

DICNE  
9500

x

800258

### FECHA DE DEVOLUCION

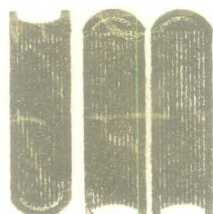
El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará 5.00 peso por cada día que pase. (11-013)

<del>16 NOV. 1978</del>		
<del>17 NOV. 1978</del>		
<del>2 NOV. 1978</del>		
<del>29 OCT. 1979</del>		
<del>2 NOV. 1979</del>		
<del>7 NOV. 1979</del>		
<del>15 NOV. 1979</del>		
<del>20 NOV. 1979</del>		
<del>24 SET. 1981</del>		
<del>9 NOV. 1981</del>		
<del>17 NOV. 1981</del>		
<del>29 NOV. 1989</del>		

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO EN  
LECHES PASTEURIZADAS

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL

QUE PRESENTA

MA<sup>10</sup>ALEJANDRA CHAIX PIER

EN OPCION AL TITULO DE  
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD  
EN ANALISIS CLINICOS

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1976

*Blanca Estela Lopez*

A MI INOLVIDABLE ABUELITA (†)  
por todo lo que de ella aprendí

A MIS PAPAS  
por el ejemplo que me han dado

A MI ASESOR  
Q.F.B. Blanca Silvia Garza F.

## I N D I C E

1.-	Introducción	1
2.-	Material y Métodos	10
3.-	Resultados	18
4.-	Discusión y Conclusiones	30
5.-	Resumen	39
6.-	Bibliografía	41

## INTRODUCCION

La leche es un alimento de origen animal muy importante en la alimentación humana, primordialmente durante la primera infancia, en donde se ha llegado a considerar como in substituible; así mismo es un componente indispensable en la dieta del hombre adulto.

La leche, según Ballarin es la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos y es la única sustancia cre ada por la naturaleza, con el solo propósito de servir de alimento a las crías de ellos, por contener una cantidad equilibra da de sustancias esenciales para su desarrollo y manutención.

(4)

La leche ha sido llamada con frecuencia el "alimento casi perfecto" debido a su extraordinaria composición; se presenta como una dispersión acuosa que contiene alguno de sus componentes disueltos (azúcares y sales), otros emulsionados (grasas o lípidos) y otros en estado coloidal (prótidos). Ade más, es una fuente importante de vitaminas; estas las encon



tramos distribuidas ya sea en la crema (liposolubles) o en el suero (hidrosolubles).

El valor biológico de las proteínas de la leche, entendiéndose por esto, la capacidad que tiene una proteína cualquiera, para substituir a la proteína del propio organismo humano, es superior al de cualquier otra de diferente origen, inclusive las de la carne, ya que contienen todos los aminoácidos necesarios para la alimentación humana. (4)

Dada la importancia de la leche como alimento, se hace estrictamente necesario un control sanitario de la misma, ya que la leche está expuesta a múltiples fuentes de contaminación con microorganismos procedentes del aire, del forraje, del equipo empleado durante su ordeña y transporte, de las manos y ropas de los trabajadores, así como algunos procedentes de la ubre o de la piel de la vaca. Este control sanitario se lleva a cabo mediante la determinación bacteriológica de la calidad de la leche, que tropieza con dos dificultades, primeramente, el hecho de que como señala J.G. Davis, la calidad bacteriológica de la leche es condición dinámica del producto,

mientras que la calidad química de la leche es condición estática, salvo como es natural, que no se hayan instaurado modificaciones microbiológicas profundas; además, existe la circunstancia de que los métodos puestos en práctica para el control bacteriológico no son tan exactos como los de índole física y química. (7)

De acuerdo con las reglas propuestas por United States Public Health Service (Servicio de Sanidad Pública de Estados Unidos de Norteamérica), la leche, según su población bacteriana, tiene distintos grados a saber:

	Recuento de colonias en placa no exederá de:		Recuento de bacterias coli formes no exederá de:
GRADOS	Leche cruda	Leche pasteurizada	Leche pasteurizada
A	200,000	30,000	10
B	1000,000	50,000	10
C	Sin límite	Sin límite	Sin límite
Certificada	10,000	500	1
	POR MILILITRO		

Los valores reglamentarios para México son:

- a) Leche certificada pasteurizada preferente (1a. Categoría Sanitaria); después de ser pasteurizada, no debe dar lugar a más de 30,000 colonias por mililitro en placa de agar.
- b) Leche certificada pasteurizada (2a. Categoría Sanitaria); después de ser pasteurizada, no debe dar lugar a más de 100,000 colonias por mililitro en placa de agar.
- c) Leche pasteurizada (3a. Categoría Sanitaria); después de ser pasteurizada, no debe dar lugar a más de 200,000 colonias por mililitro en placa de agar. (4)

Las bacterias encontradas en la leche se clasifican y estudian según las alteraciones que producen en la leche, incluyen los siguientes grupos: (6)

- 1) Bacterias que forman ácido.- Estas bacterias desdoblan la lactosa con formación de ácidos que son causa de que la leche se agrie y posteriormente se corte; entre ellas están: Streptococcus lactis, Streptococcus agalactiae, Lactobacillus bulgaricus Lactobacillus acidophilus.



- 2) Bacterias que producen gas.- Estas pertenecen en gran parte al grupo coliforme, algunas de las cuales fermentan la lactosa con formación de ácido y gas y ejercen una acción proteolítica descomponiendo las proteínas de la leche, en particular la caseína, entre las cuales tenemos: Escherichia coli, Salmonella paratyphi, Aerobacter aerogenes.
- 3) Bacterias proteolíticas.- Estas bacterias producen una reacción alcalina y además hidrolizan las proteínas de la leche; en este grupo están: Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Proteus vulgaris.
- 4) Bacterias que forman álcali.- Algunas de estas bacterias comunmente encontradas en la leche la vuelven alcalina sin producir cambio alguno en su aspecto, sabor u olor. Entre ellas se encuentran: Shigella alkalescens, Pseudomona fluorescens.
- 5) Bacterias inertes.- Un gran número de bacterias comunes de la leche, así como la mayor parte de las patógenas que se encuentran en la leche, no alterna el aspecto, el olor, el sabor, o la reacción de la leche y por eso se les llama

inertes .

- 6) Bacterias anaerobias .- Estas bacterias fermentan la lactosa con formación de gas y producen ácidos de olor penetrante, como el butiríco, el valeriánico y el propiónico, entre las cuales tenemos: Clostridium perfringens, Cl. pruchii, Cl. butyricum y Cl. multifermentans.
  
- 7) Bacterias cromógenas .- Algunas bacterias productoras de pigmentos causan cambios de color en la leche:  
Pseudomona syncyaneus (leche azul), Serratia marcescens (leche roja), Pseudomona aeruginosa, (leche azul-verde) Flavobacterium synxanthum (leche amarilla). (6)

Los métodos más comunmente empleados para un análisis bacteriológico completo de la leche, (2), (3), (5), (7), (9), (10), (11) (12) son los siguientes:

- I) Procedimientos para calcular poblaciones totales:
  - 1) Recuento microscópico directo o de Breed .- empleado generalmente para leche cruda .
  - 2) Recuento estándar de colonias en placa .

3) Cuenta microscópica de colonias de Frost.

II) Procedimientos para la determinación de tipos específicos de microorganismos:

1) Prueba para bacterias coliformes:

a) con medios sólidos

b) con medios líquidos

c) con la técnica de filtro de membrana

2) Bacterias termodúricas.- incluidas en el conteo de población total.

3) Bacterias proteolíticas.

4) Bacterias psicofílicas.

5) Mohos y Levaduras.

III) Otros Procedimientos:

1) Pruebas de reducción de colorantes.- Estas pruebas se emplean para clasificar la leche cruda por pasteurizar o evaporar. (9)

a) Reducción del azul de metileno

b) Reducción de la resazurina.

2) Prueba de la Fosfatasa.- Se emplea para probar la eficacia de la pasterización. (5), (6)

Este trabajo tiene como objetivo principal, llevar a cabo un análisis bacteriológico de dos de las marcas de leche pasteurizada que tienen más aceptación en el mercado de la Cd. de Monterrey, para determinar así su calidad sanitaria. Ya que cada Pasteurizadora hace un reparto diario del producto a toda la ciudad de Monterrey, todas las muestras de leche que se venden en expendios o supermercados de la ciudad proceden de una fuente común. Como cada comercio tiene diferente movimiento de venta y el tiempo que permanece la leche en los camiones repartidores es diferente para cada expendio, decidí tomar las muestras de un mismo supermercado para eliminar en lo posible estas variables.

