inversiones económicas, lo que lleva a un aumento en la capacidad de procesamiento y en la producción industrial, con la aparición de nuevos productos; bajo este panorama, a partir de la conformación del MERCOSUR se ve una tendencia a aumentar la cantidad de leche destinada a la elaboración de productos industriales con respecto a la dirigida al consumo fresco.

La recesión económica ocurrida en el año 1998 pone fin al período expansivo del sector lácteo, disminuyendo tanto la demanda interna como las exportaciones; esto se reflejó en la disminución del precio de la leche al productor, lo que llevó al cierre de tambos, a una reducción del rodeo lechero y por ende una disminución de la producción de leche cruda. Esto afectó directamente a la

industria, provocando el cierre de algunas de ellas, en especial de PYMES. Este cuadro se vio agravado por la devaluación de la moneda que disminuyó los ingresos y la capacidad de pago de las industrias, enfrentándose al sector productivo y llevando a un crecimiento del sector informal.

Este marcado decaimiento del sector se observó hasta el año 2004, donde se vio un aumento en el sector productor por el ingreso de animales jóvenes de reposición, aumento del precio de la leche, acompañado de un menor precio de los insumos alimenticios (maíz y balanceado). Todo esto hizo que la producción llegue a 9169 millones de litros, lo que se explica debido a una mayor producción media por tambo, reflejo de la mayor eficiencia en la producción.

Las industrias reactivaron la producción perdida en los años de crisis, observándose que de los 9169 millones de litros producidos en el año 2004, el 17% fue destinado a la elaboración de leche fluida (1548 millones de litros), el 76% (6974 millones de litros) se industrializó para la obtención de productos lácteos y el 7% restante se comercializó de manera informal (647 millones de litros).

En la figura 3 puede observarse la finalidad de la producción lechera de acuerdo a las situaciones económicas de cada época.

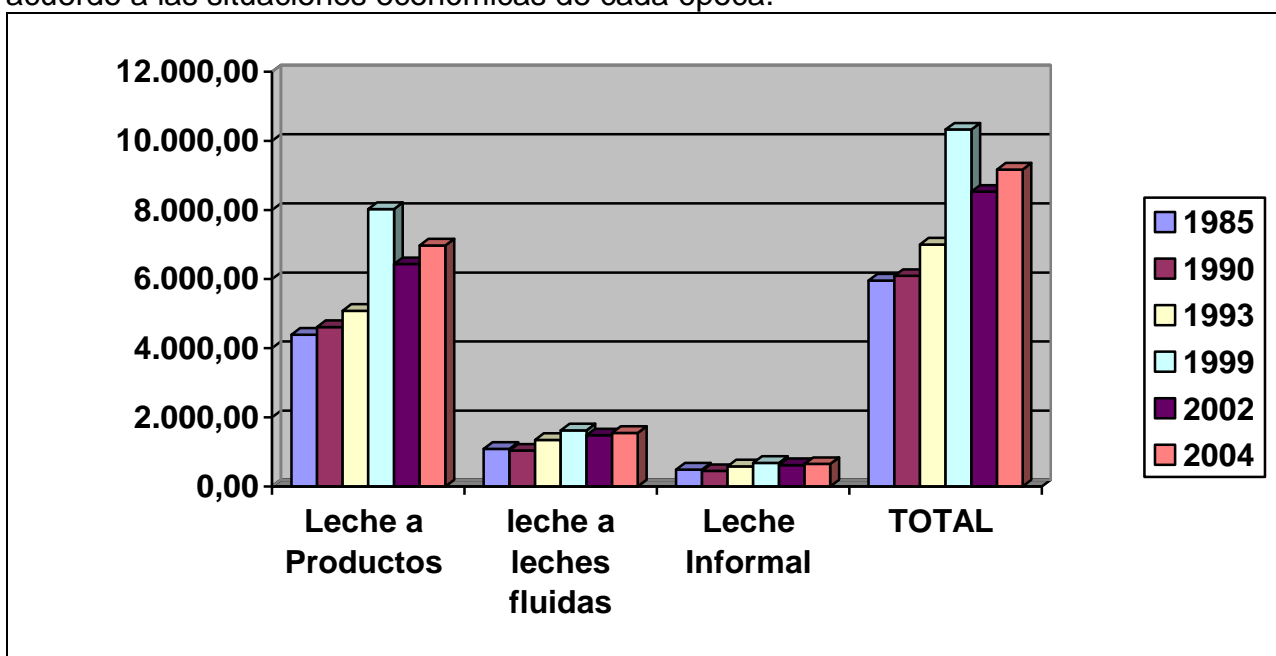


Figura 3: Destino de leche cruda (en millones de litros) en distintos años. (34)

1.1.4.1 PRODUCTOS LÁCTEOS

En Argentina, los productos lácteos han estado mayormente representados por los quesos, entre ellos los de pasta blanda, semidura y dura. Las industrias pequeñas se avocan casi exclusivamente a los dos primeros tipos de pasta, ya que tienen un menor costo financiero involucrado en el estacionamiento de los quesos. Acompañando a éstos están también la manteca y el yogur.

En los últimos años se vio un gran desarrollo de una amplia variedad de productos, cuyo principal objetivo fue el de satisfacer las distintas necesidades de los consumidores, lo que implicó un estudio de los cambios en los hábitos alimenticios de la población, donde la preocupación por la calidad, las bajas calorías, el agregado de suplementos alimentarios para suplir algún tipo de falencias y los bajos costos fueron los principales ítem en consideración.

Durante el período de expansión (años 1991-1999) hubo un marcado aumento en la producción de leches esterilizadas (102% anual), leche en polvo entera (28% anual), quesos pasta semidura (16,3% anual) y leches en polvo descremadas (11% anual). (9) Por otro lado, al comenzar la crisis del sector lácteo (año 2000), se observó la disminución de casi todos los productos, siendo el único que se mantuvo en aumento aunque no tan marcado comparado con otros, el yogur, (figura 4).

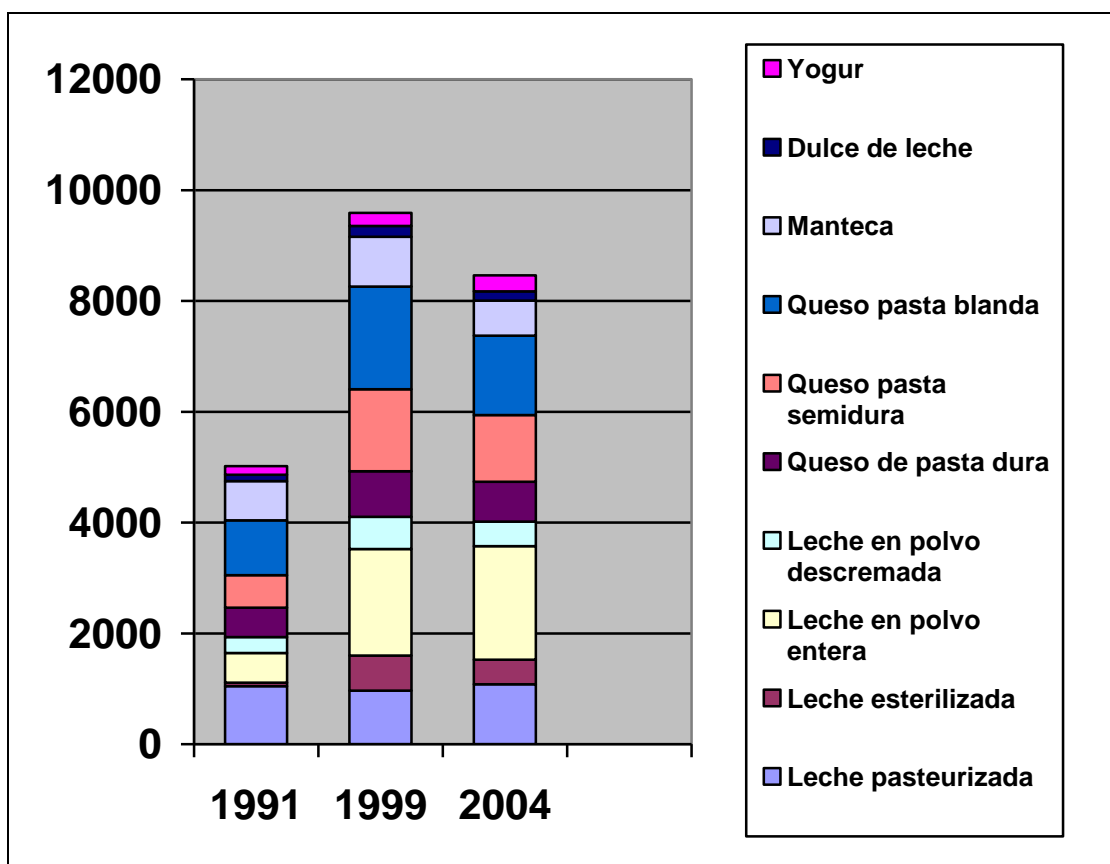


Figura 4: Relevamiento de datos de la leche cruda (en millones de litros) designada a distintos productos (fuente: Dirección de Industria Alimentaria-SAGPyA)

En el año 2004, la producción de todos los derivados lácteos aumentó, siendo la del queso la más significativa con un total de 378 mil toneladas, seguido

por el yogur con una producción de 357 mil toneladas y la leche en polvo entera con 260 mil toneladas. En la figura 5 se observa la proporción de leche destinada a las distintas producciones en el año 2004.

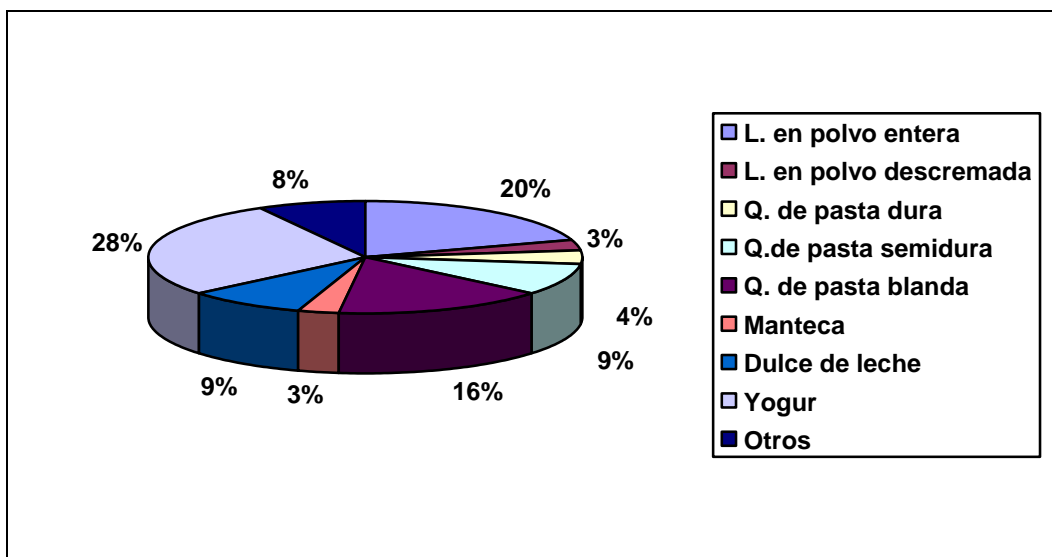


Figura 5: Porcentaje del total de la leche destinada a distintos productos durante el año 2004.

1.1.5 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La composición de la leche varía considerablemente con la raza de la vaca, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros factores. Aún así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizados para indicar adulteraciones. La leche es un producto altamente perecedero que debe ser enfriado a 4°C lo más rápidamente posible luego de su recolección. Las temperaturas extremas, la acidez (pH) o la contaminación por microorganismos pueden deteriorar su calidad rápidamente.(21)

1.1.5.1 AGUA

La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua de la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria. La producción de leche es afectada rápidamente por una disminución de agua y disminuye el mismo día que su suministro es limitado o no se encuentra disponible.(21)

En la tabla 1 observamos la diferencia composicional de la leche en distintas especies.

NUTRIENTES	VACA	BÚFALO	HUMANO
Agua (gr)	88,0	84,0	87,5
Energía (Kcal)	61,0	97,0	70,0
Proteínas (gr)	3,2	3,7	1,0
Grasa (gr)	3,4	6,9	4,4
Lactosa (gr)	4,7	5,2	6,9
Minerales (gr)	0,72	0,79	0,20

Tabla 1: Composición de la leche (por cada 100 gramos) de diferentes especies.

1.1.5.2 HIDRATOS DE CARBONO

El principal hidrato de carbono en la leche es la lactosa. A pesar de que es un azúcar, no se percibe por el sabor dulce. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante y promedia alrededor de 5% (4,8%-5,2%). (21)

En contraste con la concentración de grasa en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras y un poco mayor en la leche materna; su concentración no es fácilmente alterada por la variación de la alimentación. Las moléculas de las que se compone la lactosa se encuentran en una concentración mucho menor en la leche: glucosa (14 mg/100 g) y galactosa (12 mg/ 100 g).

Un gran número de personas son incapaces de digerir dicho azúcar debido a la deficiencia de la enzima lactasa en el tracto digestivo. Sin embargo, se les recomienda el consumo de derivados lácteos tratados con lactasa o en donde la lactosa ha sido transformada a ácido láctico por el proceso de fermentación microbiana, tales como yogures y quesos.

Aún así, la importancia de la lactosa en la salud, se basa en que facilita la absorción del calcio y su fijación durante la formación y desarrollo de la masa ósea.

