



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**Análisis microbiológico y
físico-químico de la leche**

Alumno/a: María José Santolaya Hernández

Tutor/a: Hikmate Abriouel Hayani

Dpto: Ciencias de la Salud

Julio, 2018

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 HISTORIA.....	4
1.2. PRODUCTOS LÁCTEOS	5
1.3. LECHE.....	7
1.3.1. Composición nutricional de la leche	8
1.3.1.1. Agua	9
1.3.1.2. Componente graso	9
1.3.1.3. Proteínas	10
1.3.1.4 Carbohidratos	11
1.3.1.5 Sales y Minerales.....	12
1.3.1.6 Vitaminas	12
1.3.2 Tratamiento térmico	13
1.3.3 Microbiología de la leche.....	15
1.3.4 Deterioro de la leche	21
1.3.5 Adulteraciones.....	22
2. DESCRIPCION DE LA EMPRESA.....	25
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Alimentos empleados:.....	29
4.2. Preparación de las muestras:	29
4.3. Material de laboratorio empleado:.....	30
4.4. Métodos analíticos empleados:	31
4.4.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS:.....	31
- Medios de cultivo y soluciones.	31
- Procedimiento.....	37

4.4.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	40
- Detección de aflatoxina M1 en leche cruda.	40
- Método cualitativo para la detección de fosfatasa en leche pasteurizada.	44
- Detección de sustancias inhibidoras en leche en leche cruda.....	42
- Determinación del contenido graso en leche. Método Gerber	46
5. RESULTADOS	50
5.1 Resultados microbiológicos	50
5.2 Resultados físico-químicos.....	54
6. DISCUSIÓN	61
7. CONCLUSIONES.....	66
8. BIBLIOGRAFÍA	68

RESUMEN

La historia del consumo de la leche y los productos lácteos se remonta a la aparición de la ganadería en la historia de la humanidad. A lo largo de los tiempos, el hombre aprendió a transformar la leche, tanto para conservarla durante más tiempo como para variar sus formas de consumo. De este modo ha ido apareciendo la extensa variedad de productos lácteos de los que hoy en día disponemos. Dada la importancia de la leche como alimento, es producida a gran escala en el mundo. Pero para que la leche cumpla con las expectativas nutricionales debe reunir una serie de requisitos que definen su calidad: su composición físico-química, cualidades organolépticas y número de microorganismos presente. En este trabajo se persiguió valorar la calidad de la leche desde el punto de vista físico-químico y microbiológico. Para ello, se llevo a cabo diferentes análisis físico-químicos como la presencia de sustancias inhibidoras y aflatoxinas en leche cruda y fosfatasa en leches pasteurizadas. Además, se valoró el contenido de grasa en ambas. Con respecto a la calidad microbiológica, se llevaron a cabo estudios referentes a enterobacterias y *Listeria monocytogenes* en leches pasteurizadas, y estimación de la carga microbiana en leches crudas. Los resultados obtenidos mostraron que tanto la leche cruda como la pasteurizada presentaron parámetros que se encuentran dentro de los límites legales permitidos para el consumo humano.

ABSTRACT

The history of the consumption of milk and dairy products goes back to the appearance of livestock in the history of mankind. Throughout time, man learned to transform milk, both to preserve it for longer and to vary their forms of consumption. In this way, the extensive variety of dairy products that we have today has been emerging. Given the importance of milk as food, it is produced in a large scale in the world. But for milk to meet nutritional expectations, it must meet a series of requirements that define its quality: its physical-chemical composition, organoleptic qualities and the number of microorganisms present. In this work, the aim was to assess the quality of the milk from the physical-chemical and microbiological point of view. For this purpose, different physical

and chemical analyzes were carried out, such as the presence of inhibitors and aflatoxins in raw milk and phosphatase in pasteurized milk. In addition, the fat content was assessed in both. With regard to the microbiological quality, studies were carried out concerning enterobacteria and *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk, and estimation of the microbial load in raw milks. The results obtained showed that both raw and pasteurized milk presented parameters that are within the legal limits allowed for human consumption.

1) INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA

La historia del consumo de la leche y los productos lácteos se remonta a la aparición de la ganadería en la historia de la humanidad. En el Mesolítico, el hombre pasó de cazar y recolectar a dedicarse exclusivamente al cultivo agrícola y a la cría de ganado. Con el nacimiento de la ganadería, se comenzó a ordeñar a los animales y a partir de aquel momento, la leche de vaca, cabra y oveja, se consideró el alimento por excelencia, la fuente de la fortaleza y de la vida. (Bonet et al. 2014). En numerosas culturas, la leche fue sinónimo de salud, riqueza, fertilidad y pureza. Los primeros escritos sobre la utilización de la leche como alimento proceden de Sumeria y Babilonia. La leche se guardaba en pieles, vejigas o tripas, y al exponerse al sol se coagulaba. Así surgió el queso. (Bonet et al., 2014).

En la Edad Media y hasta el siglo XVIII, el consumo de leche se concentraba en el mundo rural. Era un alimento poco apreciado, vehículo de transmisión de la brucelosis o fiebre de Malta. En el siglo XIX, con los progresos de la ciencia y la tecnología, los problemas de conservación e higiene se solventaron con la pasteurización, y posteriormente con la esterilización. En el siglo XX la leche se convierte en la materia prima de una importante industria y se pone al alcance de los consumidores de forma fácil, segura y económica (Bonet et al., 2014).

A lo largo de los tiempos, el hombre aprendió a transformar la leche, tanto para conservarla durante más tiempo como para variar sus formas de consumo. De

este modo ha ido apareciendo la extensa variedad de productos lácteos de los que hoy en día disponemos (Bonet et al., 2014).

1.2 PRODUCTOS LÁCTEOS

Los productos lácteos son aquellos productos obtenidos mediante cualquier elaboración de la leche, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración (Codex Alimentarius).

El carácter único de la leche como fuente de componentes multifuncionales hace que su utilización represente importantes ventajas para la elaboración de alimentos.

La leche y sus derivados son componentes fundamentales en la dieta de una gran parte de la población mundial. Muchos de los productos lácteos que consumimos hoy en día tienen su origen en antiguas técnicas de elaboración de alimentos que, en algunos casos, se conocen desde hace cientos e incluso millones de años (Early, 1998)

El desarrollo de la tecnología de los alimentos ha permitido el diseño de nuevos métodos de fabricación para los productos tradicionales, así como la introducción de novedosos derivados lácteos en el mercado. Desde mitad del siglo pasado los productos lácteos experimentan un consumo hiper masivo que ha generado que la industria productora desarrolle nuevas tecnologías para poder satisfacer la enorme demanda en tiempo y forma (Early, 1998).