Para realizar este estudio bacteriológico escogí de todos los métodos anteriormente nombrados, aquellos de los que por la técnica y tipo de materiales y medios empleados se pudieran obtener resultados más representativos.

Para calcular poblaciones totales, yo trabajé con el recuento estándar de colonias en placa, debido a que se emplea un medio estándar y utiliza volúmenes mayores de leche que



en los otros métodos. En cuanto a determinación de microorganismos específicos llevé a cabo la prueba de coliformes en medio líquido, ya que el medio sólido proporciona conteos precisos pero generalmente es negativo con leche pasteurizada de bajo conteo, en tanto que el medio líquido que utiliza un mayor volumen de muestra generalmente proporciona resultados positivos (5); para el método de filtro de membrana no contaba con el material adecuado para realizarlo. También trabajé en la determinación de bacterias proteolíticas y de Mohos y Levaduras.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

A continuación expondré detalladamente los pasos de cada una de las técnicas que utilicé en este examen bacteriológico de la leche; como es bien sabido, para lograr una mayor confiabilidad en los resultados, antes de empezar cualquier determinación bacteriológica es necesaria la esterilización en estufa de aire caliente durante una hora a  $180^{\circ}\text{C}$  de todo el equipo y material de vidrio que se va a utilizar, así como la esterilización en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. de todos los medios de cultivo, paso que por lo tanto no incluiré en la descripción de cada técnica.

### RECUENTO ESTANDAR DE COLONIAS

#### EN PLACA

Esta técnica es útil para calcular las poblaciones bacteriana viables. (5) Es el procedimiento que se recomienda (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10), (11) y (12), para el examen de leches pasteurizadas y certificadas y constituye un índice para valorar la calidad sanitaria de la misma, aunque con

ciertas limitaciones, toda vez que no existe una relación definida, entre el número total de colonias saprófitas y patógenas.

El medio nutritivo que utilicé en este método es un Agar de Triptona Glucosa y Levadura (Plate Count Agar).\*

Técnica:

- 1) Agitar los frascos de las muestras 25 veces con movimientos de inversión.
- 2) Preparar las diluciones de la leche como sigue:
  - a) Añadir 1 ml. de la muestra de leche a un tubo que contenga 9 ml. de agua destilada estéril (dilución 1:10).  
Mezclar perfectamente.
  - b) Pasar 1 ml. de la dilución 1:10 a 9 ml. de agua destilada estéril (dilución 1:100).
  - c) Pasar 1 ml. de la dilución 1:100 a 9 ml. de agua destilada estéril (dilución 1:1000).
  - d) Si se sospecha que el número de bacterias es alto (300,000 o mayor), se preparan diluciones de ---  
1:10,000 y de 1:100,000.
  - e) Agitar cada dilución, por inversión 25 veces.

\* Plate Count Agar, (Merck)

- 3) Con una pipeta estéril de 1 ml. pasar cantidades de 1 ml. de cada una de las diluciones a cajas Petri estériles, previamente rotuladas con el número de muestra y dilución respectiva.
- 4) Verter de 10 a 15 ml. de agar fundido y enfriado a 45°C a cada caja y mezclar por rotación perfectamente.
- 5) Invertir las cajas una vez solidificado el agar, e incubar durante 48 horas a 35°C.
- 6) Contar las colonias utilizando el contador de colonias de Quebec, escogiendo las cajas que muestren entre 30 y 300 colonias. El número de colonias de estas placas se multiplica por la dilución y el resultado es la cuenta final.

#### RECUESTO DE BACTERIAS PROTEOLITICAS

Las bacterias proteolíticas pueden impartir un sabor amargo a los productos lácteos mediante la degradación de su principal proteína, la caseína. (5) Estas bacterias pueden descubrirse empleando el mismo agar que en el recuento estándar de colonias solo que es suplementado con un 10% de leche desnatada\* esterilizada que se prepara según las indica-

\* Skim Milk, (BBL.)



ciones de la casa productora y que fué el medio que yo utilizé.

Técnica:

Utilizé la misma técnica que en el recuento estándar de colonias, variando solo la temperatura de incubación que en esta determinación fué de  $23 \pm 2^{\circ} \text{C}$ .