1.1.5.3 PROTEÍNAS

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteínas. La concentración de proteínas en la leche varía de 3,0 a 4,0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche, donde a mayor cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína.(21)

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). Esta clasificación se basa en que durante el proceso de fabricación de queso, cuando la leche se coagula por acción de la renina, se da la separación del cuajo (constituido por la caseinato de calcio entre otros) de las proteínas séricas.

1.1.5.4 GRASA

Normalmente, la grasa (o lípido) constituye desde el 3,5 hasta el 6,0% de la leche, representando al componente más variable de la misma, dependiendo de la raza de la vaca y de su nutrición. Alimentos muy concentrados, que no estimulan la rumia en la vaca, pueden generar una disminución del porcentaje de grasa (2,0 a 2,5%).

La grasa se encuentra en forma de pequeños glóbulos, rodeados de una capa de fosfolípidos, los cuales por su característica bipolar, mantienen a los glóbulos de grasa en emulsión, suspendidos en agua.

La menor densidad de la materia grasa, hace que esta tienda a ascender, formando lo que se conoce como “nata de la leche”, la cual puede ser disminuida por el proceso de homogenización.

Los glóbulos grasos están constituidos por triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos; en la leche hay principalmente ácidos grasos de cadenas cortas (cadenas de menos de ocho átomos de carbono), predominando el ácido butírico; esto caracteriza la grasa de la leche de otras clases de grasas animales y vegetales. Los ácidos grasos de cadena larga en la leche son principalmente los insaturados (deficientes en hidrógeno), siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), los polinsaturados linoleico y linolénico. (21)

1.1.5.5 MINERALES Y VITAMINAS

La leche es una fuente excelente de la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto. (21)

En la tabla 2 se presenta las concentraciones de vitaminas y minerales en leche.

MINERALES	mg/100 ml	VITAMINAS	µg/100 ml ¹
Potasio	138	Vit. A	30,0
Calcio	125	Vit. D	0,06
Cloro	103	Vit. E	88,0
Fósforo	6	Vit. K	17,0
Sodio	58	Vit. B ₁	37,0
Azufre	30	Vit. B ₂	180,0
Magnesio	12	Vit. B ₆	46,0
Minerales trazas ²	<0,1	Vit. B ₁₂	0,42
		Vit. C	1,7

¹ µg = 0,001 gramo

² Incluye cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, selenio, iodo y otros.(21)

Tabla 2: Concentraciones minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml)

1.1.6 IMPORTANCIA DE LA LECHE EN LA NUTRICIÓN

Como el resto de los seres vivos, los humanos necesitamos materia y energía para la construcción y el funcionamiento de nuestro cuerpo. Los alimentos que incorporamos del exterior son la principal fuente de esa energía que necesitamos.

Mediante el proceso de nutrición, nuestro organismo transforma los alimentos y aprovecha los nutrientes contenidos en ellos.

La leche y sus derivados constituyen uno de los alimentos naturales más completos y su valor nutritivo es tal que no pueden ser fácilmente sustituidos por otros alimentos, aunque son pobre en hierro y en ácido ascórbico, aportan vitaminas A, D y B₂ (Riboflavina).

La leche es un alimento que contiene una buena cantidad y variedad de principios nutritivos, tanto energéticos (grasas e hidratos de carbono) como estructurales (proteínas). Asimismo, contiene minerales fundamentales como el calcio y vitaminas en cantidades adecuadas para el funcionamiento correcto de los procesos bioquímicos esenciales para la vida. Por ejemplo, un vaso de 250 ml de leche, aporta el 50% de la cantidad diaria recomendada de vitamina D y el 20% de vitamina A. Para el caso de la vitamina D, como ésta interviene en la fijación del fosfato de calcio a dientes y huesos, está especialmente indicado durante la etapa de crecimiento y en la madurez por su importancia en el tratamiento de la osteoporosis, siendo conveniente su incorporación en toda dieta sana y equilibrada.

La importancia de la leche como fuente de nutrientes, la coloca a ésta y sus derivados en el tercer lugar en la escala de la pirámide alimenticia que se observa en la figura 6.

Se demuestra de esta manera lo irremplazable que es la leche en nuestra alimentación, por lo que se hace imprescindible el control de la calidad higiénico-sanitaria de la misma, fundamentando así el objetivo primordial de los análisis realizados en esta pasantía.



Figura 6: pirámide alimenticia

1.1.7 SANIDAD DE LA LECHE

La leche es un excelente medio de cultivo y protector para ciertos microorganismos, en especial bacterias patógenas provenientes del animal, el hombre o el medio ambiente; estableciéndose así los posibles puntos de contaminación de este producto:

- ★ Leches provenientes de vacas enfermas.
- ★ Contaminación durante el proceso de ordeño.
- ★ Falta de higiene y de temperaturas adecuadas durante el almacenamiento y transporte.
- ★ Tratamiento térmico insuficiente o contaminación post-pasteurización.
- ★ Condiciones de expendio no adecuadas.(1)

El desarrollado de nuevas tecnologías para el proceso y conservación de los alimentos (tales como la pasteurización, Ultra Altas Temperaturas, deshidratación, concentración, esterilización, entre otros) han contribuido a reducir notablemente muchos de los peligros que nos amenazaban. Sin embargo fueron sustituidos por otros que hasta ese momento habían quedado en un segundo plano; son los denominados *microorganismos emergentes*, los cuales tienen como principal fuente de contaminación a la leche fresca. Entre ellos encontramos a *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Staphylococcus aureus*. (8)

1.1.7.1 LECHE DE VACAS ENFERMAS

Las glándulas mamarias muy frecuentemente están expuestas a la infección por microorganismos, causando mastitis bovina; ésta se caracteriza por una inflamación de la ubre, debido a la reacción inflamatoria de los tejidos

secretores o de los conductos de la leche, como respuesta a la presencia de microorganismos o una lesión traumática.

La mastitis puede presentarse en distintas formas, donde los síntomas van a depender del grado de reacción de los tejidos de la glándula mamaria a la infección o lesión traumática y a las condiciones generales de salud del animal afectado. Basándose en el grado de severidad de los síntomas y su duración, podemos clasificarla en:

1.1.7.1.1 Mastitis clínica: Se presenta con signos y síntomas observables; tales como hinchazón de uno o más cuartos de la ubre, calor y dolor al contacto y cambios macroscópicos en la leche. La sola presencia de estos cambios en la leche, sin signos en la ubre, también es definida por este tipo de mastitis. Los microorganismos principalmente implicados son *Staphylococcus aureus* y aquellos denominados de tipo ambiental, como *Streptococcus no agalactiae* y Gram negativos, sobre todo coliformes, *Klebsiella*, y otros como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* y especies de *Cándidas*. (28)

1.1.7.1.2 Mastitis subclínica: En ésta no se presentan signos o síntomas observables y por lo general la leche, la ubre y el animal aparentan estar sanos, por lo que sólo se detecta en el aumento del recuento de células somáticas en la leche o por el diagnóstico bacteriológico en el laboratorio. A diferencia de la mastitis clínica, este tipo de mastitis suele ser prolongada o crónica; por lo general es causada por microorganismos contagiosos tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp* y *Corynebacterium bobis*. (13; 28)

A su vez hay un tercer grupo de microorganismos capaces de causar ambas mastitis, denominados oportunistas, estos han adquirido importancia como consecuencia del descenso en la prevalencia de otros microorganismos; entre ellos tenemos a los *Staphylococcus coagulasa* negativos.

1.1.7.2 CONTAMINACIÓN DURANTE EL PROCESO DE ORDEÑO

El productor lechero tiene la responsabilidad de producir bajo condiciones de higiene, con procedimientos y técnicas aprobadas para la limpieza y desinfección del equipo de ordeño y del establecimiento lechero; asegurando así, una producción de leche cruda de buena calidad bacteriológica.

Hay que tener en cuenta que la leche es un producto estéril cuando es secretada por glándulas mamarias sanas, por lo que su contaminación ocurre durante y después del ordeño, debiendo tener cuidado en:

- ★ El uso de aguas no contaminadas para la limpieza de las instalaciones, máquinas y los pezones de la vaca.
- ★ El lavado de los pezones y posterior secado, sin mojar la parte inferior de la ubre, pudiendo escurrir agua contaminada hacia los pezones ya preparados para el ordeño.
- ★ La contaminación de los pezones por el medio ambiente, por otro pezón en la misma vaca y entre vacas por las manos del ordeñador.

-
-
- ★ La limpieza de la unidad de ordeño entre cada vaca, de modo de disminuir el riesgo de transmisión de bacterias patógenas.
 - ★ Cuidado de que la unidad de ordeño no entre en contacto con la suciedad del piso.
 - ★ Remoción de posibles depósitos de leche en la máquina de ordeño.
 - ★ Lavado y desinfección de la máquina de ordeño.
 - ★ Desinfección de los pezones después del ordeño. (1; 14; 20)

1.1.7.3 ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Desde hace ya varios años se ha implementado el uso de tanques de frío en los tambos, en donde la leche es refrigerada a una temperatura que puede ir de los 8°C a los 4°C en constante agitación. De este modo se evita el desarrollo de los microorganismos presentes en la leche, por lo que, este ítem carece de importancia si el ordeño no fue realizado en condiciones de higiene.

Asimismo, la limpieza del tanque de refrigeración y del transporte es fundamental para no aumentar la carga microbiana en la leche. (1)

1.1.7.4 CONTAMINACIÓN DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN

El proceso térmico de la pasteurización elimina las bacterias patógenas, sin embargo cuando los parámetros de temperatura y tiempo no están debidamente ajustados, podrían quedar microorganismos, provocando consecuencias indeseables en la producción. También puede ocurrir una recontaminación, ya sea por la incorrecta higiene de las líneas de leche y/o por la manipulación de los operadores. (8)

1.1.7.5 CONDICIONES DE EXPENDIO

En este caso se debe tener en cuenta las características de los productos, ya sean frescos, en polvo, etc.; esto determinará bajo qué condiciones deben ser almacenados y puestos a la venta, de modo de no modificar sus características físico-químicas y microbiológicas.

1.1.8 MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA LECHE

1.1.8.1 SALMONELLA spp

Salmonella es un género bacteriano formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con [flagelos](#) peritricos y no desarrolla cápsula ni espora. Son [bacterias](#) móviles que producen sulfuro de hidrogeno. La taxonomía de *Salmonella* es complicada. Actualmente hay dos especies dentro del género: *Salmonella bongori* (previamente subespecie V) y *S. enterica* la cual es dividida en

seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *S. bongori* (ya incluida en una especie distinta). (5)

Esta bacteria es responsable de causar gastroenteritis con un período de incubación de 5 horas a 5 días; la eliminación de microorganismos puede darse a través de las heces del enfermo, presentando dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal y diarrea, erupción máculo-papulosa en pecho y espalda. Los enfermos presentan un período de convalecencia de 1 a 8 semanas, las personas curadas eliminan *Salmonella* durante más de 1 año.

Dentro de los alimentos asociados a este tipo de infecciones encontramos: carnes crudas, pollo, huevo, leche y derivados lácteos (por lo general debido a contaminación pos proceso térmico), pescados, salsas, mezclas para pasteles, postres a base de crema, gelatina en polvo, manteca de maní, cacao y chocolate; aún así cualquier alimento no cocido correctamente es un buen vehículo de transmisión de *Salmonella*, ya que se debe tener en cuenta además la contaminación cruzada que puede darse. (18)

Dentro de las medidas a tener en cuenta, están:

- ★ Destruir la bacteria en los alimentos mediante la cocción, empleando temperaturas entre 65 y 74°C.
- ★ Evitar la contaminación cruzada durante la manipulación de los alimentos una vez realizada la cocción.
- ★ Almacenar los alimentos a bajas temperaturas (5°C) para evitar su crecimiento.
- ★ Evitar que personas con síntomas de salmonelosis o portadores manipulen los alimentos.

1.1.8.2 *CAMPYLOBACTER spp*

Campylobacter spp se ha convertido en una de las causas más frecuentes de gastroenteritis bacterianas, sólo superado por *Salmonella spp*, debido a la dificultad en su crecimiento y a la poca gravedad de la enfermedad. No produce brotes epidémicos, sino casos esporádicos, con un único afectado cada vez (caso contrario a *Salmonella*). Afecta principalmente a niños de 0-5 años, produciendo una diarrea aguda más o menos grave.

Dentro de las características de este microorganismo podemos mencionar un periodo de incubación que oscila entre 2 y 5 días, es microaerófilo y termófilo, creciendo bien a temperaturas de 42-43°C. Las especies más comunes que se han identificado de *Campylobacter* son: *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*; si bien *C. jejuni*, origina el 90 - 95 % de las gastroenteritis bacterianas, no son de gravedad, por lo que la declaración de esta toxiinfección es muy baja y está infravalorada. (5)

La mayoría de las infecciones se originan por consumo de alimentos de origen animal, sobre todo carne de pollo y derivados de aves domésticas, constituyendo éste el principal reservorio. Otros alimentos implicados son las carnes rojas, despojos, moluscos, leche y quesos no pasteurizados y aguas no cloradas. La transmisión de la enfermedad se produce principalmente por contaminaciones cruzadas entre los alimentos, siendo eliminado por la cocción de los mismos. (7; 18)

Las prácticas higiénicas de los manipuladores resultan fundamentales para prevenir la difusión de este microorganismo entre los alimentos, aunque la transmisión por los portadores, es poco frecuente ya que en el hombre, *Campylobacter spp*, es un huésped transitorio, y por tanto, una fuente poco importante de infección.

Si bien el pH estomacal inhibe el desarrollo de este microorganismo, la leche y alimentos grasos, permiten salvar la barrera ácida y producir la infección de forma más fácil.