Si bien es una realidad que la mayoría de los lácteos que consumimos hoy provienen de las vacas, cabe destacarse que también se consume leche de otros mamíferos además de la vaca, tales como: cabra, oveja, búfala, camella y yegua, aunque en menor cantidad (Ucha, 2013).

Los productos que derivan de la leche normalmente son obtenidos gracias a la fermentación y el procesamiento de la leche una vez obtenida.

Según FAOSTAT se producen una amplia variedad de productos lácteos entre los que se encuentran:

- La **leche líquida** es el producto lácteo más consumido, elaborado y comercializado. La leche líquida abarca productos como la leche pasteurizada, la leche desnatada, la leche normalizada, la leche reconstituida, la leche de larga conservación (UHT) y la leche enriquecida.
- Las **leches fermentadas** se utilizan frecuentemente para fabricar otros productos lácteos. Se obtiene de la fermentación de la leche utilizando microorganismos adecuados para llegar a un nivel deseado de acidez. Entre los productos fermentados figuran yogur, kumys, dahi, laban, ergo, tarag, ayran, kurut y kefir.
- Los **quesos** se obtienen mediante la coagulación de la proteína de la leche (caseína), que se separa del suero. Los quesos pueden ser duros, semiduros, blandos madurados o no madurados. Las distintas características de los quesos derivan de las diferencias en la composición de la leche y los tipos de esta, los procedimientos de elaboración aplicados y los microorganismos utilizados.
- La **mantequilla y el ghee** (mantequilla clarificada) son productos grasos derivados de la leche. La mantequilla se obtiene del batido de la leche o nata. El ghee se obtiene eliminando el agua de la mantequilla y se consume especialmente en Asia meridional.
- La **leche condensada** se obtiene de la eliminación parcial del agua de la leche entera o desnatada. La elaboración prevé el tratamiento térmico y la concentración. La leche condensada puede ser edulcorada o no edulcorada, pero la mayor parte es edulcorada.
- Las **leches evaporadas** se obtienen de la eliminación parcial del agua de la leche entera o desnatada. La elaboración prevé el tratamiento térmico para garantizar la estabilidad e inocuidad bacteriológica de la leche.
- La **leche en polvo** se obtiene de la deshidratación de la leche y generalmente se presenta en forma de polvo o gránulos.

- La **nata** es la parte de la leche que es comparativamente rica en grasas; se obtiene descremando o centrifugando la leche.
- **Sueros**: Según FAOSTAT, por suero se entiende la “parte líquida de la leche que queda después de separar la leche cuajada en la fabricación del queso.
- **La caseína** es la principal proteína de la leche y se utiliza como ingrediente en varios productos, entre estos quesos, productos de pastelería, pinturas y colas. Se obtiene de la leche desnatada mediante precipitación con el cuajo o mediante bacterias inocuas productoras de ácido láctico.

Tanto la leche como los productos derivados de ella son considerados altamente perecederos y por tal hecho es que se recomienda cumplir con el mantenimiento de la cadena de frío una vez que se producen y hasta que llegan a manos de los consumidores, quienes también deben cumplir con esta obligación para preservarlos (Ucha, 2013).

Siempre se deberá conservarlos refrigerados y además respetar las fechas de vencimiento que se inscriben en sus envases. También por esta cuestión es que los envases de los lácteos disponen de un diseño especial para proteger al producto en este sentido (Ucha, 2013).

1.3 LECHE

Se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas (BOE-A-(1967)-16485).

Desde un punto de vista biológico, la **leche** es la secreción de las hembras de los mamíferos, que tiene la función de satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido en sus primeros meses de vida (Baró et al., 2010).

El primer fluido segregado por la glándula mamaria es el calostro, una solución cremosa, amarilla y concentrada de grasas, vitaminas y proteínas, en especial inmunoglobulinas y anticuerpos (Mc Gee, 2010).

Todos los mamíferos producen leche para sus crías, pero solo unos pocos parientes cercanos han sido explotados por los humanos. Los animales que contribuyen al suministro mundial de leche de manera significativa son: vacas, carabao (búfalo asiático), ovejas, cabras, camellos y yacks (Mc Gee, 2010).

Con la denominación genérica de leche se comprende única y exclusivamente la leche natural de vaca. Las leches producidas por otras hembras de animales domésticos se designarán indicando además el nombre de la especie correspondiente: leche de oveja, leche de cabra, leche de burra, leche de yegua y leche de camella (BOE-A-1967-16485).

Dada la importancia de la leche como alimento, es producida a gran escala en el mundo. Según las estadísticas de las FAO la producción mundial de leche fue igual a 753,9 millones de toneladas (año 2012). La leche de vaca es la que más contribuye al suministro mundial (83%), seguido por la leche de búfala (12,9%) y cabra (2,4%) (FAOSTAT, 2016).

La producción mundial de leche total (2016) fue de 798,5 millones de toneladas. El principal país productor de leche es India (159,4 millones de ton), seguido por Estados Unidos (96,4 millones de ton). Respecto a la producción de leche de vaca, el principal país productor es Estados Unidos (96,4 millones de ton), seguido por India (77,4 millones de ton) (FAOSTAT, 2016).

1.3.1. Composición nutricional de la leche

La leche comúnmente consumida por todos los grupos de edad de las personas, es una de las principales fuentes de nutrientes, incluida la lactosa, todos los aminoácidos esenciales (Campagnollo et al., 2016; USFAO, 2008) o proteínas (albúmina y caseína) y minerales, vitaminas y varios ácidos grasos, que son vitales para la salud humana. La leche contiene nutrientes nutritivos (Claeys et al., 2014; Rosa et al., 2017; Shahbazi et al., 2016). Su composición es extremadamente compleja y varía ampliamente entre razas e incluso entre individuos de la misma raza. En su composición también influyen otros factores como, por ejemplo, la alimentación, edad del animal y fases de lactación.

Componente	%
Agua	86 – 90
Grasa	2 – 4
Proteína	2,5 – 4
Glúcidos	5
Minerales	0,6 – 0,7
Vitaminas	A – B – C – D- E

Tabla 1. Componentes de la leche

1.3.1.1 Agua

Cuantitativamente, el agua es el componente más importante. Los restantes componentes de la leche constituyen lo que se conoce como el extracto seco total, que alcanza cifras entre el 12,1 y el 13%.