Para realizar el conteo de estas colonias solo tomé en cuenta aquellas que se encontraban rodeadas por un halo transparente, el cual es debido a la proteólisis de las proteínas de la leche, por acción de la enzima renina secretada por bacterias proteolíticas.

#### RECUESTO DE MOHOS Y LEVADURAS

Esta determinación se utiliza también como un índice para valorar la condición sanitaria del producto.

Emplíé como medio nutritivo el Agar de Patata Dextrosa\* el cual fué necesario acidificar a un pH de  $3.5 \pm 1$  con ácido tartárico al 10%, debido a que este pH inhibe el crecimiento de bacterias pero no de mohos y levaduras. (5).

\*Potao Dextrose Agar, (Merck).

Técnica:

En este caso también utilizé la técnica de recuento de colonias en placa con las siguientes variantes:

- a) Hice diluciones de 1:10 y 1:100 en agua destilada estéril de las cuales tomé 1 ml. para sembrar en la caja Petri respectiva y además, sembré directamente 1 ml. de la muestra de leche dentro de una caja Petri, sin previa dilución.
- b) La temperatura de incubación fué de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 días, pasados los cuales realizé el conteo de las colonias.

#### RECUESTO DE BACTERIAS COLIFORMES

Para la identificación de bacterias del grupo coliforme, se aprovecha especialmente su propiedad de generar gas a partir de la lactosa, (anhídrido carbónico e hidrógeno) (7). Este se puede recoger empleando caldo selectivo depositado en tubos adecuados; (10), (11), como se explicará más adelante.

El caldo que utilizé para realizar esta determinación fué Caldo Bilis Verde-Brillante.\*

\*Brilliant-green Bile Broth (Merck)

Técnica:

Consta de dos protocolos sucesivos que se conocen como prueba presuntiva y prueba confirmatoria.

Prueba Presuntiva:

- 1) Se preparan 6 tubos de 18 x 150 con tapón de algodón, con 10 ml. cada uno, del caldo bilis verde-brillante de concentración simple, de acuerdo con las instrucciones de la casa productora. A otros 3 tubos de 25 x 200 con tapón de algodón se les agrega 10 ml. del caldo a doble concentración.
- 2) Se les introduce a cada uno de los 9 tubos, un tubito de Durham para detección de gas. Se esterilizan todos los tubos en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- 3) A tres de los tubos con caldo de concentración simple se les añade 1 ml. de la muestra de leche con pipeta estéril de 1 ml.; utilizando la misma pipeta se añade 0.1 ml. de la muestra de leche a los tres tubos restantes con caldo de concentración simple.

- 4) A los 3 tubos de caldo de concentración doble se les añade 10 ml. de la muestra de leche con pipeta estéril de 10 ml. Quedando así tres tubos paralelos de cada una de las tres diluciones.
- 5) Se incuban los tubos durante 48 hrs. a 35° C.
- 6) Se anota el número de tubos de cada una de las diluciones que presentan producción de gas positiva. Siendo así la prueba presuntiva positiva; si en ninguno de los tubos aparece producción de gas la prueba presuntiva es negativa.
- 7) El cálculo cuantitativo de los resultados obtenidos pueden lograrse refiriéndose a la tabla del Número Más Probable.  
(3)

Prueba Confirmatoria:

- 1) De alguno de los tubos con producción de gas positiva se siembra en estría una caja de Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB).\*
- 2) Se incuba a 35° C durante 24 hrs.

\*Agar de Eosina y Azul de Metileno, (B.B.L.)



- 3) La prueba confirmatoria será positiva si las colonias que aparecen en el agar EMB tienen el brillo verde metálico característico de las colonias de Escherichia coli, y será negativa en caso contrario.