1.1.8.3 LISTERIA MONOCYTOGENES

Listeria, es una bacteria Gram-positiva, móvil, y aunque muy resistente a las bajas temperaturas (incluso a las de la heladera), al calentamiento, las sales y los nitritos, no esporula; Pero al igual que el resto de las bacterias, la adecuada cocción y la pasteurización la destruyen por completo. Puede ser aislada del suelo, del forraje ensilado y de otras fuentes ambientales. (5)

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* requerida para causar la enfermedad es desconocida, no obstante se cree que varía dependiendo de la cepa y de la susceptibilidad del individuo. De los casos contraídos a causa de la ingestión de leche cruda o supuestamente pasteurizada, es seguro asumir que menos de 1000 organismos puedan causar la enfermedad en personas susceptibles. (35)

Los síntomas que pueden presentarse son semejantes a una gripe con fiebre persistente pudiendo evolucionar hacia síntomas gastrointestinales; el período de incubación comprende de 3 a 21 días. (18)

La listeriosis puede avanzar hasta una septicemia, meningitis, meningoencefalitis, encefalitis e infección intrauterina o cervical en mujeres embarazadas, lo cual puede producir aborto espontáneo (segundo / tercer trimestre) o muerte del feto. (5)

L. monocytogenes ha sido asociada con alimentos tales como la leche cruda, leche supuestamente (o erróneamente) pasteurizada, quesos (en especial las variedades que han sufrido un corto período de maduración), helado, vegetales crudos, salchichas de carne cruda fermentada, aves de corral crudas y cocidas, carnes crudas (de todo tipo) y el pescado fresco o ahumado. Su capacidad de crecer a temperaturas tan bajas como los 3°C le permite multiplicarse en los alimentos refrigerados. (36)

Para una eficaz prevención debe cocinarse adecuadamente los alimentos y realizar buenas prácticas de higiene durante el procesamiento de los mismos e impedir la contaminación cruzada.

1.1.8.4 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es una bacteria que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, desempeñando un importante papel en la fisiología del mismo. Por ser una bacteria regular y normal del intestino se usa

como un indicador de contaminación de los alimentos con materia fecal, suponiéndose la posible presencia de bacterias perjudiciales o patógenas para el hombre que tienen un hábitat común, como por ej., *Salmonella*. (18)

Grupo	Símbolo
<i>E.coli</i> enteropatógenos	ECEP
<i>E.coli</i> enteroinvasivos	ECEI
<i>E.coli</i> productoras de toxinas parecidas a las de <i>Shigella</i>	ECST
<i>E.coli</i> enterotóxicos	ECET
<i>E.coli</i> de adherencia difusa	ECDA
<i>E.coli</i> enteroadherentes/enteroagregativas	ECEA

Tabla 3: Distintas *E.coli* patógenas agrupadas según el tipo de enfermedad que producen en el hombre y en los animales.

E. coli es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas y no esporuladas, es decir, de sencilla destrucción con el calor de la pasteurización. Particularmente, *E.coli* O157:H7 (importante por ser el causante del Síndrome Urémico Hemolítico) tolera condiciones de acidez más bajas que el resto, esto le permite soportar la acidez del estomago sin verse afectada.

Las enfermedades que ocasiona pueden ir de leves a severas y se presentan de 1 a 8 días del ingreso de la bacteria. Los niños menores de 5 años y los ancianos son los grupos más vulnerables. La dosis requerida para enfermar parece ser del orden de 10 a 100 células por gramo. Se produce diarrea acuosa o usualmente con sangre, dolores abdominales severos, náuseas y vómitos y a veces fiebre. La colitis hemorrágica puede derivar en una falla aguda del riñón o en Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en el 5 % de los infectados. Del 3 a 5 % de los que padecen SUH sufren la muerte. Los que consiguen recuperarse padecen fallas renales, complicaciones neurológicas y otras secuelas por mucho tiempo. En Argentina, se informa que hay entre 300 y 350 casos de SUH por año en niños menores de 5 años. En animales, es el agente causal de la mastitis clínica, donde la infección de la glándula mamaria comienza a través del canal del pezón, la dosis infectiva es baja, estando en el rango de las 50 UFC, pero su proliferación rápida condiciona la aparición de la enfermedad. (4; 5; 15; 29)

La bacteria se transmite por el consumo de alimentos insuficientemente cocidos o crudos, ingestión de agua contaminada, contaminación cruzada entre los alimentos, contacto persona a persona, contacto con materia fecal de animales (bovinos, porcinos, etc.) y agua contaminada con heces. El ganado no se ve afectado por las toxinas que produce esta bacteria. (18)

Para el control de los microorganismos patógenos se debe evitar su acceso a los alimentos, inhibiendo su desarrollo por medio de refrigeración a temperaturas

de 4 a 8°C o inactivándolos por medio de la cocción a temperatura por encima de los 68°C y.

1.1.8.5 SHIGELLA

Las bacterias del género *Shigella*, son Gram-negativas, no móviles, no formadoras de esporas y de forma bacilar. La enfermedad que causan representa menos del 10% de los brotes reportados de enfermedades transmitidas por los alimentos. *Shigella* raramente se encuentra en los animales; por el contrario, causa principalmente enfermedades en los humanos. Adicionalmente, este organismo se encuentra en el agua contaminada con heces. (37)

La enfermedad, llamada disentería bacilar, tiene un período de incubación de 15-50 horas, sus síntomas son compatibles a cualquier intoxicación dada por alimentos y con una dosis infectiva muy baja (de solo 10 microorganismos), aunque depende de las condiciones del huésped. El agravante de esta bacteria es que algunas cepas producen enterotoxinas y toxinas Shiga (muy parecidas a la verotoxina de *E.coli* O157:H7). (5)

Dentro de los alimentos implicados encontramos: ensaladas (de papa, atún, camarón y pollo), vegetales crudos, leche y derivados lácteos y productos avícolas. La contaminación de estos alimentos se da generalmente por la ruta oral-anal. El agua contaminada con heces y el manejo antihigiénico de los alimentos por los manipuladores son las causas más comunes de contaminación. Como *Shigella* es sensible al calor, las principales causas de infección son los alimentos crudos o aquellos medianamente cocidos y la contaminación cruzada. Por lo tanto, una cocción adecuada y la higiene en el manejo de los alimentos pueden prevenir las infecciones causadas por *Shigella* en gran medida. (37)

1.1.8.6 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Son bacterias con forma de cocos, Gram-positivos, que se disponen de a pares o en forma de racimos, algunas cepas, tienen la particularidad de producir una toxina de origen proteica y muy estable al calor, responsable de la enfermedad. (5)

La aparición de los síntomas de esta intoxicación es usualmente rápida y en la mayoría de los casos severa, dependiendo de la susceptibilidad individual a la toxina, de la cantidad de alimentos contaminados ingeridos, de la cantidad de toxinas presentes en los alimentos consumidos y de la salud general del hospedero. Los síntomas más comunes son náuseas, vómitos, calambres abdominales y postración. En los casos más severos, puede ocurrir dolor de cabeza y calambres musculares. (38)

Una dosis de toxina de menos de 1,0 microgramo por alimento contaminado producirá los síntomas de intoxicación alimentaria causada por *Staphylococcus*. Este nivel de toxina se alcanza cuando la población de *S. aureus* excede los 100.000 organismos por gramo. (38)

Entre los alimentos que frecuentemente se ven involucrados en la enfermedad de origen alimentario causado por *Staphylococcus* se encuentran la carne y los productos cárnicos; los productos avícolas; las ensaladas como la de huevo, atún, pollo, papas y camarones; los productos de panadería como los pasteles rellenos con crema, las tartas cremosas y los chocolates; los rellenos para emparedados y además, la leche y los productos lácteos. Los alimentos que requieren de una considerable manipulación durante su preparación y son mantenidos a temperaturas ligeramente elevadas después de la misma, son aquellos principalmente involucrados.

Los estafilococos son microorganismos saprófitos del medio ambiente, encontrándose incluso en los equipos de procesamiento, las superficies, el hombre y los animales, siendo estos dos últimos los principales reservorios. Además estos microorganismos, se encuentran presentes como flora normal de la región nasofaríngea, y de la piel en más del 50% de los individuos saludables. A pesar que en los brotes de intoxicación, los manipuladores de alimentos son la principal fuente de su contaminación, los equipos y las superficies también pueden serlo. La intoxicación humana es causada por la ingesta de enterotoxinas producidas en los propios alimentos por alguna cepa de *S. aureus*, usualmente debido a que dichos alimentos no se han mantenido lo suficientemente calientes (60°C o más) ni lo suficientemente fríos (7,2°C o menos).

La prevención pasa por un adecuado control del tiempo y temperatura de cocción y refrigeración de los alimentos, evitar la preparación de alimentos con mucha anterioridad al consumo, y una higiene personal apropiada.

La producción de la toxina en los alimentos se puede prevenir manteniéndolos en refrigeración ya que, después de producida, no es eliminada en la cocción.

En bovinos, es un importante agente causal de mastitis clínica y subclínica, donde su carácter contagioso hace que se propague fácilmente; se caracteriza por aumentar drásticamente el recuento de células somáticas en leches, teniendo un impacto negativo en la producción y calidad de la misma. (4; 6; 10; 29)

1.1.9 MICROORGANISMOS QUE INTERVIENEN EN EL PROCESAMIENTO Y DETRIORO DE LOS ALIMENTOS

1.1.9.1 BACTERIAS PSICRÓFILAS

Se caracterizan por crecer a temperaturas que normalmente se utilizan para la refrigeración de alimentos, clasificándose en:

1.1.9.1.1 Psicrófilas obligadas: tienen una temperatura óptima de 15-18°C o más baja, una máxima por debajo de los 20°C y una mínima de 0°C o menor; como por ejemplo *Flavobacterium*; o *Polaromonas vacuolata* que incluso crecen a 4°C. (27)

1.1.9.1.2 Psicrófilas facultativas o psicrotróficas: Su temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20-30°C soportando hasta 8-10°C. Los psicrotróficos son los

responsables de que los alimentos conservados en refrigeración se alteren al cabo de un tiempo. Incluyen a *Bacillus*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Echerichia*, *Listeria*, *Serratia*, Hongos y Levaduras. (27)

Este grupo de microorganismos ha cobrado particular importancia en los últimos tiempos debido a las tecnologías implementadas para la conservación de alimentos; de modo que cuando se presentan en altos recuentos, pueden causar modificaciones en el sabor y defectos físicos como resultado de su metabolismo o por la liberación de enzimas hidrolíticas, tales como lipasas o proteasas, las cuales no modifican su actividad por las bajas temperaturas. (24; 27)

Si bien la refrigeración conserva las características de los productos, no lo hace por tiempo indefinido. Se asume entonces, que la calidad higiénico-sanitaria depende exclusivamente de la aptitud inicial del alimento.

1.1.9.2 MICROORGANISMOS TERMODÚRICOS

Son organismos capaces de sobrevivir a tratamientos de altas temperaturas pudiendo diferenciarse en:

1.1.9.2.1 Termófilos: aquellos cuya temperatura óptima de desarrollo está por encima de los 45°C. Estos pueden llegar a la leche por medio de contaminaciones con ensilados, ya que son materiales en fermentación donde las temperaturas alcanzan los 60-65°C. (12)

1.1.9.2.2 Termodúricos: son microorganismos que si bien no se desarrollan a altas temperaturas, son capaces de soportarla; sobreviviendo así hasta que las condiciones le resulten favorables para su multiplicación. (12)

1.1.9.2.3 Hipertermófilos: son capaces de crecer a temperaturas por encima de los 80°C. (12)

En algunos casos, los procesos térmicos, tales como la pasteurización, pueden destruir este tipo de microorganismos, sin embargo, algunos tienen la particularidad de resistirlo, tales como *Bacillus* o *Clostridium*; esto generalmente está asociado a la capacidad de formar esporas y a su metabolismo anaerobio. (12)

Los parámetros de los procesos térmicos empleados en la elaboración de alimentos pueden variar dependiendo de los distintos métodos, pero en todos los casos deben modificar lo menos posible sus componentes y asegurar la eliminación total de microorganismos patógenos, tales como *Mycobacterium*, *Brucella*, *Coxiella*, y un gran porcentaje de otros no patógenos. Aún así, la concentración de microorganismos en el producto luego de la pasteurización, va a depender fundamentalmente de la calidad bacteriológica inicial, ya que el tratamiento nunca es suficiente como para eliminar a todas la carga bacteriana, excepto en el caso de la esterilización.

1.19.3 MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

Se desarrollan en la leche cuando las bacterias acidificantes se han destruido por calentamiento y el medio se encuentra exento de aire. Producen un gas compuesto por dióxido de carbono e hidrógeno, y algunas veces también metano. Tienen poca importancia en la leche cruda, caso contrario a lo que ocurre en la leche pasteurizada y derivados lácteos tales como la leche evaporada o quesos fundidos, conservados en envases herméticamente cerrados, así como en los grandes quesos de pasta cocida como el gruyere, a los que hacen hincharse. (2; 17; 30)

1.2 DERIVADOS LÁCTEOS

1.2.1 LECHE EN POLVO

En los últimos años la leche en polvo fue el principal rubro lácteo de exportación de Argentina. En el año 2004, las colocaciones externas marcaron un nuevo récord histórico y representaron el 75% del valor total exportado de lácteos. Las inversiones realizadas principalmente en los años 90` incrementaron fuertemente la capacidad de producción. La incorporación de nuevas plantas de última generación -varias de ellas certificadas bajo normas ISO 9002 o HACCP- y la mejora de la calidad de la materia prima, dieron al sector un perfil altamente competitivo en el mercado mundial. Los frutos están a la vista: Argentina es actualmente el 4º productor y exportador mundial de leche en polvo entera. (35)

El Código Alimentario Argentino, establece en su artículo 567 (Res. 2270, 14.9.83): “Se entiende por leche entera en polvo, leche entera deshidratada o leche entera desecada, el producto que se obtiene por deshidratación de la leche entera apta para la alimentación, mediante procesos tecnológicos adecuados.”