El agua es la fase continua de la leche y el medio de transporte para sus componentes sólidos y gaseosos. Se encuentra en dos formas, el agua libre y el agua de enlace. El agua libre es la de mayor cantidad y en ella se mantiene en solución la lactosa y las sales. El agua libre es la que sale en el suero de la cuajada. El agua de enlace es la formada por la cohesión de los diferentes componentes no solubles, se encuentra en la superficie de estos compuestos y no forma parte de la fase hídrica de la leche por lo cual su eliminación es bastante difícil (Gómez, 2005).

1.3.1.2 Componente graso

La grasa láctea se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche. Se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, cuyos diámetros pueden variar de 0.1 a 0.22 micrones que se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos que evitan que la grasa se aglutine y pueda separarse de la parte acuosa. La grasa de la leche puede sufrir alteraciones causadas por la acción de la luz, del oxígeno y enzimas (lipasas). Los procesos hidrolíticos oxidativos conducen a la formación de peróxidos,

aldehídos, cetonas y ácidos grasos libres, originándose así alteraciones del sabor que se hace sebáceo o rancio (Lerche, 1969)

El contenido de grasa puede variar por factores como la raza y las prácticas de debidas a la alimentación, además, se mantiene constante en los diversos períodos de lactación, tan sólo en el calostro parece disminuir su porcentaje. Se ve afectada por el estado sanitario de la ubre presentando disminuciones significativas cuando se presentan procesos inflamatorios o infecciosos (Lerche, 1969).

Se clasifican en sustancias saponificables y no saponificables. Las sustancias saponificables comprenden principalmente los triglicéridos y los fosfolípidos. Las sustancias insaponificables comprenden las vitaminas y carotenoides (Gómez, 2005).

1.3.1.3. Proteínas

En la leche se distinguen dos grupos de compuestos nitrogenados: las proteínas (95%) y las sustancias no proteicas conocidas como nitrógeno no proteico (5%) (Baró et al., 2010).

Dentro del grupo de las proteínas se distinguen las caseínas y las proteínas del lactosuero (Baró et al., 2010):

- **Caseínas:** Constituyen el 80% de las proteínas totales de la leche de vaca. Se encuentran en suspensión formando parte de unas estructuras conocidas como micelas de caseína.
- **Proteínas del lactosuero:** Representan el 20% del total de proteínas y se encuentran solubilizadas en agua con la que presentan una gran afinidad.

Las proteínas de la leche tienen una estructura definida pero cuando la leche es sometida a diferentes tratamientos esta estructura puede cambiar (Gómez, 2005).

➤ **La caseína**

La caseína es la proteína más abundante, además de ser la más característica de la leche por no encontrarse en otros alimentos, existen tres tipos de caseínas (α , β y Kapa caseína), en la leche también se encuentra la albúmina y la globulina. El valor biológico de la caseína en la alimentación obedece a su contenido en aminoácidos esenciales que separan la parte acuosa por acción de enzimas como la renina o la quimiocina, que son las responsables de la precipitación de la proteína en la elaboración de quesos (Lerche, 1969).

La leche en forma natural contiene calcio, por lo que la coagulación podría ocurrir en cualquier momento, sin embargo, para que esta precipitación no suceda, la caseína K que es insensible al calcio, forma una especie de revestimiento protector en torno de las caseínas α , β y γ , e impiden que reaccionen con el calcio, manteniendo de esta manera la estabilidad de la proteína de la leche (Gómez, 2005; Kirk et al., 1996).

1.3.1.4 Carbohidratos

Los hidratos de carbono de la leche están compuestos esencialmente por lactosa y, en pequeñas cantidades, algunos otros azúcares como glucosa y galactosa y otros hidratos de carbono como glucolípidos, glucoproteínas y oligosacáridos (Gómez, 2005).

Los carbohidratos de la leche están representados en su mayoría por la lactosa, el único carbohidrato libre presente en todas las leches que se encuentra en cantidades importantes (Cheftel et al., 2000)

Es un disacárido formado por glucosa y galactosa. Se encuentra en solución en la fase acuosa de la leche (Gómez, 2005). Se sintetiza en la glándula mamaria y tiene un sabor que es relativamente poco azucarado, poco soluble y posee un efecto reductor (Cheftel et al., 2000). La lactosa es muy estable frente al ataque enzimático; sin embargo, es la más sensible a la acción microbiana (Yoldi et al., 1999).

1.3.1.5 Sales y Minerales

La leche contiene alrededor de un 1% de sustancias minerales. Estas sales pueden encontrarse tanto disueltas como en estado coloidal junto a la caseína. Estas sales están constituidas por cationes metálicos y aniones orgánicos e inorgánicos (Baró et al., 2010).

En la composición en minerales de la leche se pueden distinguir entre (Baró et al., 2010):

Macroelementos: las sales mayoritarias de la leche están constituidas por cloruros, fosfatos y citratos de potasio, calcio, sodio y magnesio. Presentan una gran importancia a nivel nutricional e industrial.

Oligoelementos: Los minerales que se encuentran en menor cantidad son: zinc, cobre, hierro, yodo y manganeso. Aunque estos se encuentran en menor cantidad son también importantes en la dieta alimenticia y algunos como el cobre y el zinc actúan como catalizadores en las reacciones de oxidación de las grasas.

Estos minerales además de su indiscutible valor nutricional tienen una enorme importancia en el mantenimiento de la estabilidad de la leche (Baró et al., 2010).

1.3.1.6 Vitaminas

La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, su concentración está sujeta a grandes oscilaciones (Agudelo et al., 2005).

La leche es la principal fuente de alguna de estas vitaminas en la alimentación humana. Unas están unidas a la grasa (vitaminas liposolubles); son la A, la D y la E. Otras vitaminas están disueltas en su fracción acuosa (vitaminas hidrosolubles) y son la Riboflavina (B2), Tiamina (B1), Piridoxina (B6), Cianocobalamina (B12), la vitamina C, Niacina (B3) y vitamina H (Biotina). También contiene ácido fólico. Entre estas vitaminas destacan fundamentalmente la vitamina A y la D, la Riboflavina o vitamina B2 y la Cianocobalamina o vitamina B12 (Roca, 2017).

En mayor o menor cantidad, la leche contiene todas las vitaminas importantes para la vida (Gómez, 2005).