RESULTADOS

RECUESTO ESTANDAR DE COLONIAS EN PLACA

Leche No. 1

Dilución

MUESTRA	1:10	1:100	1:1000	Bact/Ml.
1	incontables	98	12	9,800
2	incontables	206	18	20,600
3	incontables	incontables	347	347,000
4	incontables	85	11	8,500
5	incontables	incontables	60	60,000
6	incontables	38	4	3,800
7	incontables	87	9	8,700

Promedio Bacterias/Ml. 65,486

RECuento ESTANDAR DE COLONIAS EN PLACA

Leche No. 2		Dilución		
MUESTRA	1:10	1:100	1:1000	Bact/Ml.
1	incontables	132	14	13,200
2	incontables	70	13	7,000
3	incontables	59	40	5,900
4	incontables	160	37	16,000
5	incontables	150	13	15,000
6	incontables	180	10	18,000
7	incontables	450	58	58,000

Promedio Bacterias/Ml. 19,014



RECuento DE BACTERIAS PROTEOLITICAS EN PLACA

Leche No. 1	Dilución			Bact/Ml.
	MUESTRA	1:10	1:100	
1	140	56	6	1,400
2	52	6	0	520
3	18	3	0	180
4	20	2	0	200
5	12	4	0	120
6	17	0	0	170
7	15	3	1	150

Promedio Bacterias/Ml. 391

RECuento DE BACTERIAS PROTEOLITICAS EN PLACA

Leche No. 2		Dilución			
MUESTRA	1:10	1:100	1:1000	Bact/Ml.	
1	22	4	0	220	
2	47	15	3	470	
3	90	13	2	900	
4	incontables	30	5	3,000	
5	102	11	2	1,020	
6	incontables	35	4	3,500	
7	84	12	3	840	

Promedio Bacterias/Ml. 1,421

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS EN PLACA

Leche No. 1		Dilución			Mohos y Levaduras por Ml.
MUESTRA	1:1	1:10	1:100		
1	ninguna	ninguna	ninguna	0	
2	3	ninguna	ninguna	3	
3	ninguna	ninguna	ninguna	0	
4	1	ninguna	ninguna	1	
5	1	ninguna	ninguna	1	
6	ninguna	ninguna	ninguna	0	
7	1	ninguna	ninguna	1	

Promedio de Colonias/Ml. .85

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS EN PLACA

Leche No. 2		Dilución			Mohos y Levaduras por Ml.
MUESTRA	1:1	1:10	1:100		
1	ninguna	ninguna	ninguna	0	
2	1	ninguna	ninguna	1	
3	ninguna	ninguna	ninguna	0	
4	ninguna	ninguna	ninguna	0	
5	4	1	ninguna	4	
6	ninguna	ninguna	ninguna	0	
7	1	ninguna	ninguna	1	

Promedio Colonias/Ml. .85



RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES EN MEDIO LIQUIDO

Leche No. 1

Número de Tubos que dan Reacción Positiva

MUESTRA	3 tubos de 10 ml. c/u	3 tubos de 1 ml. c/u	3 tubos de 0.1 ml. c/u	NMP de Bact. por 100 ml.
1	3	3	2	1,100
2	3	2	0	93
3	3	2	0	93
4	3	0	0	23
5	3	3	1	460
6	3	2	0	93
7	3	3	0	240

Promedio de Bacterias/100 ml      300  
 Promedio de Bacterias/ 1 ml      3

PRUEBA CONFIRMATORIA PARA BACT. COLIFORMES

Leche No. 1

M U E S T R A	ESPECIE IDENTIFICADA
1	<u>E. coli</u>
2	<u>E. coli</u>
3	<u>E. coli</u> y <u>Providencia</u> sp.
4	<u>E. coli</u> y <u>E. aerógenes</u>
5	<u>E. coli</u>
6	<u>E. coli</u>
7	<u>E. coli</u> y <u>E. aerógenes</u>

RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES EN MEDIO LIQUIDO

Leche No. 2

Número de Tubos que dan reacción positiva

MUESTRA	3 tubos de 10 ml. c/u	3 tubos de 1 ml. c/u	3 tubos de 0.1 ml. c/u	NMP de Bact. por 100 ml.
1	3	2	0	93
2	2	1	0	15
3	3	1	0	43
4	3	3	0	240
5	3	1	1	75
6	3	2	0	93
7	3	3	2	1,100

Promedio de Bacterias/100 ml. 237  
 Promedio de Bacterias/ 1 ml. 2

PRUEBA CONFIRMATORIA PARA BACT. COLIFORMES

Leche No. 2

M U E S T R A	ESPECIE IDENTIFICADA
1	<u>Escherichia coli</u> y <u>E. aerógenes</u>
2	<u>E. aerógenes</u>
3	<u>Escherichia coli</u> y <u>E. aerógenes</u>
4	<u>Escherichia coli</u> y <u>Providencia sp.</u>
5	<u>Esecherichia coli</u> y <u>E. aerógenes</u>
6	<u>E. coli</u>
7	<u>E. coli</u> y <u>E. aerógenes</u>



DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE

PRUEBA DE TUBOS MULTIPLES

Número de Tubos que dan reacción positiva			Indice del NMP por 100 ml.	95% de Límites Confiables	
3 de 10 Ml. c/u	3 de 10 Ml. c/u	3 de 0.1 Ml. c/u		Inferior	Superior
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1,100	150	4,800

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Para realizar este estudio bacteriológico de la leche, es de suma importancia su obtención y transporte al laboratorio. La leche debe ser transportada al laboratorio en el recipiente en que se vende, tan pronto como sea posible y si el trayecto desde donde se obtuvo hasta el laboratorio es largo, debe ser mantenida a una temperatura menor de  $10^{\circ}\text{C}$ , (1) (6), precaución que en este caso no fué necesario tomar, debido a que su transporte no requería de más de 3 minutos, y una vez en el laboratorio se ponía a la temperatura del refrigerador. Las muestras de leche deben ser representativas del lote de que son tomadas, por lo cual yo tomé al azar un litro del lote del día, en el mismo expendio, durante cada uno de los siete días de la semana. Cabe hacer aquí la aclaración que la toma de las muestras en estos siete días no fueron consecutivas sino cada tercer día, pero siempre de un día de la semana distinto.

Como ya se ha dicho el recuento estándar de colonias en placa es la técnica empleada para calcular bacterias viables en leches pasteurizadas. Esta técnica es de suma importancia

pues a pesar de que no nos informa categóricamente de si la leche puede ser vehículo de enfermedades o no, debe tomarse en cuenta que las condiciones que permiten la entrada y multiplicación de grandes números de bacterias en la leche, pueden permitir también la entrada y multiplicación de bacterias patógenas.

Diferentes autores (2), (4), (7), (6), (8), recomiendan, además de las diluciones anotadas en la técnica que anteriormente describí, otras mayores, habiendo sido escogidas éstas para mi trabajo, basándome en los resultados que obtuve realizando previamente esta técnica con diluciones desde, 1:10 a 1:100,000.

Otros autores (4), (7), (6), recomiendan hacer las siembras de cada dilución por duplicado o triplicado, para obtener mayor exactitud, lo que en este caso no fué posible, por que el material con el que contaba no era suficiente.

En toda la bibliografía que consulté se recomienda realizar el conteo de las colonias en aquellas cajas que contengan entre 30 y 300 colonias. Se ha escogido este rango por

las siguientes razones: porque es un número fácil de contar, pues si la caja esta muy poblada, unas colonias cubren a las otras; porque el tamaño de las colonias, en esa concentración, las hace fácilmente reconocibles y porque se considera que en la cantidad de medio que se usa, hay nutrientes suficientes para 300 colonias, pero no para más, sin detrimento para unas u otras. (4)

Algunas veces, como se podrá observar en las tablas de resultados, en cajas de dos diluciones distintas, el conteo de colonias cae dentro del rango de 30 y 300 colonias. Para decidir cual de las dos cajas escoger para dar el resultado en bacterias por mililitro, yo escogí, aquella que no estuviera tan cerca a los límites inferior y superior de 30 y 300. Considero que esto es una causa de error en los resultados, ya que depende de la subjetividad del químico el que escoja una u otra caja.

Las desventajas, o causas de error principales con que cuenta esta técnica son:

- 1) inexactitudes en medición del líquido, en particular de la preparación de las series de diluciones.



- 2) irregularidades en la agitación al preparar las cejas de agar vertido.
- 3) esterilización insuficiente del equipo, medios de cultivo y agua de dilución.
- 4) errores en el contaje de colonias debidas al propio trabajador.
- 5) errores debido a que numerosas bacterias se agrupan en cadenas o grumos que ni siquiera al agitar se deshacen en sus partes integrantes. (4), (7)
- 6) errores debidos a que no existe ningún medio de cultivo que permita el crecimiento de todos los tipos bacterianos presentes en la leche cuando es incubado a una temperatura dada, en un período de tiempo corto; sino solo de aquellos que sus requerimientos óptimos de crecimiento, (pH) temperatura, humedad, tiempo de incubación, composición del medio de cultivo, son los del medio de cultivo empleado. (4).