1.2.1.1 Clasificación:

En función del contenido de materia grasa el Código Alimentario Argentino (CAA) clasifica a las leches en polvo en:

1.2.1.1.1 Entera: mayor o igual al 26% peso en peso. Su principal desventaja es que el alto porcentaje de grasa dificulta la fabricación de productos de buena calidad debido a la oxidación y enranciamiento durante la conservación.

1.2.1.1.2 Parcialmente descremada: entre 12 y 17% P/P.

1.2.1.1.3 Descremada: menor al 2% P/P.

La producción de leche en polvo se ha visto incrementada, debido principalmente a la practicidad en el transporte, conservación y tiempo de uso; a diferencia de la leche fluida o incluso la concentrada, no requiere de una cadena de frío para su conservación, aunque debe ser envasada herméticamente y estar resguardada de la luz; ocupa menor volumen para su transporte y la fecha de caducidad es mayor con respecto a la de los alimentos frescos debido a su escasa humedad.

Con el tiempo se han ido desarrollando distintas tecnologías para la producción de leche en polvo, a modo de mantener las propiedades nutritivas y químicas presentes en la leche fresca. Éstas pueden verse alteradas ya que el proceso térmico causaría la precipitación de proteínas y desnaturalización de la lactosa, debido a que son solubles en agua y están implicadas en las reacciones de Maillard, aunque esto aumenta su digestibilidad.

1.2.2 FERMENTOS

Los fermentos son un concentrado de microorganismos seleccionados para producir determinadas modificaciones de los componentes de la materia prima, otorgándole al alimento características particulares de sabor y aroma, modificando su textura, favoreciendo la conservación del producto y en algunos casos, produciendo gas.

Estos microorganismos, para su desarrollo necesitan de temperaturas de incubación apropiadas, tiempo suficiente para su crecimiento, una fuente de nutrientes y ausencia de sustancias inhibidoras; por lo que estos requerimientos deben ser tenidos en cuenta en cualquier línea de producción para alimentos fermentados.

1.2.2.1 CLASIFICACIÓN:

Podemos encontrar dos tipos de fermentos:

1.2.2.1.1 Los fermentos lácticos naturales: se caracterizan por contener una gran cantidad de bacterias, aunque de origen desconocido, por lo que el producto no muestra uniformidad en sus características y son muy propensos a la contaminación. Dichas propiedades han hecho que este tipo de fermento no sea tan utilizado, debido a que uno de los principales objetivos en la producción es la obtención de productos estándares.

1.2.2.1.2 Los fermentos lácticos seleccionados: son compuestos de una cepa pura o de una mezcla de cepas puras en proporciones definidas. Por selección de cepas, se entiende, la investigación de cepas dotadas de buenas propiedades acidificantes, aromatizantes o espesantes, etc. Su comportamiento es muy constante, dando productos cuyas características son siempre las mismas, aunque también se muestran muy sensibles a la contaminación química o biológica (por fagos). Dentro de este tipo de fermentos, los más utilizados son los concentrados, en sus formas liofilizadas o congeladas; además estas presentaciones tienen la ventaja de disminuir las posibilidades de contaminación.

La concentración de microorganismos viables en los cultivos comerciales varía desde 10^9 hasta 10^{16} UFC/ml dependiendo del tipo de presentación que se trate. La gran mayoría de los microorganismos que se utilizan en la lechería son bacterias lácticas tales como *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc cremaris*, *Lactobacillus bulgáricus*, *L. helveticus*; aunque, por ejemplo para la producción de quesos gruyere, se usan bacterias propiónicas, o para los quesos roquefort tienen adicionados hongos. Así, las características deseadas en el producto van a determinar los distintos tipos de microorganismos presentes en el fermento y sus correspondientes proporciones. Dentro de las características que se desean de un fermento se pueden citar:

- ★ Acidificación rápida pero limitada.
- ★ Producción de sustancias aromatizantes.

-
-
- ★ Producción de sustancias texturizantes.
 - ★ Caracteres probióticos, etc.

Por estas razones surge la necesidad de recurrir a las técnicas de la ingeniería genética, permitiendo acumular, en un número limitado de cepas, las propiedades requeridas. (32)

1.2.3 YOGURT

El Código Alimentario Argentino, en su artículo 576- (Res. MS y AS N° 295 del 14.04.99- 1.1.1) define al yogur (o yogurt) como aquella leche cuya fermentación se realiza con cultivos simbióticos de *Lactobacillus bulgáricus* y *Streptococcus termophilus*, a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias ácido-lácticas que, por su actividad, contribuyen a la determinación de las características del producto terminado. En consecuencia, el yogur es una leche coagulada obtenida por fermentación láctica a partir de leche enriquecida con otros sólidos lácteos como, leche en polvo de distinto tenor graso y de edulcorantes nutritivos (azúcar) o edulcorantes no calóricos.

1.2.3.1 CLASIFICACIÓN

Existe una gran diversidad de yogures, los cuales son clasificados de a cuerdo a distintos aspectos:

1.2.3.1.1 Consistencia:

- ★ Aflanado
- ★ Batido
- ★ Bebible

1.2.3.1.2 Formulación:

- ★ Naturales
- ★ Saborizados
- ★ Con frutas
- ★ Bajas calorías
- ★ Baja lactosa

1.2.3.1.3 Contenido graso:

- ★ Con crema
- ★ Entero
- ★ Parcialmente descremado
- ★ Descremado

1.2.3.2 ELABORACIÓN DE YOGUR

1.2.3.2.1 Preparación de la mezcla: se regula la concentración de sólidos no grasos, de modo de mejorar la consistencia, aumentar la producción y el rendimiento. Para este propósito se agrega leche en polvo descremada, suero en polvo caseinato. A ésta se le agrega edulcorante, en sus variedades naturales o artificiales, y estabilizantes; la función de éstos últimos es aumentar la consistencia, disminuir el desuerado y aumentar la conservación del producto, aunque no son imprescindibles.

1.2.3.2.2 Pasteurización de la mezcla: este paso en el proceso persigue varios objetivos:

- ★ Lograr la eliminación total de microorganismos patógenos.
- ★ Eliminar la mayoría de los microorganismos banales.
- ★ Inactivar enzimas que pueden traer consecuencias en el producto final.
- ★ Generar factores estimulantes para el desarrollo de fermentos (por ejemplo, ácido fórmico).
- ★ Mejorar la consistencia del producto mediante la formación de un coagulo más firme.
- ★ Favorecer la eliminación de olores indeseables.

1.2.3.2.3 Homogenización de la mezcla: proceso que disminuye el tamaño del glóbulo graso, evitando la formación de la capa de grasa y mejorando la consistencia del producto, obteniéndose una mezcla más fina de los componentes e impidiendo la separación del suero.

1.2.3.2.4 Inoculación: los cultivos de *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaris* son agregados a la mezcla, donde utilizan la lactosa como fuente de carbono con la producción de ácido láctico. El crecimiento de estos microorganismos ocurre de manera simbiótica, lo que lleva a una disminución en el tiempo de procesamiento.

1.2.3.1.5 Incubación: es el tiempo y la temperatura requerida para que desarrollen los microorganismos.

S. termophilus tiene una mayor velocidad de crecimiento, que sesa a medida que aumentan las concentraciones de ácido láctico; sin embargo *Lactobacilo* es capaz de soportar estas condiciones continuando su desarrollo.

1.2.3.1.6 Enfriamiento: se realiza para frenar la acidificación al detener el desarrollo de la microflora y conservar el producto hasta su consumo.

La tecnología de producción puede variar según el criterio de cada empresa en particular y de la variedad de producto que se trate. (32)

1.2.4 QUESO

El queso es una conserva, producto obtenido por la maduración de la cuajada de la leche, de alto valor nutritivo y con características propias para cada uno de los tipos, según su origen o método de fabricación. También es posible

definirlo como el producto resultante de una concentración selectiva de los componentes de la leche, por medio de una coagulación, ácida o enzimática, y extracción de un suero que acarrea los componentes solubles de la leche.

1.2.4.1 CLASIFICACIÓN:

Para los quesos es muy amplia y depende de:

- ★ Consistencia
- ★ Tenor graso
- ★ Forma de coagulación
- ★ Forma de elaboración de la cuajada
- ★ Textura
- ★ Maduración

1.2.4.2 ELABORACIÓN

1.2.4.2.1 Pretratamientos: esta etapa incluye:

- ★ Pasteurización: los objetivos de este proceso ya fueron explicados.
- ★ Bactofugación: es un complemento de la pasteurización que se utiliza para la fabricación de quesos semiduros con ojos y duros, con el objetivo de eliminar los microorganismos esporulados.
- ★ Homogenización: disminuye el tamaño del glóbulo graso de manera de retardar su separación durante la coagulación.
- ★ Estandarización: se realiza para ajustar la composición de la leche, obteniéndose un producto uniforme.

1.2.4.2.2 Agregado de aditivos:

- ★ Colorante: su función es intensificar el color de la pasta del queso, mejorando el aspecto estético del producto, aunque no modifica las características organolépticas.
- ★ Cloruro de calcio: repone el calcio iónico perdido durante el calentamiento, de modo de permitir la unión entre las submicelas, produciendo la floculación de las mismas; lo que aumenta el rendimiento y la retención de la materia grasa.
- ★ Nitrato de sodio: ya no es tan utilizado porque se ha confirmado su carcinogéncia; se usa para aquellos quesos de larga maduración como conservante.
- ★ Fermento: otorga acidez, lo que conserva el producto, favorece a la coagulación y contribuye a las características organolépticas. Los mas utilizados son: *S. thermophylus*, *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diaceticus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. citrovarum*. También están aquellos fermentos especiales como *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, entre otros. A la hora de elegir el fermento a usar se debe tener en cuenta el tiempo de fermentación, el sabor y aroma que se quieren lograr en el queso (proteólisis), la temperatura de elaboración y las condiciones de conservación del queso.

-
-
- ★ **Coagulante:** consta de un concentrado de enzimas que hacen a la formación del coagulo por su acción proteolítica. Existe una gran variedad de coagulantes: bovinos, microbianos y genéticos.

1.2.4.2.3 Maduración de la leche en la tina: se ajustan los parámetros de temperatura y pH de modo de permitir que actúen las enzimas del coagulante, llevando a la formación de la cuajada.

1.2.4.2.4 Tratamiento de la cuajada: en este paso se define la humedad del queso y las características de la masa:

- ★ **Lirado:** aumenta la superficie de salida del suero, facilita el calentamiento uniforme y ayuda a la firmeza del grano.
- ★ **Agitación:** permite mantener el grano de cuajada dividido, facilita el desuerado y calentamiento uniforme.
- ★ **Calentamiento:** acelera la salida del suero y favorece a la producción de ácido.

Cabe destacar que el proceso de desuerado lleva consigo a todos aquellos componentes que se encuentran en solución, tales como iones de calcio, cloro y potasio, la lactosa y proteínas como la β -Lactoglobulina y la α -Lactoalbúmina; por lo que constituye un desecho de la industria quesera con alto valor nutritivo. Es por eso que, en algunos casos el suero es reutilizado, ya sea para la producción de queso ricota, o para transformarlo en polvo, el cual es utilizado como aditivo para muchos alimentos.

1.2.4.2.5 Prepensado: sirve para unir los granos de cuajada y eliminar el suero.

1.2.4.2.6 Moldeado: le da la forma y el tamaño característicos del queso.

1.2.4.2.7 Prensado: se realiza con el objetivo de lograr una buena unión entre los granos, eliminar el suero y darle forma al queso.

1.2.4.2.8 Salado: los métodos y parámetros del salado van a depender del tipo, tamaño y humedad de queso que se trate, aunque generalmente se utiliza la salmuera. Este proceso implica sumergir un tiempo determinado (días) los quesos en piletones con una solución saturada de sal, de modo que ésta, por el proceso de ósmosis, tiende a entrar en el queso. El salado contribuye en el sabor, conservación al retrasar el desarrollo de microorganismos, selección de la flora microbiana, mejoramiento de la firmeza y formación de la cascar. Representa uno de los puntos críticos en la elaboración de quesos, ya que si no se encuentra en las condiciones adecuadas, puede llegar a contaminar los quesos, por lo que su aptitud microbiológica es importante.

1.2.4.2.9 Maduración: es el conjunto de cambios que sufre la cuajada a través del tiempo y dan como consecuencia el color, los aromas, la textura y los sabores de cada variedad. Estos cambios son específicos para cada tipo de queso, por eso las condiciones para la maduración van a depender de esto. (32)

1.3 AGUA

El agua constituye uno de los componentes distintivos de nuestro planeta, alrededor del 70% de la superficie de la Tierra está ocupada por agua. Es indispensable para todas las formas de vida, sin ella, el fenómeno de la vida no hubiera ocurrido. Esta fuerte y total dependencia hacia el agua se refleja en el hecho de que los seres vivos están, mayoritariamente, formados por agua. A su vez representa un factor crítico en la historia de la humanidad ya que la agricultura, la ganadería y todos los procesos productivos de bienes y servicios dependen directa o indirectamente de ella. (16)

En el caso de las zonas rurales y las industrias lácteas, principales lugares de donde provinieron las muestras, la más importante fuente de agua es de tipo freática, o también llamada de napa subterránea; ésta es la primer capa de agua subterránea que se encuentra al realizar una perforación y también la más susceptible a la contaminación. La profundidad de dicha napa varía con el medio geológico, comprendiendo desde algunos centímetros hasta varias decenas de metros, según la región.