Las vitaminas de la leche tienen la tendencia a destruirse debido a diferentes factores entre los cuales los más importantes son: los tratamientos térmicos, la acción de la luz, las oxidaciones entre otros. Las vitaminas como la Vitamina C, A, procarotenos, y E o tocoferol tienen un gran poder antioxidante y por lo tanto es utilizado en la industria como agentes antioxidantes de la grasa de la leche (Gómez, 2005).

1.3.2 Tratamiento térmico

A través de la historia los mecanismos de conservación han marcado el desarrollo del mercado y del consumo de la leche y los subproductos lácteos. Actualmente, el consumo de leche cruda está prohibido en la mayoría de los países, ya que esta debe ser sometida a procesos industriales, garantizando así su salubridad, tiempo de conservación y comercialización (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, 2010).

El calor intenso es uno de los tratamientos térmicos más utilizados para conservar la leche. Existen diferentes tipos de tratamientos, cada uno de ellos tiene un efecto concreto, que varía en función del binomio temperatura-tiempo, según el efecto que ejerza el calor sobre el alimento (Bonet et al., 2014).

- **Termización:** Es el primer paso antes de los tratamientos de elaboración a los que se someterá posteriormente. Su objetivo es aumentar la vida útil de la leche cruda durante su almacenamiento a bajas temperaturas. Consiste en un proceso de conservación en el que la leche se calienta a temperaturas entre los 62-65°C durante 15-20 segundos seguido de un rápido enfriamiento a <6°C (ICMSF, 1998).

Este tratamiento reduce el número de viables psicotrofos como *Pseudomonas spp.* La actividad fosfatasa alcalina se reduce, pero no se elimina (ICMSF, 1998).

La termización no permite un control total de los patógenos en estado vegetativo, aunque su número puede disminuir con lo que se reduce el riesgo. De forma específica debe resaltarse que *Listeria monocytogenes* puede

sobrevivir al proceso de termización (Mackey et al., 1989) y multiplicarse durante el posterior almacenamiento en frío.

- **Pasterización:** Es un proceso tecnológico que consiste en someter a la leche a un tratamiento térmico suave que permite mantener las características nutritivas y organolépticas de la misma. La pasteurización, se aplica para conseguir la seguridad microbiológica y ampliar la vida útil de la leche refrigerada a 6°C (IDF, 1985). Sin embargo, no consigue destruir las esporas de algunos microorganismos, que son las formas de resistencia que utilizan para soportar las altas temperaturas.

Entre los microorganismos termodúricos se encuentran bacterias no esporuladas que muestran una gran termorresistencia, como *Micoroccus spp.*, *Enterococcus faecalis* y *Ent. faecium* y algunos lactobacilos (Deibel et al., 1984).

Existen tres modalidades de pasterización: (Bonet et al., 2014).

- **Pasterización baja** (Low Temperature Holding – LTH): la leche se calienta a una temperatura de 60 - 61°C durante aproximadamente 30 minutos.
- **Pasterización (High Temperature Short Time – HTST):** la leche se somete a temperaturas de 72-78°C durante al menos 15 segundos.
- **Pasterización alta (Flash):** la leche se somete a temperaturas más altas, 85-90°C durante 1-2 segundos.

Estas condiciones son suficientes para reducir las poblaciones de bacterias vegetativas patógenas a un nivel que se considera seguro para la salud pública (ICMSF ,1998).

La leche sometida a este tratamiento debe mantenerse siempre en refrigeración y conviene consumirla en un plazo de 2-3 días (Bonet et al., 2014).

- **Esterilización:** Con este tratamiento se asegura la destrucción total de microorganismos y esporas, dando lugar a un producto estable y con largo periodo de conservación (Bonet et al., 2014).

La leche se somete a altas temperaturas durante un tiempo bastante elevado (115-120°C durante 15-30 minutos). Este tratamiento, y la conservación posterior, provocan una pérdida de vitaminas sobre todo B1, B12 y C, así como la disminución de la disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales. Este tipo de leche se comercializa generalmente envasada en botellas blancas opacas a la luz, y se conserva, siempre que no esté abierto el envase, durante un período de 5-6 meses a temperatura ambiente. Sin embargo, una vez abierto el envase, la leche se debe consumir en un plazo de 4-6 días y mantenerse durante este tiempo en refrigeración (Bonet et al., 2014).

Esterilización UHT: Es un proceso tecnológico que consiste en calentar la leche a temperaturas elevadas durante un tiempo muy corto. La esterilización UHT se puede aplicar con un sistema indirecto (sin contacto directo del vapor con la leche), a través de superficies calientes; suele ser un ciclo de 128°C durante 20 segundos aproximadamente, o con un sistema directo (inyección directa del vapor en la leche), que permite alcanzar alrededor de 150°C en 4 – 6 segundos (Bonet et al., 2014).

Cuanto más corto es el período de calentamiento de la leche, mejor se mantienen las cualidades nutritivas y organolépticas del producto final, que permanecen prácticamente intactas o varían muy poco respecto a las de la leche de partida (Bonet et al., 2014).

Después de este tratamiento, la leche se conserva a temperatura ambiente durante tres meses, aproximadamente, si el envase se mantiene cerrado. Una vez abierto, debe conservarse en la nevera, durante un periodo máximo de 4 a 6 días (Bonet et al., 2014).

1.3.3 Microbiología de la leche.

La leche es un buen medio de cultivo para el crecimiento de varios microorganismos por su contenido en agua, pH casi neutro, y una amplia variedad de nutrientes como lactosa y diferentes proteínas (Mossel et al., 2003).

La leche contiene varios factores antimicrobianos: lisozima, lactoferrina, proteínas de la leche unidas a vitamina B12 y ácido fólico, lactoperoxidasa e

inmunoglobulinas maternas. La lactoferrina tiene la capacidad de quelar el hierro. La lactoperoxidasa cataliza la síntesis de compuestos con efecto inhibitor sobre bacterias, pero no levaduras o mohos (ICMSF, 1998).

Los microorganismos son importantes en la leche y los productos derivados porque producen aromas y propiedades físicas deseables en productos lácteos, pero otros pueden generar alteraciones y algunos patógenos o sus toxinas pueden tornar peligrosos a los productos lácteos (Mossel et al., 2003.).