De todo lo anteriormente expuesto así como de los re-

sultados que se obtuvieron en este trabajo puede deducirse, -- que la técnica de recuento estándar de colonias en placa, es una técnica que presenta cierta variabilidad y de la cual se obtienen resultados irregulares por lo cual para establecer si una leche cumple o no con los límites reglamentarios no basta con una sola cuenta bacteriana para emitir un juicio acertado y justo, sino basarse en varias cuentas y todavía más, en la media aritmética de todas las cuentas realizadas. (4)

Según esto, yo calculé la media aritmética de las dos leches que analizé, obteniendo para la leche No. 1 un promedio de 65,486 bacterias por mililitro, pudiendo por lo tanto ser clasificada como leche de Grado C de acuerdo con las reglas establecidas por la United States Public Health Service y como leche certificada pasteurizada 2a. Categoría Sanitaria según los valores reglamentarios para México. En tanto que la leche No. 2 se clasificaría como leche de Grado A y como leche certificada pasteurizada preferente la. Categoría Sanitaria, respectivamente, habiendo obtenido una media de 19,014 colonias por mililitro.

Sin embargo puede observarse que aún cuando la le--

che No. 2 es de mejor calidad que la leche No. 1, la primera tiene un 7% de bacterias proteolíticas en relación con la cuenta total, mientras que la leche No. 1 tiene menos del 1% de estas bacterias, por lo cual la leche No. 2 tenderá a agriarse con más facilidad que la leche No. 1 ya que los microorganismos proteolíticos, como ya se ha mencionado, son la causa de que la leche se agrie y posteriormente se corte.

En cuanto a los resultados que obtuve en el recuento de Mohos y Levaduras se puede observar que no en todas las determinaciones se obtuvo crecimiento por lo cual al hacer el promedio da un resultado de menos de una colonia por mililitro (.85); lo cual es una cifra bastante baja, por otra parte, se debe tomar en cuenta que en esta determinación es muy probable la contaminación por esporas del aire durante la siembra.

En esta determinación emplié las diluciones de 1:1, 1:10, y 1:100, en lugar de 1:10, 1:100, y 1:1000 debido a que antes de empezar el examen de la leche realicé una prueba con estas últimas diluciones y no obtuve crecimiento alguno, por lo que consideré conveniente emplear una dilución un poco menor.

En esta prueba el coneto de colonias debe realizarse primero a los tres días y luego a los cinco días de incubación, pero como yo nunca obtuve crecimiento a los tres días siempre hice el conteo hasta los cinco días de incubación.

En el grupo de bacterias coliformes están incluidos todos los bacilos no productores de esporas, aerobios y potencialmente anaerobios, Gram-negativos, capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 35°C dentro de 48 horas (5). Como habitantes comunes del ambiente normal así como del tracto intestinal del hombre y de los animales, estos miembros de los géneros Escherichia y Aerobacter que pueden ser o no de origen fecal entran en la leche en el momento en que es recolectada. Generalmente no son patógenos, pero su descubrimiento en la leche pasteurizada indica o que ha habido una pasteurización inadecuada o que se ha contaminado después de la pasteurización, ya que la pasteurización es adecuada para destruir los coliformes. (5). En este estudio encontré bacterias coliformes en todas las determinaciones de ambas leches, pero no pude determinar si fué debido a una mala pasteurización, pues para ello debía haber realizado con-



juntamente una prueba para comprobar la eficacia de la pasteurización como es la prueba de la fosfatasa, que no pude realizar por no haber conseguido los reactivos necesarios.

Pero de cualquier manera, lo importante es, que aún cuando todas las muestras de leche presentaron bacterias coliformes, la cuenta promedio o media aritmética en ambas leches fué inferior a 10 bacterias por mililitro, por lo cual según la U.S.P.H.S. se pueden clasificar respecto a esta cuenta como leches de Grado A o B. (ver pág. 3).

Debe hacerse notar que la leche No. 1 en la que encontramos un mayor porcentaje de bacterias totales así como de bacterias coliformes, es una marca con una producción y mercado mucho mayor que la leche No. 2 de lo cual puede pensarse que al haber una producción mayor se pone menor cuidado en el manejo y tratamiento de la leche, en cambio, con una producción más pequeña hay mayor oportunidad de llevar a cabo una manipulación más higiénica del producto.