Los principales agentes contaminantes provienen de instalaciones cloacales domiciliarias precarias o mal construidas y de vertido de efluentes industriales. En muchas zonas y debido a intensas y sostenidas precipitaciones, esta capa puede ascender, llegando al nivel de los depósitos cloacales o casi a nivel de superficie difundiendo masivamente los contaminantes que porta. Por esto se encuentra muy expuesta a la contaminación no solo físico-química, sino también microbiológica. (33)

El agua de uso en la industria debe cumplir la normativa establecida en el Código Alimentario Argentino, resultando importante su aptitud de modo de no contaminar los productos elaborados, maquinarias, utensilios, etc.

2. HIPÓTESIS:

Leches de buena calidad microbiológica inciden directamente en la inocuidad de los productos lácteos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

3.1.1 Realizar un estudio de la calidad microbiológica de leche cruda y productos lácteos procesados por establecimientos fabriles de las cuencas lecheras villamarience, santafecina y bonaerence.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1 Análisis microbiológico de leche de cuartos mamarios bovinos para la identificación de patógenos productores de mastitis.

3.2.2 Recuento de bacterias mesófilas aerobias totales, coliformes, y de microorganismos involucrados en el procesamiento y deterioro de los alimentos en muestras de leche cruda y pasteurizada.

3.2.3 Determinación de microorganismos marcadores en derivados lácteos.

3.2.4 Examen microbiológico de la calidad higiénico-sanitaria del agua.

3.2.5 Análisis de la aptitud microbiológica de fermentos.

4.1 MÉTODOS

4.1.1 ANALISIS REALIZADOS A LAS MUESTRAS DE LECHE Y DERIVADOS LÁCTEOS

4.1.1.1 TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO

La prioridad en el examen microbiológico de cualquier alimento es que el muestreo, la recolección, el envío al laboratorio y la preparación para el análisis sean adecuados. Para ello, el laboratorio suministró al cliente la información necesaria para que la muestra resulte representativa del lote, y conservada correctamente, de modo de prevenir la destrucción o multiplicación de los microorganismos.

A cada muestra dentro del laboratorio se le asignó un número de identificación unívoco, correspondiéndole una planilla donde figuraron los siguientes datos:

- ★ Propietario
- ★ Fecha de proceso
- ★ Profesional
- ★ Domicilio
- ★ Finalización del proceso
- ★ Especie
- ★ Cantidad de muestras

Una vez que se recibieron las muestras en el laboratorio fueron conservadas en heladera a 4-6°C hasta el momento de su procesamiento.

4.1.1.2 PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LA MUESTRA PARA SU ANÁLISIS

- ★ Como diluyente general se utilizó agua de peptona al 0,1%
- ★ Preparación del homogenato y de las diluciones sucesivas: Se agitó vigorosamente la muestra en aquellos casos en los que fue líquida, tales como: leche fluida, salmueras, fermentos y yogur; se tomó una alícuota de 1 ml y se lo colocó en un tubo con 9 ml de diluyente, obteniéndose así, una dilución 10^{-1} . Se homogenizó y dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la reactivación de los microorganismos. Se tomó luego, 1 ml de la dilución 10^{-1} , previa agitación y se vertió en un tubo con 9 ml de diluyente, lográndose así una dilución 10^{-2} . Este último paso se repitió hasta obtener la dilución adecuada para la siembra.

Cuando los alimentos fueron de carácter sólido, tales como leche en polvo, se pesó 1 g de la misma y se la colocó en 9 ml del diluyente anteriormente mencionado, con lo que se diluyó la muestra 10 veces. Para el caso de los quesos, se pesó en esterilidad, en bolsas plásticas provistas comercialmente especiales para ello, $25 \pm 0,1$ g representativos de la muestra; luego se le

adicionó 250 ml del diluyente, obteniéndose así la dilución 10^{-1} . Se mezcló el contenido de la bolsa, mediante un homogenizador y se pipeteó 10 ml de la dilución 10^{-1} para colocarlo en un erlenmeyer con 90 ml de diluyente. Se obtuvo así la dilución 10^{-2} . Con las siguientes diluciones se prosiguió como fue descrito anteriormente para los alimentos de tipo líquidos.

4.1.1.3 DIAGNÓSTICO DE MASTITIS

Se tomó una ansada de la muestra de leche cruda y se sembró en superficie por estriado sobre una placa de agar sangre; se incubó 24-48 hs a 37°C , permitiendo así el desarrollo de los microorganismos presentes en la leche, e identificándolos de acuerdo a la morfología distintiva de las colonias.

En los casos necesarios se hizo a partir de la colonia un extendido y tinción para verificar el comportamiento frente al colorante.

Este análisis se llevó a cabo para la detección del o de los microorganismo/s causante/s de mastitis en vacas.

4.1.1.4 RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS

Metodología analítica FIL 100b: 1991

Recuento en Placa por Siembra en Profundidad

Se pipeteó en placas de Petri estériles por duplicado alícuotas de 1 ml de las diluciones preparadas previamente. Luego se vertió en las placas inoculadas 15 ml de PCA fundido y templado a $45-50^{\circ}\text{C}$. Se mezcló el inóculo de siembra con el medio de cultivo por movimientos de vaivén, en distintas direcciones, intercalándole movimientos rotatorios en ambos sentido.

Para realizar pruebas de esterilidad, se vertió la misma cantidad de medio de cultivo en placas en las que no se depositó inóculo, siendo estos controles de esterilidad tanto del medio de cultivo como de las placas.

Una vez solidificado el agar, se invirtieron las placas y se las incubó a 35°C , durante 24-48 hs.

Utilizando el contador de colonias, se contaron todas las placas que presentaron entre 10 y 300 colonias; para calcular el número de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos por mililitro de muestra.

4.1.1.5 FOSFATASA

La prueba se realizó a partir de un kit comercial fabricado por Mario A. Rivenson y la realización de la prueba se hizo en base a las especificaciones brindadas por el fabricante (Añasco 2641-1416- Bs. As. bioclub@yahoo.com)

Se colocaron en 2 tubos 1 ml de la muestra sin diluir, siendo uno de ellos el blanco del reactivo. A continuación se preincubó aproximadamente 5 minutos a 37°C , luego se le agregó a uno de los tubos una gota de sustrato, cuyo

componente es una solución de fenolftaleín mono fosfato tamponada en dietanolamina.

Se mezcló por suave agitación lateral y se incubó 10 minutos a 37°C. Luego se agregó a ambos tubos 1 gota de inactivador, y con posterioridad se le adicionó 1 gota de sustrato al tubo que constituyó el blanco de reacción.

El inactivador es una solución alcalina que detiene la reacción enzimática e intensifica el color de la fenolftaleína.

Se mezclaron ambos tubos por suave agitación lateral y se observó el resultado a simple vista.

Los resultados positivos se evidenciaron por la aparición de un color rosalila toda vez que la actividad de la fosfatasa alcalina presente en la muestra excedió el umbral o límite para el que se ha calibrado el ensayo. Los positivos débiles se apreciaron mejor por comparación con el blanco de reactivo, aunque no fue indispensable.

El fundamento de la técnica es que la leche cruda tiene una elevada actividad de fosfatasa alcalina, que se destruye por la pasteurización. Por lo tanto, debe controlarse este proceso valorando la actividad de dicha enzima en la muestra a investigar; la fosfatasa alcalina es capaz de hidrolizar el fenolftaleín monofosfato del sustrato liberando fenolftaleína.

Características: la fenolftaleína es lila al pH de la reacción, y este color se intensifica al agregar el inactivador por elevación del pH.

La turbidez del medio no impide la visualización de los resultados.

Se puede detectar un 0,3% de leche cruda en la leche pasteurizada, sensibilidad que es posible aumentar variando el tiempo de incubación.

4.1.1.6 RECuento DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES

En placa

A partir de las diluciones preparadas y previa homogeneización, se pipeteó 1 ml de cada una por duplicado, en placas de Petri. Se agregaron 15 ml del medio Mc Conckey temperado a 45°C, a cada una de las placas con las diluciones y a una placa control. Se mezclaron las diluciones con el medio, rotando cuidadosamente las placas para luego dejar solidificar, se invirtieron las placas e incubaron a 35°C durante 24-48 hs.

Se contaron las placas que tuvieron entre 30 y 200 colonias. El resultado se expresó como número de coliformes en U.F.C. por ml de muestra.

4.1.1.7 RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS

Se sembró 1 ml de cada una de las diluciones en placas y se adicionó luego el medio de cultivo selectivo para permitir el desarrollo de estos, tal como Agar Glucosa Cloranfenicol (Biopakar), y se incubaron las placas a 22-25° C durante 3-5 días. El resultado se expresó en U.F.C./ml de muestra.

4.1.1.8 RECuento DE ANAEROBIOS SULFITO REDUCTORES

Caja invertida

Se colocó 1 ml de las diluciones en la tapa de la caja de Petri, y se agregó luego el medio fundido agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina; la caja de Petri se rotó permitiendo una mezcla homogénea, y se le colocó encima la base de la caja; se incubó a 37°C durante 24-48 hs. Se contaron las colonias negras sulfito reductoras, expresando los resultados como Anaerobios Sulfito Reductores por ml de muestra

4.1.1.9 RECuento DE PSICRÓFILOS

El procedimiento realizado fue el mismo que en el caso de Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas, sólo que para este caso la incubación se realizó a 6°C durante 7-10 días; expresando los resultados como Bacterias Aerobias Psicrófilas en U.F.C./ml.

4.1.1.10 RECuento DE TERMODÚRICOS

Una vez obtenida la dilución deseada, se prosiguió a incubarla en baño maría durante 10 minutos, a 60°C. Transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de 1 ml y se sembró en profundidad en una caja de Petri, usándose como medio de cultivo el PCA. Se incubó durante 48 hs a 30°C. Los resultados se expresaron como Recuento de Microorganismos Termodúricos en U.F.C./ml.

4.1.1.11 RECuento DE *Staphylococcus sp*

Este análisis fue realizado por expreso pedido del cliente solo a leches en polvo, en todos los casos.

Se tomó 1ml de la primera dilución y se la inoculó en cajas de Petri, agregando luego el agar de Baird-Parker fundido y templado a 45°C, junto con la yema de huevo y el telurito. Las placas invertidas se incubaron a 30°C durante 48 hs. Se observaron colonias de color de negro y brillantes.

Se contaron aquellas placas que contenían entre 30 y 200 colonias; los resultados se expresaron como Recuento de *Staphylococcus sp* en U.F.C./ml.

4.1.2 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUA

4.1.2.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS MESÓFILAS VIABLES

Se sembró 1 ml de la muestra en cajas de Petri y luego les agregaron 15 ml de agar PCA, realizándose movimientos rotatorio y de vaivén para lograr una

distribución uniforme de la muestra y de las bacterias que pudiera contener, obteniéndose colonias aisladas y fáciles de contar. Se dejó solidificar y se colocó en estufa a 30°C durante 48 hs. Se contaron luego las placas que contenían entre 30 y 300 colonias, informándose los resultados como Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) por mililitro.

4.1.2.2 RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES

Técnica de Número Más Probable.

Se colocaron 10 ml, 1 ml y 0,1 ml de la muestra de agua en tubos (por triplicado) conteniendo cada uno de ellos 10 ml de Caldo Verde Brillante, con campana de Durham. Se incubó a 30°C durante 48 hs. Se leyeron como tubos positivos todos aquellos en que se evidenció la presencia de gas en la campana, desplazando el medio de cultivo de su interior y luego con la ayuda de una tabla de Número Más Probable se calculó el número de microorganismos coliformes presentes por ml de muestra.

4.1.2.3 RECUENTO DE COLIFORMES FECALES A 45°C

De los tubos que se contaron como positivos en el recuento anterior, se realizó repiques en otros tubos de Caldo Verde Brillante, los cuales fueron colocados a incubar en baño maría a 45°C durante 24 hs. El criterio de lectura tiene el mismo fundamento que para el caso anterior, al igual que la expresión de los resultados.

4.1.2.4 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE *Escherichia coli*

A los tubos cuya determinación anterior fue positiva, se les realizó las pruebas I.M.Vi.C, utilizando para ello un kit comercial (Entero test – laboratorios Britania-).

4.1.2.5 RECUENTO DE *Pseudomonas aeruginosa*

Se tomó una alícuota de 1 ml de la muestra y se la sembró en profundidad, para lo cual se utilizó como medio de cultivo Agar Cetrímide. Se incubó a 30 °C durante 48 hs. y se contaron aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, informándose como recuento de *P. aeruginosa* por ml de muestra.

4.2 MATERIALES

4.2.1 AGAR SANGRE

Se extrae sangre a terneros de escasos días, y sin enfermedad aparente; esta sangre es guardada en las bolsas de extracción en heladera a 5° C hasta su uso.

Sangre de ternero	15 %
PCA	85%

Se prepara directamente en la placa de Petri, o en un erlenmeyer con PCA fundido, siempre conservando las condiciones de esterilidad.