Una de las ramas de la industria láctea que depende en gran manera de la actividad de los microorganismos es la elaboración de los quesos. Existe una gran variedad de quesos que se elaboran bajo la actividad enzimática de especies bacterianas y fúngicas. Sin embargo, hay otros microorganismos que no se pueden usar debido su capacidad de alterar la composición y características organolépticas de la leche y derivados lácteos o por sus agentes causales de enfermedad en los consumidores. La importancia del estudio microbiológico de la leche se basa en tres razones (Sabena, 2009):

- * Producen cambios deseables en las características físicas-químicas de la leche durante la elaboración de diversos productos lácteos.
- * Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocan enfermedades en el consumidor.
- * Pueden causar alteraciones de la leche y productos lácteos haciendo inadecuados para el consumo. En la leche se encuentran microorganismos como bacterias, hongos (mohos y levaduras).

Dada las características de la leche cruda, los microorganismos predominantes y que se ven favorecidos para su crecimiento son las bacterias. En la leche se pueden encontrar diverso géneros y especies bacterianas. Aquellas de mayor importancia en la industria láctea son las llamadas bacterias lácticas y las bacterias coliformes. Es muy difícil producir leche cruda libre de coliformes, no obstante, los altos recuentos son indicadores de malas prácticas de producción, transporte o almacenamiento (Jay et al., 2005).

➤ **Bacterias Gram positivas:**

Bacterias lácticas: Son bacilos o cocos, Gram-positivos, no esporulados y en general catalasa-negativos, con una amplia distribución y adaptabilidad a diferentes ambientes. Pueden producir un pH 4,0 en los alimentos con carbohidratos fermentables, inhibiendo el desarrollo de otras bacterias. Aunque son mesofílicas y pueden crecer a 5-45°C (Sharpe, 1981).

El género *Lactobacillus* se divide en tres grupos (Jay et al. 2005):

- a) homofermentativos obligados (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii subespecie bulgaricus*, etc) son termobacterias que no fermentan pentosas,
- b) heterofermentativos facultativos (*L. casei*, *L. plantarum*, etc) que fermentan pentosas,
- c) heterofermentativos obligados (*L. brevis*, *L. reuterii*, etc) que producen CO₂ de glucosa.

Los cocos comprenden también a *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, además de los géneros ya nombrados (Ludwig et al., 1985). Hay tres grupos genéticamente diferentes de cocos (Schleifer et al., 1985):

- a) *Streptococcus* en la ubre y la cavidad oral,
- b) *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, etc) propios del intestino y
- c) *Lactococcus*, en la leche.

Los enterococos están con frecuencia en los quesos de leche cruda contribuyendo a las características organolépticas, entre ellos *E. casseliflavus*, *E. faecalis* y *E. durans*. Pero *E. faecium* y *Streptococcus bovis*, que predominan en el intestino vacuno, no se suelen encontrar en la leche ni en el queso (Gelsomino et al., 2002). Aproximadamente el 10% de la leche cruda contiene diversos fagos de *Lactococcus lactis*, algunos de los cuales son sensibles a la pasterización, pero el 34% de las cepas industriales son resistentes a la infección por fagos (Madera et al., 2004).

Las bacterias lácticas poseen propiedades terapéuticas, mostrando una variedad de efectos beneficiosos. La fermentación de la leche por los lactobacilos genera una mayor disponibilidad, digestibilidad y asimilación de sus nutrientes, aumentan la concentración de la vitamina B1, ácido láctico, galactosa, ácidos grasos y elementos esenciales como Ca, P, Mn, Fe y Zn (Mc Donough et al., 1983). *L. acidophilus* actúa disminuyendo el colesterol en sangre (De Smet et al., 1995). *L. helveticus* produce leche fermentada rica en inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (Fuglsang et al., 2002).

La hidrólisis de la lactosa mediante la β -galactosidasa y la fermentación de los productos, resultan ser beneficiosas para las personas intolerantes a la lactosa (Gilliland, 1984.). Las bacterias del ácido láctico y sus metabolitos presentan propiedades anticancerígenas que pueden deberse a: inhibición de células tumorales, supresión de las bacterias productoras de β glucosidasa, β -glucuronidasa y azorreductasa responsables de la liberación de sustancias cancerígenas a partir de sustratos inocuos, o degradación de sustancias cancerígenas como las nitrosaminas (Goldin, 1984; Goldin, 1977). Son conocidas las propiedades probióticas, con impacto en la salud humana, de la leche fermentada comercial con cepas de *L. casei* y *L. acidophilus* (Apella et al., 1992; González et al., 1990; Perdigón et al., 1991). El 51,2% de las células de *L. casei* ingeridas con la leche fermentada sobreviven en el íleo y el 28,4% en el colon (Oozeer et al., 2006).

Micrococcus: Estas bacterias son aerobias estrictas; no fermentan la glucosa, sino que la degradan provocando un débil descenso en el pH. Utilizan tanto el acetato como el lactato como fuente de carbono. Los micrococos no son patógenos; están desprovistos de coagulasa y hemolisina; se hallan con frecuencia sobre la piel del hombre y de animales. Los micrococos forman parte de la microbiota inocua de la leche y frecuentemente se encuentran después del ordeño. Tienen poca importancia en los problemas referentes a la conservación y tratamiento de la leche por presentar una temperatura óptima bastante elevada (37° C) y por sus actividades enzimáticas reducidas (Alais, 1985).

Estafilococos: son anaerobios facultativos, fuertemente fermentadores. Provocan una fermentación acidificante de la glucosa con un descenso acusado del pH. Al contrario que micrococos, producen acetoina. Actúan en una amplia

región de pH de 4,2 a 9,3. Los estafilococos patógenos poseen con frecuencia una coagulasa. Se consideran patógenos si presentan DNasa⁺ y fosfatasa⁺, que están ligados a la producción de enterotoxinas. Hoy en día se conoce una sola especie patógena *Staphylococcus aureus* (Alais, 1985).

Bacterias esporuladas: son las únicas que forman endospora, lo cual les permite soportar temperaturas elevadas; estas mueren por encima de los 100° C. Son las responsables de la alteración de la leche hervida o insuficientemente esterilizada, quesos fundidos y otros. A pesar de su termorresistencia, debida a las esporas, muchas de estas bacterias son mesófilas, se desarrollan a unos 30° C y se inhiben a temperaturas superiores a 45° C. Las bacterias esporuladas no suelen manifestarse en la leche cruda y en los productos lácteos que no se han calentado (Alais, 1985).

Los *Bacillus* son bacterias esporuladas con actividad enzimática variada producen acidificación, coagulación y proteólisis. Los *Clostridium* son anaerobios estrictos, producen gas. Algunos producen toxinas patógenas (*Clostridium botulinum*). Ambos géneros son de poca importancia en leche cruda, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas (Sabena, 2009).