De este estudio bacteriológico, se puede concluir que la leche No. 1 tomando en cuenta el recuento de colonias en placa y de acuerdo con la U.S.P.H.S. se clasifica como leche de

Grado C y como leche certificada pasteurizada 2a. Categoría Sanitaria según los valores reglamentarios para México; sin embargo el promedio de bacterias coliformes por mililitro es bastante bajo, menos de 10 bacterias por mililitro. La leche No. 2 se clasifica como leche de Grado A según la U.S.P.H.S. tomando en cuenta el recuento de colonias en placa y el recuento de coliformes, y como leche certificada pasteurizada preferente la Categoría Sanitaria de acuerdo con los valores reglamentarios para México.

La leche No. 2 aunque de mejor calidad que la leche No. 1 al contener en promedio un número mucho mayor de bacterias proteolíticas tiende a agriarse con mayor facilidad.

El recuento de mohos y levaduras es bastante bajo en --- ambas leches dando un promedio en las dos de menos de una bacteria por mililitro.

## R E S U M E N

Este trabajo consistió en un examen bacteriológico de dos marcas de leche comerciales, analizadas durante cada uno de los 7 días de la semana; es decir se realizaron siete veces las siguientes pruebas:

- 1.- Recuento estándar de colonias en placa.
- 2.- Recuento de Bacterias Proteolíticas.
- 3.- Recuento de Mohos y Levaduras
- 4.- Recuento de Bacterias Coliformes en medio líquido.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

La leche No. 1 se clasifica como leche de Grado C ó bien leche certificada pasteurizada 2ª. Categoría Sanitaria, con un promedio de 65,486 bacterias por ml. en el recuento estándar de colonias en placa. En el recuento de bacterias proteolíticas se obtiene un promedio de 391 bact./ml. En el de mohos y levaduras menos de 1 col/ml. En el recuento de coliformes un promedio de 3 bacterias/ml.

La leche No. 2 se clasifica como leche de Grado A ó

bien leche certificada pasteurizada preferente la. Categoría Sanitaria, con un promedio de 19,014 bac/ml. en el recuento estándar de colonias en placa. En el recuento de bacterias proteolíticas se obtiene un promedio de 1,421 bac/ml. En el de mohos y levaduras menos de 1 col/ml. En el recuento de coliformes un promedio de 2 bacterias por ml.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Burdon, K.L. Williams, R.P. Microbiología.  
Publicaciones Cultural, S.A. México. 1974.  
830 pp.
- 2.- Crabtree, K.T. Hinsdill, R.D. Fundamental Experiments  
in Microbiology. W.B. Saunders Company.  
Philadelphia. 1974. 349 pp.
- 3.- Benson, H.J. Microbiological Applications.  
W.M.C. Brown Company Publishers. Dubuque,  
Iowa. 1973. 345 pp.
- 4.- Ramos, M.C. Leche su producción higiénica y control sa-  
nitario. Editorial Veracruz. México D.F. 1960. 251 pp.
- 5.- B.B.L. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de  
Productos. Versión Española, de la redacción Beckton,  
Dickenson de México, S.A. de C. V. Editores asociados,  
S.A. México 1974. 213 pp.

.....

- 6.- Bryan, A.H. Bryan, Ch.A. Bryan, Ch.G. Bacteriología. Continental S.A. México. 1971. 595 pp.
- 7.- Demeter, K.J. Lactobacteriología. Acribia. Zaragoza, España. 1969. 331 pp.
- 8.- Collins, C.H. Métodos Microbiológicos. Acribia. Zaragoza, España 1969.
- 9.- Carpenter, P.L. Microbiología 2a. Ed. Interamericana, S.A. México. 1969 421 pp.
- 10.- Pelczar, M.J. Chain, E.C.S. Laboratory Exercises in Microbiology. Mc. Graw-Hill Book Company. New York. 1972. 478 pp.
- 11.- Pelczar, M.J. Reid, D.R. Microbiology. Mc. Graw-Hill Book Company. New York. 1972. 948 pp.
- 12.- Schönherr, W. Manual Práctico de Análisis de la Leche. Acribia. Zaragoza, España. 1969.