4.2.2 DILUYENTE

Peptona de carne	1 g/l
Agua destilada	1 l

pH= 7.0 +/- 0.2

4.2.3 AGAR PARA RECUESTO EN PLACA (PCA)

Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	2.5 g/l
Glucosa	1 g/l
Agar-agar	12 g/l

pH= 7.0 +/- 0.2

4.2.4 AGAR MC CONKEY

Peptona pancreática de gelatina	17 g/l
Triptona	1.5 g/l
Peptona de carne	1.5 g/l
Lactosa	10 g/l
Sales biliares	1.5 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l
Rojo neutro	0.03 g/l
Cristal violeta	0.001 g/l
Agar-agar	13.5 g/l

pH= 7.1 +/- 0.2

4.2.5 AGAR GLUCOSA CLORANFENICOL

Extracto de levadura	5 g/l
----------------------	-------

Glucosa	20 g/l
Cloranfenicol	0.1 g/l
Agar-agar	15 g/l

pH= 6.6 +/- 0.2

4.2.6 SULFITO POLIMIXINA SULFADIACINA (SPS)

Peptona de caseína	15 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Citrato de hierro (III)	0.5 g/l
Sulfito sódico	0.5 g/l
Polimixina B sulfato	0.01 g/l
Sulfadiacina sódica	0.12 g/l
Agar-agar	13.9 g/l

pH= 7.0 +/- 0.1

4.2.7 BAIRD PARKER

Triptona	10 g/l
Extracto de carne	5 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Piruvato de sodio	10 g/l
Glicina	12 g/l
Cloruro de litio	5 g/l
Agar-agar	15 g/l
Yema de huevo con telurito	

pH= 7.2 +/- 0.2

4.2.8 CALDO LACTOSA BILIS VERDE BRILLANTE

Triptona	10 g/l
Lactosa	10 g/l
Verde brillante	0.0133 g/l
Bilis	20 g/l

4.2.9 AGAR CETRIMIDE

Peptona de gelatina	20 g/l
Cloruro de magnesio	1.4 g/l
Sulfato de sodio	10 g/l
Cetrimide (N-acetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro)	0.3 g/l
Agar-agar	13 g/l

pH= 7.2 +/- 0.2

5.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Se analizaron un total de 1656 muestras de leche cruda, pasteurizada y productos lácteos durante un período de cuatro meses, desde Agosto hasta Noviembre del año 2005.

Dicho trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de diagnóstico veterinario LABVIMA en la ciudad de Villa María, dirigido por Cesar y Heraldo Bonetto en virtud de pasantía ofrecida por dicho laboratorio.

El origen de las muestras analizadas se observan en la siguiente tabla:

ORIGEN	NÚMERO DE MUESTRAS
Leche cruda	1227
Leche pasteurizada	44
Leche en polvo	74
Fermento	137
Yogurt	7
Queso	11
Suero	11
Salmuera	107
Agua	38

Tabla 4: origen de las muestras analizadas.

5.2 ANÁLISIS DE LECHE CRUDA

5.2.1 DIAGNÓSTICO DE MASTITIS

Se analizaron 1037 muestras de leche cruda con el objetivo de evaluar la presencia de microorganismos causantes de mastitis e identificarlos. Estos agentes habitan la ubre y sus alrededores, diseminándose desde los animales enfermos hacia otros sanos, por lo que es común que el contagio se produzca en la sala de ordeño.

5.2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS AISLADAS

El diagnóstico presuntivo se realizó por medio del análisis de las características morfológicas de las colonias desarrolladas en Agar Sangre.

- ★ **5.2.1.1.1 *Staphylococcus*:** colonias de color crema o amarillento, con un diámetro de 3 mm, hemólisis alfa y/o beta que se observa como un halo transparente alrededor de la colonia. A estas colonias se les realizó la prueba de la coagulasa para determinar si se trataba de *S. aureus* o coagulasa negativos.
- ★ **5.2.1.1.2 *Streptococcus*:** las colonias se observaron de pequeño tamaño, convexas, traslúcidas en forma de gotas de rocío, rodeadas de una zona de hemólisis alfa de color verdoso o una estrecha zona de hemólisis beta clara.

En la siembra con agar sangre esculina, se pudo identificar a *S. uberis* que produjo hidrólisis de la misma, observándose el sector de la placa sembrada de color marrón.

★ **5.2.1.1.3 Coliformes:** estas bacterias en agar sangre desarrollaron en forma de colonias grandes de color grisáceo. En el caso de *Enterobacter sp.* y *Klebsiella sp.*, fueron de tamaño similar, de color verde amarronado y aspecto mucoso.

★ **5.2.1.1.4 Corynebacterium:** se observaron en las placas como pequeñas colonias blancas opacas y por lo general sin hemólisis.

★ **5.2.1.1.5 Bacilos Gram positivos:** se visualizaron como colonias planas, secas, rugosas de bordes irregulares y de color blanco o crema.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.

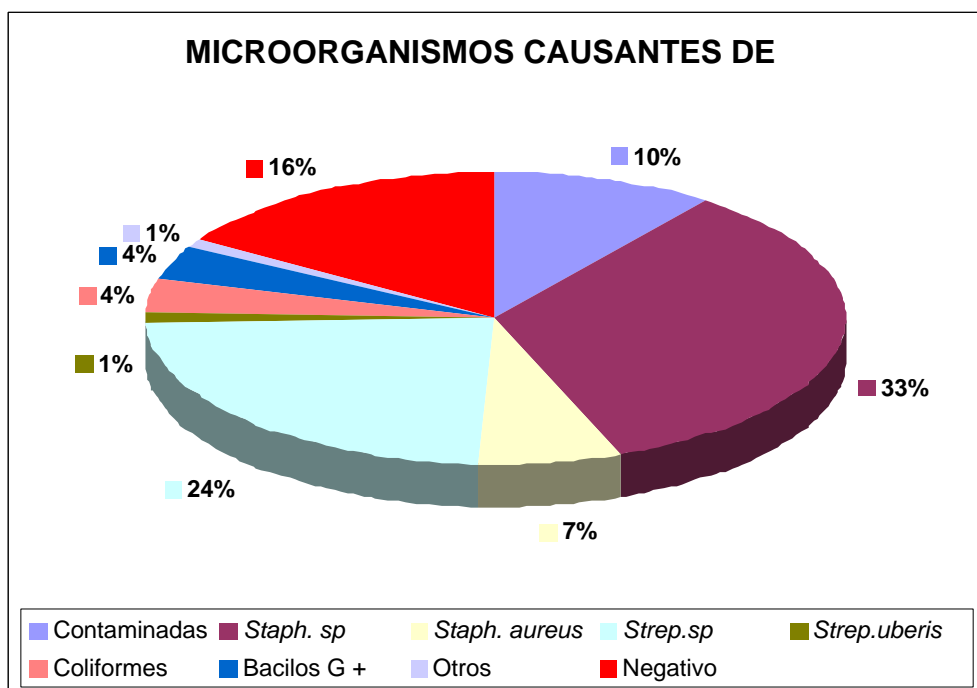


Figura 7: Porcentaje de microorganismos causantes de mastitis aislados de leche cruda.

Se aislaron microorganismos en el 84% de las muestras analizadas. Los patógenos primarios más importantes resultaron ser *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.* Estos resultados coinciden con los informados por otros autores que mencionan que “la mastitis a *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.* es la más importante de las enfermedades que afectan a las vacas lecheras de alta producción.” (11; 25)

Dentro de los microorganismos menos significativos se encontraron *Corynebacterium sp.*, aislado en 5 muestras, y *Streptococcus uberis*, en 12.

En el 16% de las leches provenientes de bovinos con signos clínicos evidentes, no se pudo aislar el microorganismo causante, lo cual puede deberse a:

1. Los microorganismos pudieron encontrarse en una cantidad menor del mínimo para su detección.

2. El microorganismo ya no estaba presente en la ubre y la mastitis fue resultado de toxinas, tales como las endotoxinas de los coliformes.
3. El tratamiento antibiótico pudo haber destruido o inhibido a los microorganismos a niveles por debajo del mínimo de detección.
4. Las células somáticas pudieron haber fagocitado a los microorganismos.
5. Las condiciones de cultivo para el microorganismo causante de la mastitis no debieron ser las óptimas.

5.2.2 RECUENTO DE BACTERIAS TOTALES

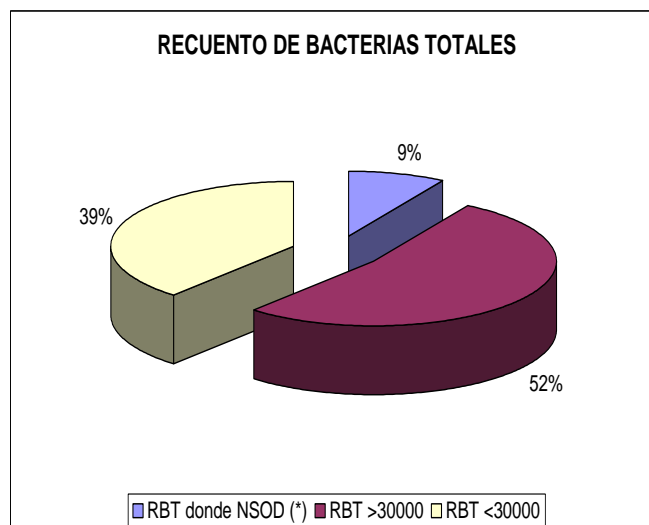
Según el Código Alimentario Argentino (C.A.A.), en su artículo 558: “La leche entera pasteurizada”, deberá responder a las siguientes exigencias:

a) Estar exenta de gérmenes patógenos. Esta exigencia no se dará por cumplida si presenta:

- ★ Recuento total en placa: mayor de 50000 bacterias mesófilas/cm³ en los meses de Abril a Septiembre inclusive y mayor a 100000 por cm³ en los meses de Octubre a Marzo inclusive.
- ★ Bacterias coliformes (Recuento en placa con agar-violeta-rojo-bilis): no mayor de 50/cm³.
- ★ *Echerichia coli*: Presencia en 1 cm³ (confirmado por pruebas bioquímicas)
- ★ Prueba de la fosfatasa: Positivo.

Según el criterio establecido por el laboratorio donde se efectuó este estudio, todas las muestras de leches crudas y pasteurizadas se diluyeron con un factor de 100 (10⁻²). Esta dilución no resultó suficiente para determinar con exactitud el número de bacterias totales, pero sí para clasificar las leches en dos grupos: las que presentaron recuentos mayores a 30000 UFC/ml y las que contenían menos de 30000 UFC/ml.

Los resultados obtenidos para las 94 muestras analizadas se observan en el siguiente gráfico:



(*): No se observa desarrollo.

Figura 8: Recuento de bacterias totales en leches.

Además, a 44 de las 94 muestras analizadas para el Recuento de bacterias totales se les determinó también la prueba de la fosfatasa, la cual mostró que sólo 27 muestras, representado el 57%, habían recibido una adecuada termización (figura 9). Esto demuestra problemas en la puesta a punto del pasteurizador, extendiendo dicho problema en todas las líneas de procesamiento, obteniéndose productos adulterados, con alta carga microbiológica y características organolépticas indeseables.

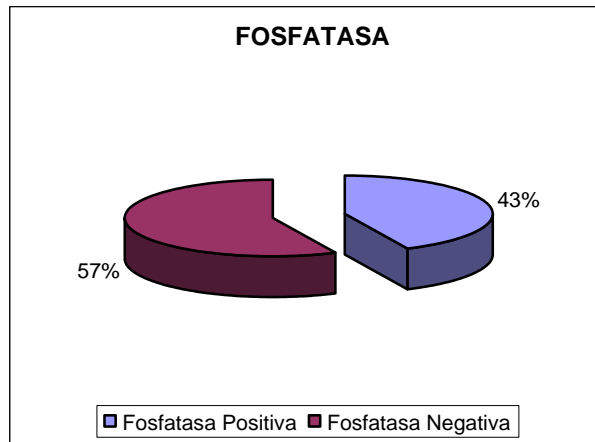


Figura 9: Valores porcentuales de la prueba de la Fosfatasa en leches pasteurizadas.

5.2.3 RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES

Se analizaron un total de 116 muestras, de las cuales 45 no presentaron crecimiento de coliformes totales, mostrando una buena aptitud microbiológica, 25 de las muestras presentaron un desarrollo menor o igual a 1000 y en 46 leches un crecimiento mayor 1000 UFC/ ml.

Si bien no se pudo establecer la aptitud de acuerdo a lo señalado en el C.A.A., tampoco fue posible determinar el origen ni el fin de estas leches, lo que implica que como los recuentos fueron altos éstas pudieron haber sido reprocesadas o para el caso de las leches crudas pasteurizadas por primera vez. Cabe aclarar que en muchos casos las industrias realizan análisis microbiológicos a las leches para decidir su destino a las distintas producciones, de acuerdo a los valores obtenidos.

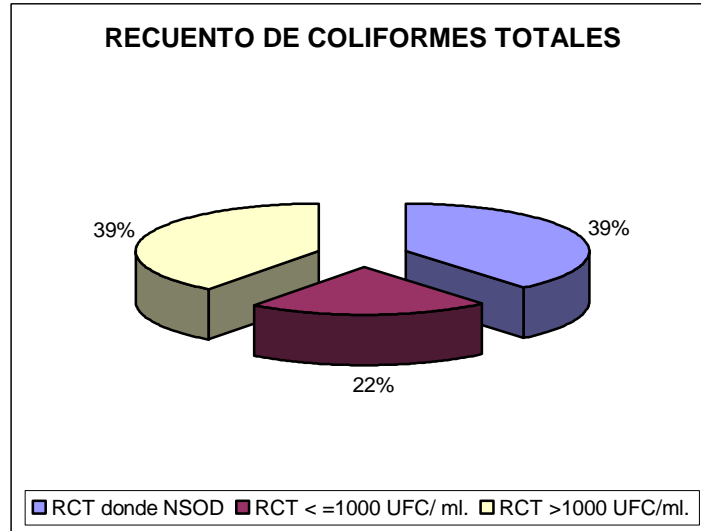


Figura 10: Valores porcentuales de coliformes en leche.