Otras bacterias Gram positivas que pueden encontrarse en la leche son *Corynebacterium*, bacterias propionicas, *Brevibacterium* estos últimos se encuentran en las cortezas de algunos quesos madurados almacenados en condiciones húmedas (Alais, 1985).

➤ **Bacterias Gram negativas:**

Enterobacterias: los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto, su presencia en el agua y la leche se relaciona con contaminación de origen fecal. Las enterobacterias son menos abundantes en la leche que otras bacterias Gram negativas, sin embargo, tienen una gran importancia desde dos puntos de vista, higiénico: ya que varias de estas especies tienen poder patógeno, de las cuales la más temible es *Salmonella* y otras que pueden provocar trastornos gastrointestinales (*Yersinia*, *E. coli*, *Shigella*); y tecnológico: ya que son bacterias heterofermentativas, grandes productoras de gas (carbónico e hidrogeno) además producen

sustancias viscosas y de sabor desagradable, todo lo cual conduce a la alteración de la leche o subproductos. De las enterobacterias las más comunes encontradas en los productos lácteos son las del grupo Coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*). La determinación de su presencia indica calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada (Sabena, 2009).

Enterobacterias más comunes de la leche cruda: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerógenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Serratia*. Los últimos dos géneros se consiguen poco frecuentes, son microorganismos inoocuos, pero por su poder proteolítico pueden provocar alteraciones en la leche (Sabena, 2009).

Pseudomonas: más del 50% de la flora Gram negativa de la leche cruda está representada por este género. Son transportados frecuentemente por aguas contaminadas. Constituyen la parte esencial de la microbiota psicótrofa y son nocivos a causa de sus actividades lipolíticas y proteolíticas. Las especies más representativas en leche son: *P. fluorescens* y *P. pútrida* (Alais, 1985).

Acromobacteriaceae: este grupo de bacterias no fermentan la lactosa, no son proteolíticas ni patógenas, pero representan las bacterias psicrófilas que crecen en las leches conservadas a baja temperaturas, algunas pueden producir sustancias viscosas y pigmentos. Se han descritos los géneros *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter* (Sabena, 2009).

Bacterias Gram negativas diversas: *Brucella spp.* son bacterias patógenas para los animales y para el hombre, aunque poco frecuente, pueden llegar a causar cuadros de mastitis. Se destruyen con la pasteurización (Alais, 1985).

➤ **Mohos y Levaduras:**

No tienen importancia en leche fluida, sino más bien en los productos. Algunas especies son utilizadas como cultivos lácteos para el afinado de los quesos madurados como *Penicillium candidum* y *Penicillium camemberti* en los quesos de corteza blanca como el Camembert y *Penicillium roqueforti* en los quesos de pasta azul (Roquefort) (Sabena, 2009).

Las levaduras al igual que los mohos son de poca importancia en la leche líquida y son fácilmente destruidos a temperaturas de pasteurización. En la leche suelen encontrarse frecuentemente levaduras no esporulantes pertenecientes al género *Cándida*. También pueden encontrarse en la leche levaduras esporulantes como *K. fragilis* y *K. lactis* que fermentan la lactosa con producción de alcohol. *Torula kefir* se encuentra en los granos de kefir utilizados para producir esta bebida láctea, caracterizada por su sabor ácido-alcohólico, producto de la fermentación de la lactosa por estas especies (Alais, 1985).

➤ **Virus:**

La leche se puede contaminar con los virus causantes de la fiebre aftosa y estomatitis vesicular. Los más importantes para la industria láctea son los bacteriófagos que infectan a las bacterias produciendo su muerte, por lo cual pueden afectar la producción de derivados lácteos causando lisis de los cultivos añadidos para la producción de sabor y aroma (Sabena, 2009).

1.3.4 Deterioro de la leche

La leche cruda puede ser alterada por bacterias psicotróficas, que, en general, son bacilos, no esporulados, Gram-negativos, proteolíticos, con algunas cepas lipolíticas. Los más frecuentes son *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* que provocan cambios en el aroma y el sabor del producto refrigerado. Otras especies son *P. fragi*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *Burkholderia cepacia*. Llegan a través del suelo, forraje, agua, los otros animales y también por los utensilios de ordeño y tanques de transporte o almacenamiento mal lavados (Carrillo et al., 2007).

También la leche pasteurizada puede verse contaminada por la exposición al aire o equipos contaminados. El tiempo de generación de estas bacterias en la leche cruda es de 8-12 horas a 3° C y se reduce a 5,5-10 horas a 5° C, y si inicialmente había 1 ufc/ml en 5 días la leche puede estar totalmente alterada (Dogan et al., 2003).

Los bacilos coliformes producen gas a partir de la lactosa mientras que determinadas especies de *Streptococcus*, *Alcaligenes* y *Enterobacter* son

responsables de la viscosidad y *P. aeruginosa* y *Serratia marcescens* pueden conferir, respectivamente, color azul y rojo. Es muy difícil producir leche cruda libre de coliformes. No obstante, los altos recuentos son indicadores de malas prácticas de producción, transporte o almacenamiento (Jay et al., 2005).

En la leche pasteurizada la presencia de bacterias coliformes es inaceptable porque la temperatura de procesamiento la destruyen, así como a la fosfatasa. También la presencia de coliformes puede indicar recontaminación post-pasteurización por los equipos sucios o defectuosos, los operarios o los envases mal desinfectados (Carrillo et al., 2007).

Los miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* llegan a la leche porque se encuentran presentes en las superficies externas de la vaca, el suelo, el forraje o el estiércol. El número, de cien a varios miles por ml, depende de los cuidados en la limpieza y desinfección de las superficies del animal antes del ordeño (Carrillo et al., 2007).

El deterioro de las leches ultrapasteurizadas es causado por los esporulados aeróbicos (*Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. sporothermoduans*, *Paenibacillus spp.*), pero los anaeróbicos no parecen ser un problema debido al potencial de reducción relativamente alto (Jay et al., 2005).

Por otro lado, la maquinaria y/o equipamiento que se utilizan para recolectar la leche contribuyen en un alto porcentaje a la microflora de la leche cruda sino son bien desinfectados. *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* son algunos organismos que llegan a la leche por esta vía (Carrillo et al., 2007).