5.2.4 RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS

Se analizaron un total de 24 muestras de leche cruda, de las cuales 19 no presentaron desarrollo de microorganismos psicrófilos y en solo 5 de ellas se logró el aislamiento de este grupo de bacterias incubadas a 5°C. Los resultados obtenidos se observan en la figura 11:



Figura 11: Porcentaje de aislamientos de psicrófilos en leche cruda.

Estos valores muestran una buena aptitud general de la leche con respecto al recuento de bacterias psicrófilas. Esto resulta alentador debido a la importancia

que tiene este grupo de microorganismos en la industria de los alimentos conservados por frío.

5.2.5 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS

Se analizaron 116 muestras de leches crudas, el 90% de las mismas mostraron crecimiento de microorganismos capaces de desarrollar a altas temperaturas. Estos resultados pueden visualizarse en la figura 12.

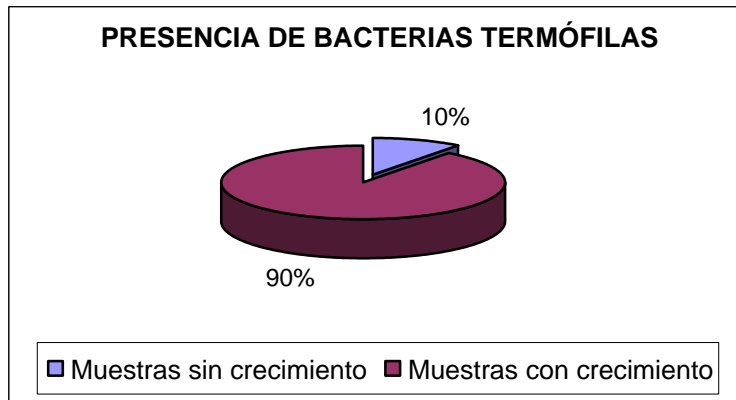


Figura 12: Determinación de microorganismos termófilos en leche cruda.

El análisis de los datos revela que si bien se trató de muestras de leche cruda, la materia prima que ingresó al pasteurizador estaría altamente contaminada.

5.2.6 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS

Se analizaron 86 leches crudas, entre las cuales sólo 6 presentaron este grupo de microorganismos. El fundamento del análisis cualitativo es que cuando están presentes, independientemente de su concentración en la muestra, producen formación de espuma o burbujas de gas en los productos de derivados. Los resultados se observan en la figura 13.

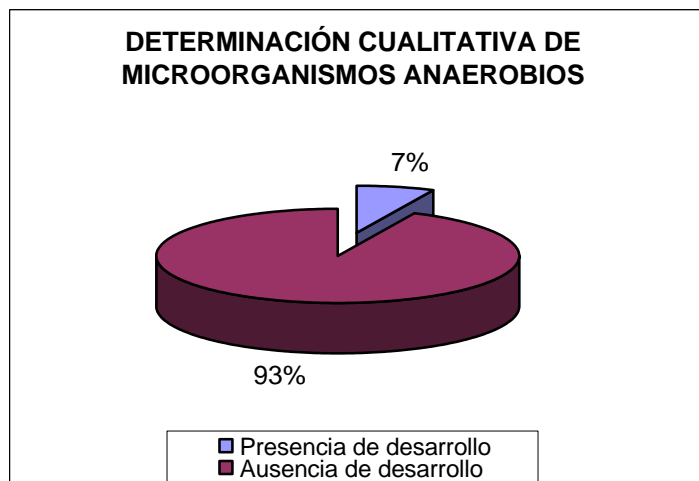


Figura 13: Determinación de microorganismos anaerobios en leche cruda

5.3 ANÁLISIS DE LECHE EN POLVO

5.3.1 DETERMINACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS*

Se analizaron un total de 74 muestras de leche en polvo que ingresaron al laboratorio con el fin de determinar la presencia *Staphylococcus sp.*, los resultados obtenidos se observan en la figura 14.

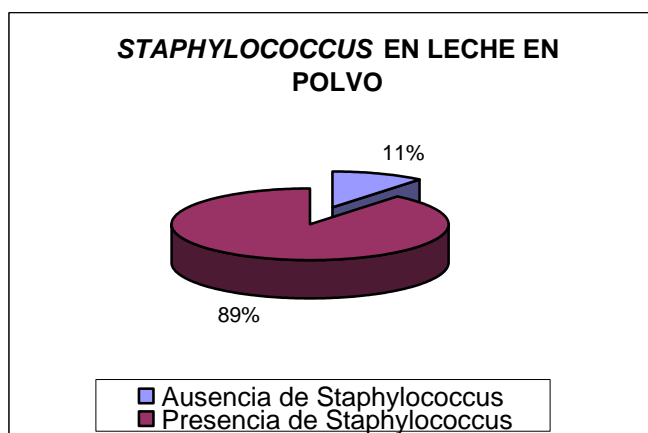


Figura 14: Análisis de *Staphylococcus sp.* en leche en polvo.

El Código Alimentario Argentino en su artículo 567(Res.2270, 14.9.83) especifica que para que las leches en polvo sean aptas para el consumo humano deben cumplir con las siguientes exigencias microbiológicas:

Deberá estar exenta de gérmenes patógenos. Esta exigencia se dará por no cumplida si presenta:

- ★ Recuento total en placa: Mayor de 30000 bacterias por Kg.
- ★ Bacterias coliformes (recuento en placa con medio Agar- violeta- Rojo- Bilis): Mayor de 50/gr.

-
- ★ *E. coli*: Presencia en 5 gr. Deberá ser confirmada por pruebas bioquímicas.
 - ★ *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo: Presencia en 0,1 gr.
 - ★ *Salmonella spp*: presencia en 100 gr.
 - ★ Prueba de la fosfatasa positiva.
 - ★ Hongos y levaduras: Máximo: 100/gr.

Si bien las solicitudes de los clientes sólo se remitieron a la búsqueda de *S. aureus*, los valores obtenidos revelan una calidad higiénica deficiente ya que se trata de un producto terminado del cual se aisló un patógeno productor de E.T.A (Enfermedad Transmitida por Alimentos) como lo es *S. aureus*.

5.4 FERMENTO

Se analizaron un total de 137 muestras constituidas por fermentos o mix de leche con el agregado de fermento, a las cuales se les realizaron las determinaciones de coliformes totales, hongos y levaduras. Los resultados se analizaron en primer lugar por separado, determinando el agente contaminante más predominante en este tipo de muestras y luego en conjunto, de modo de conocer cuántas fueron las muestras con buena calidad microbiológica. Si bien los fermentos están constituidos por una mezcla de bacterias, estas son de tipo específicas y seleccionadas, dependiendo de las características que se desea obtener en el producto; por lo que hongos, levaduras y bacterias coliformes son considerados contaminantes.

5.4.1 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES

Se analizaron un total de 137 muestras, en 114 se aislaron coliformes totales; esto se observa en la figura 15.

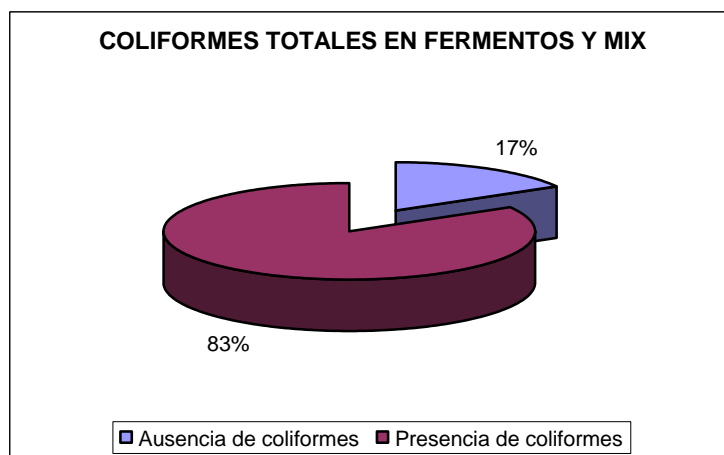


Figura 15: Análisis de coliformes totales en fermentos y mix.

La presencia de estos microorganismos en el fermento es indicativo de contaminación, la cual puede

ser propia del cultivo o por una incorrecta manipulación por parte de los operarios.

5.4.2 DETERMINACIÓN DE HONGOS Y LEVADURAS

En 121 muestras se aislaron hongos y levaduras; demostrando así que la contaminación con estos microorganismos predomina con respecto a la de coliformes. La figura 16 muestra el porcentaje de aislamientos de estos organismos.

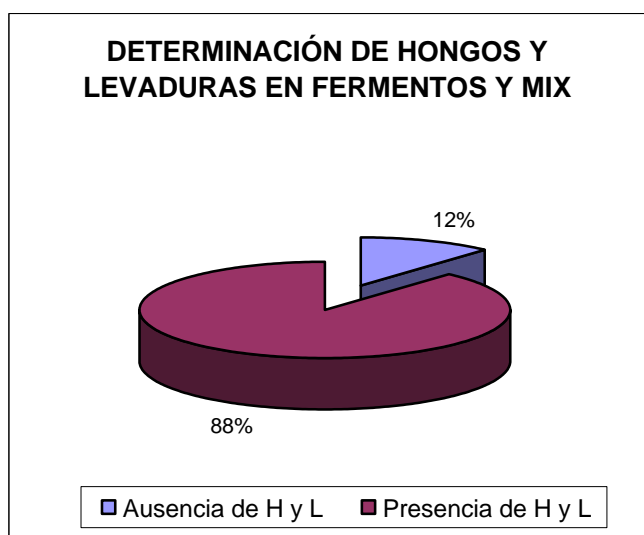


Figura 16: Presencia de hongos y levaduras en muestras de fermento y mix.

5.4.3 DETERMINACIÓN DE MUESTRAS CONTAMINADAS

De las 137 muestras analizadas, un 65% presentaban contaminación por coliformes u hongos y levaduras; lo que determina una carencia de calidad higiénica-sanitaria, la que puede deberse por malas condiciones de almacenamiento del fermento o por la contaminación de la leche utilizada en el mix.

La calidad higiénica de este producto es importante ya que los procesos metabólicos realizados por las bacterias que contiene, son los responsables de las distintas características organolépticas que los derivados lácteos presentan.

En la figura 17 se observa los porcentajes de muestras contaminadas

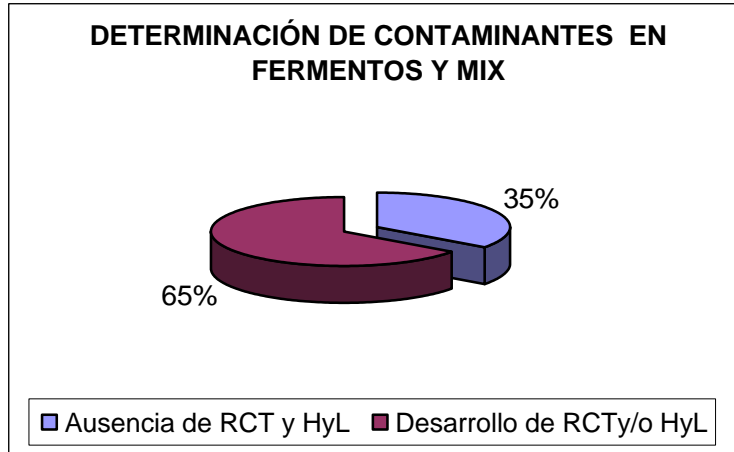


Figura 17: Fermentos y mix contaminados por coliformes, Hongos y Levaduras.

5.5 YOGUR

Se analizaron 7 muestras de yogur.

El criterio microbiológico establecido por el Código Alimentario Argentino para este producto es:

- ★ coliformes a 30°C: menor o igual a 100 UFC/ gr.
- ★ coliformes a 45°C: menor o igual a 10 UFC/ gr.
- ★ hongos y levaduras: menor o igual a 200 UFC/ gr.

De las 7 muestras analizadas 2, no cumplieron con lo establecido por el Código, una por un alto recuento de coliformes a 30°C y otra porque el recuento de hongos y levaduras superó el límite establecido. Así mismo, en ninguna de las muestras se determinó el recuento de coliformes a 45°C, por lo que no se pudo establecer un criterio adecuado de aptitud para consumo.

En la figura 18 se observa estos datos expresados en porcentajes.

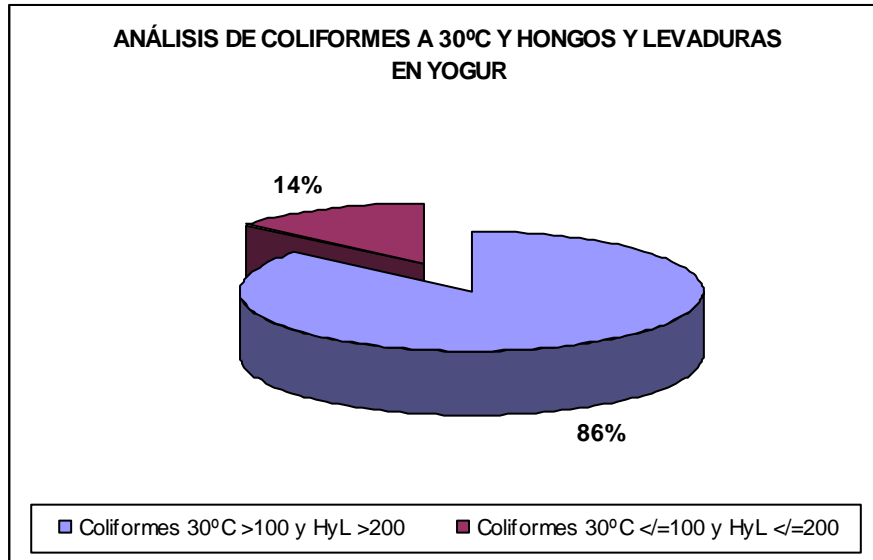


Figura 18: Muestras de yogur que cumplen con lo establecido en el C.A.A. para el recuento de coliformes a 30°C, hongos y levaduras.