1.3.5 Adulteraciones

El tema de la autenticidad de los alimentos es actual y de gran importancia para investigadores, consumidores, productores e industriales en toda la cadena producción-consumo de leche y sus derivados. Todo producto terminado, e incluso la materia prima, debe cumplir con los requerimientos legales enunciados en su etiquetado, considerando ingredientes, proceso de producción e identidad genética (Escobar et al., 2014).

Los productos lácteos son de particular interés debido a que conforman un grupo de alimentos que tiene un papel relevante en la alimentación humana, y son indispensables para algunos sectores de la población (mujeres embarazadas y niños). La leche cruda tiene un costo de producción elevado y la agroindustria asociada a ella, al beneficiar los productos, encarece cada uno los derivados lácteos obtenidos, por lo que modificar su composición y reemplazar parte de sus componentes por otros más baratos, es una práctica atractiva para algunos industriales lecheros. En este caso, se estaría cometiendo un fraude contra los consumidores y autoridades (Escobar et al., 2014).

En muchos lugares del mundo y tomando como ejemplo la Unión Europea, la reglamentación sobre la autenticidad de los productos lácteos es muy estricta: sólo se aceptan adiciones de minerales, vitaminas y proteínas propias de la leche a la leche. De hecho, no se permite substituir grasa o proteína con otros de origen ajeno (Escobar et al., 2014).

La leche puede adulterarse accidental o intencionadamente (Early, 1998). Harding (1995b), revisó detalladamente las distintas adulteraciones de la leche cruda. En resumen, las principales son:

El aguado es una de las prácticas fraudulentas más comunes en la producción e industria de la leche es la adición de agua para aumentar su volumen. Puede ser consecuencia de un accidente o de prácticas incorrectas en la granja o en la industria.

Distintos **compuestos químicos** pueden llegar accidentalmente a la leche en la propia granja. Entre posibles adulterantes, se incluyen los detergentes y desinfectantes utilizados en la limpieza de las instalaciones y del equipo de ordeño. También, preparaciones veterinarias que se dejan descuidadamente en las proximidades de los tanques de leche, o incluso en su interior.

Otros compuestos químicos se pueden añadir intencionadamente a la leche. Por ejemplo, para neutralizar la acidez desarrollada se adicionan compuestos básicos. La sal o el azúcar se utilizan para enmascarar la adición de agua ya que elevan el contenido en sólidos y hacen descender el punto crioscópico. Algunos conservantes, como el agua oxigenada y la formalina, se añaden a la leche para enmascarar la mala calidad higiénica.

La leche en polvo desnatada y los sólidos no grasos, también pueden adicionarse a la leche para contrarrestar el aguado, pero el precio de estos productos hace que ese fraude no sea muy habitual.

2. DESCRIPCION DE LA EMPRESA

Laboratorios Controlab es una empresa localizada en el Polígono Industrial Los Olivares de Jaén con dilatada experiencia, dedicada a la realización de análisis agroalimentario y de aguas. Cumple con los más estrictos criterios de exactitud y precisión, tal y como lo avalan sus certificados de sistemas de aseguramiento de la calidad.

Este laboratorio privado ofrece sus servicios de **análisis y control de calidad a la industria alimentaria, gestores de aguas de consumo** y entidades tanto públicas como privadas.

En **Laboratorios Controlab** se presta un amplio abanico de servicios que garantizan resultados óptimos y eficaces. Son especialistas en **análisis de alimentos** aplicando los criterios de higiene y seguridad alimentaria según **Reglamento CE**.

1. Análisis Agroalimentarios

- **Análisis de alimentos:** Aplicación de los criterios de higiene de los procesos y criterios de seguridad alimentaria (según Reglamento CE 2073/2005).
- **Análisis microbiológicos:** *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* y otros microorganismos.
- **Análisis químicos:** Humedad, proteínas, grasa, hidratos de carbono, cloruros, nitratos, nitritos, cenizas, fosfatasa alcalina, inhibidores, células somáticas. Valor calórico.
- **Categorización comercial de alimentos:** Productos cárnicos, jamón serrano, quesos y leche de consumo.
- **Análisis de rendimiento graso:** Análisis de aceituna y cereales para pago por calidad según rendimiento graso. Método rápido en minutos.

2. Consultoría agroalimentaria

- Tramitación de registros sanitarios y autorizaciones sanitarias.
- Redacción de documentos de autocontrol: planes generales de higiene y APPCC.
- Proyectos de remodelación y adaptación de industrias y establecimientos.
- Validación de procesos y tratamientos tecnológicos: esterilización y pasteurización.
- Asesoramiento para implantación de normas de calidad: ISO 9001, Lista Marco para Exportación, IFS *Food*.

3. Análisis de aguas

- **Aguas de consumo humano:** Prestación de servicios analíticos y de asesoramiento a gestores de aguas de consumo humano, realizando los análisis que exige el Real Decreto 140/2003 (análisis organoléptico, análisis de control y análisis completo). Los boletines de análisis son incluidos en el SINAC.
- **Aguas de diálisis:** Análisis según la Farmacopea Europea. Bacterias, endotoxinas, aluminio y otros minerales, etc.
- **Aguas de piscinas colectivas:** Prestación de servicios de análisis y asesoramiento a empresas, residenciales y particulares, en aplicación del Decreto 23-1999 de Aguas de Piscinas Colectivas. Análisis quincenales y mensuales.
- **Aguas de riego:** Nuevos sondeos, aguas industriales, recuperadas y de procesos (calderas, ósmosis, etc.), realización de análisis de aguas de uso diverso, según los parámetros exigidos por la legislación vigente para cada uso.
- **Aguas residuales:** Realización de análisis para evaluación del rendimiento de las estaciones depuradoras de aguas residuales, control de vertidos, etc.

4. Análisis agrícolas

- **Análisis foliares y de suelos:** Análisis de microelementos y macroelementos, para determinación de carencias y tratamientos a realizar.

- **Análisis de rendimiento graso:** Análisis de aceituna y cereales para pago por calidad según rendimiento graso. Método rápido en minutos.

5. Formación

En **Laboratorios Controlab** disponen de una amplia oferta de cursos homologados de capacitación profesional, fundamentalmente en el ámbito de salud pública y ambiental.

Manipuladores de alimentos:

- Cursos de formación con local propio.
- Certificado estándar y manipuladores de mayor riesgo.

Otros cursos:

- Aplicador de biocidas en la higiene animal.
- Bienestar animal en el transporte.
- Bienestar animal en instalaciones ganaderas.
- Conversión a producción ecológica.