5.6 QUESO

Según el Código Alimentario Argentino en su Resolución 110/95 establece como criterio microbiológico para quesos de alta humedad:

- ★ Coliformes a 30°C: 1000/gr
- ★ Coliformes a 45°C: 500/gr
- ★ *Staphylococcus coagulasa* positivo: 100/gr
- ★ *Salmonella*: 0/25 gr
- ★ *Listeria monocitógenes*: 0/25 gr

Se analizaron un total de 11 muestras de quesos, todos ellos considerados según el C.A.A. como de alta humedad. De las determinaciones exigidas por el Código los clientes sólo solicitaron recuentos de coliformes a 30°C, hongos y levaduras. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20.

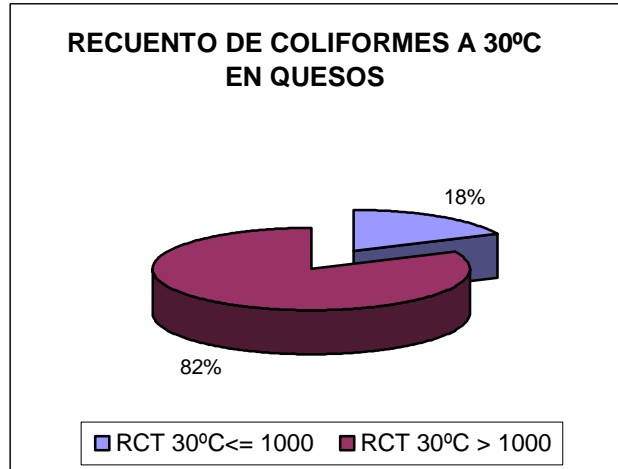


Figura 20: Porcentaje de muestras con recuentos de coliformes a 30°C.

Nueve muestras presentaron desarrollo de coliformes totales indicando malas condiciones higiénicas de elaboración.

5.7 SUERO

Se analizaron 11 muestras de suero de leche. Se les determinó coliformes totales, hongos y levaduras. En 4 de las muestras se observó desarrollo de estos tipos de microorganismos.

Al ser el suero un producto de la elaboración de quesos, la presencia de estos indicadores están mostrando deficiencias higiénicas en la elaboración. Además, considerando que el suero puede usarse como materia prima para la producción de otros alimentos, debe cuidarse su calidad microbiana.

5.8 SALMUERA

Se determinó la presencia de coliformes totales, hongos y levaduras en 107 muestras de salmuera. Sesenta y una de las muestras presentaron contaminación con algún tipo de microorganismos, 24 (39%) con coliformes totales y 53 (50%) con hongos y levaduras.

La solución sobresaturada de sal, impediría el desarrollo de cualquier tipo de microorganismos, sin embargo se han encontrado contaminaciones, que podrían deberse a la falta de higiene por parte de los operarios que manipulan la salmuera al colocar y retirar los quesos durante el proceso de salado o provenir del ambiente. Otro factor influyente podría ser las insuficientes concentraciones de sal como para inhibir el desarrollo microbiano.

5.9 AGUA

Se analizaron 38 muestras de agua para determinar su aptitud de consumo o para el lavado de máquinas y utensilios. Solo 14 cumplieron con los requisitos de potabilidad, mientras que las restantes 24 no fueron aptas debido a que presentaron *E. coli*, *Pseudomonas* o recuentos de coliformes totales mayores a lo permitido. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.

Nº DE MUESTRAS	PORCENTAJE (%)	MIROORGANISMOS
7	18	<i>E. coli</i>
11	29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20	53	Coliformes totales

Tabla 5: Resultado de los análisis de las muestras de agua.

Como puede observarse, un elevado porcentaje de muestras no cumplieron con la normativa de calidad microbiológica para agua potable, requisito indispensable para su utilización en la industria.

Coliformes y *E. coli* resultan indicadores de contaminación por materia fecal, ya que los sistemas de extracción de agua están cerca de los de eliminación de excretas, de modo que representan una potencial fuente de contaminación, transmitiéndose a los productos que se elaboran.

6. CONCLUSIONES

6.1 Los principales microorganismos aislados del diagnóstico de mastitis a partir de leche cruda fueron *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.*

6.2 El 48% de las leches crudas analizadas presentaron recuentos de bacterias totales inferiores a 30000 UFC/ml., indicando una buena calidad microbiológica.

6.3 De las leches sometidas a la prueba de la fosfatasa, el 57% mostró haber recibido una adecuada pasteurización.

6.4 Para el recuento de coliformes en leche cruda se vio que el 61% de las muestras presentaban recuentos inferiores a 1000 UFC/ml. revelando una buena calidad bacteriológica.

6.5 El 79% de las leches crudas no presentaron desarrollo de psicrófilos.

6.6 En el 90% de los casos se obtuvo desarrollo de bacterias termófilas en las muestras analizadas.

6.7 El estudio cualitativo de los microorganismos anaerobios mostró desarrollo en el 7%.

6.8 Los análisis realizados a las muestras de leche en polvo fueron insuficientes para determinar su aptitud para el consumo. El 89% de las muestras no presentó desarrollo de *Staphylococcus sp.*

6.9 El 65% de los fermentos analizados presentaron contaminación ya sea por coliformes o por hongos y levaduras.

6.10 De las muestras de yogur analizadas el 86% cumplieron con lo establecido el C.A.A para las determinaciones de coliformes a 30°C, hongos y levaduras, aunque estos estudios no resultan suficientes para determinar la aptitud para el consumo.

6.11 Para el recuento de coliformes a 30°C en muestras de queso, el 18% cumplió con lo que establece el Código.

6.12 El 44% de los sueros analizados no presentaron desarrollo ni de coliformes ni de hongos y levaduras.

6.13 Las muestras de salmueras analizadas no presentaron contaminaciones en el 43% de los casos.

6.14 El 37% de las aguas analizadas cumplieron con los requisitos de potabilidad; donde el 18% mostró desarrollo de *E. coli* y el 29% *Pseudomonas sp.*

7. BIBLIOGRAFIA

1. Acuña C. (1999). Medidas tendientes a disminuir los conteos bacterianos en establecimientos lecheros. Primer Simposio Internacional de Calidad de Leche y Mastitis. Grupo Agro-Veterinario (GAV), Trenque Lauque, Buenos Aires, Argentina, 3 y 4 de Noviembre de 1999.73-82.
2. Alais Ch. Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera. Cia. Editorial, S.A. de C.V., México. Cuarta edición .XIII fermentaciones gaseosas pag. 261. 1984.
3. Allore H. and Herb H. Partial budget of discounted annual benefit of mastitis control strategies. J. dairy Science. 81:2280-2292. 1998.
4. Bainotti AE, Carrasco de Mendoza MS, Simonetta AC (1990) Calidad microbiológica de la leche cruda II- Incidencia de enterobacterias, bacterias coliformes y *Staphylococcus aureus*. Revista Argentina de Lactología. Año II N°3. 15-28.
5. Bergey`s Manual for Systematic Bacteriology. 8th ed. Kloos W. & Schleifer J. Genus IV. P.A. Sneath Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.1986.
6. Buddle B. & Cooper G. Aspects of the epidemiology of bovine staphylococcal mastitis. New Zeal. Vet. J. 26:296-298. 1978.
7. Canals A. y Rosell. Organización colegial Veterinaria Española. Ciencias veterinarias. Enero 2002. Campylobacteriosis en aves de corral. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya. Veterinario Oficial Matadero de Aves Moré, S.A. (Argentina). www.colvet.es
8. Center for Food Safety & Applied Nutrition (2000) Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. 2001 Revision. Standards for Grade "A" Pasterized, Ultra-Pasteurized and Aseptically Processed Milk and Milk Products.61.
9. Corradi P y otros. Agroalimentos Argentinos II Crea. Industria Láctea. 97. Editorial: temas S.R.L
10. Da Silva W., Padilha da Destro M., & Landgraf M., Biochemical Characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. Braz. J. Microbiol. 31:103-108. 2000.
11. Frigerio C., Scalise I., Bettera S., Giraud J. & Calzolari A. Resistencia a antibióticos de cepas de esafilococos aisladas en tres tambos de la provincia de Córdoba. Rev. Med. Vet. 76:288-291.1995.

-
-
12. Garat M, Favale M, Basílico JC, Simonetta AC, Sbodio OA (1989) Calidad microbiológica de la leche cruda I – Incidencia de bacterias aeróbicas mesófilas, termodúricas y lácticas. Revista Argentina de Lactología. Año II N° 2. 39-50.
 13. Gil Turnes C. Mastitis subclínica. Estudio de una cuenca productora de leche del sur de Córdoba. Rev. Med. Vet. 58:167. 1977.
 14. Giraudo J. & Rampone A. Como producir leche de calidad para exportar. III Simposio Lechero Tandil. 57-69. 1996.
 15. González R.N. & Cullor J.S., Jasper D.E. y col. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Echerichia coli* vaccine. Can. J. Vet. Res. 53:301-305.1989.
 16. H. Curtis y N. Sue Barnes. Biología. Quinta edición (1999) Parte I, Sección 1, Cap 2: Agua.
 17. Heer G (1994). Calidad microbiológica de la leche cruda. INTA. Proyecto: Calidad Higiénico-Sanitaria de la Leche (PROCALE). Resúmenes de Jornadas Técnicas N° 4. 1-9.
 18. International Comission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganism in food I. Their significance and methods of enumeration. 2º Edition. Toronto. University of Toronto. 219-228. 1978
 19. Iribarren M. A.. Lechería: informe del sector primario. SAGPyA. Enero 2002. SAGPyA Cuencas lácteas argentinas. Apuntes Agroeconómicos - Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires- Características de la producción lechera Argentina.
 20. Klungel GH, Slaghius BA, Hogoveen H (2000) The effect of the introduction of automatic miking systems on milk quality. J Dairy Sci.83: 1998-2003
 21. Michel A. Wattiaux. Composición de la leche y valor nutricional. Instituto Babcock. University Wisconsin. Madison. www.babcock.wisc.edu
 22. Michanie S. AGA Tarjetas de las enfermedades: Escherichia coli. Revista de la Unión de la Industria Cárnica Argentina. Sept. 2003. Universidad de Belgrano. www.fao.org/ag
 23. Microbiología de los Alimentos, apuntes de la carrera de Microbiología. Universidad Nacional de Río Cuarto. 2005
 24. Minetti ML, Tercero EJ, Sbodio OA, Weidmann R, Coutaz R (1995) Proteólisis en leche de tambo. La alimetación Latinoamericana. N° 205. 61-65.

-
-
25. Puig de Centorbi O., Cuadrado A., Alcaráz L., Laciari A. & Milam M. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis subclínica bovina en tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. Rev. Arg. Microbiol. 24: 73-80. 1992.
 26. Reinheimer J.A. (1998). Bacterias Psicrotrofas. Su incidencia en la calidad de la leche y productos lácteos. Jornadas ALMAST`98- Calidad de leche y mastitis. Rafaela, Santa Fe, Argentina. 17, 18 y 19 de Septiembre de 1998. Memorias. 1-5.
 27. Reinheimer J.A., Candiotti M.C. (1994). Actividad y termoresistencia de enzimas exocelulares de bacterias psicrotrofas aisladas de leche cruda. La Alimentación Latinoamericana. N° 202. 39-46.
 28. Revelli G.R., Rodríguez C.G. (2001). Prevalencia de agentes etiológicos causantes de mastitis bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. Tecnología Láctea Latinoamericana. Año 6 N° 23. 48-53.
 29. Saran A. y Chaffer M. Mastitis y calidad de leche. Editorial INTER-médica. 2000.
 30. Saubois A, Basílico J.C., Simonetta A.C. (1991). Calidad microbiológica de la leche cruda III – Incidencia de bacterias esporuladas aerobias y anaerobias, levaduras y hongos. Revista Argentina de Lactología. Año III N° 5. 79-90.
 31. Taverna M.A., Calvino L.F., Canavesio V.R., Negri L.M., Páez R.B., Charlón V, Cuatrín A.L. (2001). Caracterización de la calidad higiénico-sanitaria de la leche producida en la cuenca lechera central de la Argentina. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol.21 Supl. 1:270-271.
 32. Tecnología de la leche III, apuntes de clases de la carrera Ingeniería en Alimentación. Instituto La Santísima Trinidad- Centro Universitario Mediterraneo-FUNESIL. 2004.
 33. Varnam A., Environmental microbiology, London, Manson. 2000.
 34. www.alimentosargentinos.gov.ar Producción Argentina de Leche. Serie anual.
 35. www.alimentosargentinos.gov.ar Sector lácteo. Ing. Agr, Aníbal Schaller- Dirección Nacional de Alimentos- Dirección de Industrias Alimentarias.
 36. www.food-info.net -seguridad alimentaria- *Listeria monocytogenes*.
 37. www.food-info.net -seguridad alimentaria- *Shigella spp.*

38. www.food-info.net -seguridad alimentaria- *Staphylococcus aureus*.

39. www.mecon.gov.ar