3. OBJETIVOS

1. Determinar la calidad higiénica o microbiológica en leches pasteurizadas de vaca y leches crudas de vaca, oveja y cabra.
2. Determinar una correcta pasterización de la leche mediante el estudio de la presencia/ausencia de fosfatasa alcalina en las diferentes muestras de leche pasteurizada.
3. Investigación de sustancias antimicrobianas o inhibidores en leche cruda mediante el test Eclipse 50.
4. Evaluar el contenido en aflatoxina M1 de las muestras de leche cruda de vaca, cabra y oveja.
5. Análisis del contenido de materia grasa en leche pasterizada entera y semidesnatada y en leche cruda de vaca, cabra y oveja.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Alimentos empleados:

Para la realización de este proyecto, se analizaron diferentes muestras de leche pasteurizada de vaca (entera en bolsa y entera, semidesnatada y semidesnatada sin lactosa en brick) y leche cruda de diferentes especies animales: vaca, oveja y cabra (para la fabricación de quesos).

La recogida de muestras se realizó una vez por semana, coincidiendo con la fecha de fabricación de cada lote.

El muestreo es importante porque, por regla general, no es posible someter a análisis microbiológico un lote completo.

El muestreo de alimentos para análisis microbiológico es la operación que consiste en separar un número determinado de unidades de un lote de manera aleatoria. Los resultados obtenidos con la parte del lote analizada, la “muestra”, se usan para extraer conclusiones acerca del lote completo.

Es necesario tomar las muestras en condiciones asépticas y transportarlas en condiciones asépticas al laboratorio. A ser posible, las muestras se tomarán en sus envases originales.

Las muestras se deben transportar inmediatamente al laboratorio. El transporte debe de ser a temperatura de refrigeración o a temperatura de congelación en el caso de alimentos congelados.

4.2 Preparación de las muestras:

Una vez en el laboratorio, las muestras son codificadas y registradas en una ficha donde anota el tipo de muestra, la fecha de fabricación, fecha de caducidad, lote del producto y análisis solicitados.

El análisis de las muestras se realizará lo antes posible, en cuanto las muestras lleguen al laboratorio. En el caso de que no se puedan analizar en el momento, se deberán conservar correctamente refrigeradas. Además, en el caso de

muestras de leche cruda se le adicionará unas gotas de azidiol (azida sódica/cloranfenicol).

El azidiol, es un compuesto químico con efecto bacteriostático recomendado para la conservación de muestras de leche cruda destinadas tanto al análisis composicional como higiénico-sanitario. Por su toxicidad (contiene nitruro de sodio) requiere manipulación controlada. Sus componentes son: cloranfenicol, nitruro de sodio, azul de bromofenol, citrato trisodico, etanol y agua destilada. Reactivo líquido de color violeta azulado.

Seguidamente, se preparan las muestras para su análisis. Al tratarse de una muestra líquida no es necesario un pretratamiento antes de proceder a su análisis fisicoquímico o microbiológico. Únicamente debemos de remover la leche con una pipeta o varilla de vidrio para homogeneizarla, especialmente si lo que vamos a realizar es un análisis de contenido graso en leche.

4.3 Material de laboratorio empleado:

- Báscula
- Mechero Bunsen
- Matraces Erlenmenyer
- Placas Petri
- Agua destilada
- Probeta
- Gradillas
- Pipetas
- Baño
- Algodón hidrófobo
- Papel de aluminio
- Asa de siembra triangular de Digrafsky
- Tubos de ensayo
- Autoclave
- Quit Aflansensor (detección rápida de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas)

- Quit Test para la detección de sustancias inhibidoras en leche Eclipse 50.
- Máquina Limele para detección de niveles de aflatoxinas.
- Butirómetros
- Centrífuga para butirómetros
- Medios de cultivo
- Ácido Gerber
- 3- Metil, 1-butanol
- Estufas de cultivo reguladas a 37°C y
- Pipeta de 11 ml especial para leche

4.4 Métodos analíticos empleados:

4.4.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS:

*** Medios de cultivo y soluciones.**

a) Medio Bilis-Rojo Neutro-Violeta Cristal con Glucosa (VRBG), Agar (Ph.Eur.)

Se emplea para el recuento de Enterobacterias en productos lácteos, cárnicos y otros alimentos.

Fundamento:

Por la presencia simultánea de violeta cristal y sales biliares se asegura en gran parte la inhibición de la microbiota acompañante. La degradación de la glucosa a ácido se pone de manifiesto por el cambio de color del indicador. La presencia de halo en estas colonias corresponde a un precipitado biliar. La mayoría de organismos que presentan estas características son Enterobacterias, sin embargo, no es completamente específico, por ejemplo, las Aeromonas se comportan de forma similar.

Composición (g/l):

Sales Biliares	1,5 g
Violeta Cristal.....	..0,002 g
Rojo Neutro0,03 g
D(+)-Glucosa	10,0 g
Extracto de Levadura	3,0 g
Digerido Pancreático de Caseína	7,0 g
Sodio Cloruro	5,0 g
Agar	15,0 g

pH final: 7,4 ±0,2

Preparación:

Suspender 41,5 g en 1 l de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Dejar enfriar a 45°C y emplear de inmediato. Se puede esterilizar a 118°C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR NI REFUNDIR EL MEDIO.

b) Agua de Peptona Tamponada, (Ph. Eur.)

Diluyente para la homogeneización de muestras destinadas a análisis microbiológicos.

Historia: Las Farmacopeas Europea y USP aconsejan este diluyente para preparar la solución madre de muestras procedentes de distintos orígenes. De la misma forma, se aconseja suplementar este diluyente con diversos agentes neutralizantes tales como Tween 80, Lecitina de huevo e Histidina para eliminar la actividad antimicrobiana de distintas muestras.

Fundamento:

Este diluyente difiere del Agua de Peptona Tamponada (cód. 413795) en una menor aportación de base nutritiva. El agua de peptona tradicional se utiliza además de como el diluyente más habitual en el análisis de alimentos, en el pre-enriquecimiento de *Salmonella*. El agua de peptona según Farmacopea está descrita para la preparación de la solución madre y de las disoluciones.

Composición (g/l):

Digerido Pancreático de Caseína 1,00 g
Potasio di-Hidrógeno Fosfato3,6 g
Sodio Cloruro 4,30 g
di-Sodio Hidrógeno Fosfato 2 hidrato7,20 g

pH: 7,0±0,2

Preparación:

Disolver 16,1 g en 1 l de agua destilada. Añadir los agentes neutralizantes si se desea. La solución esterilizada se utilizará como diluyente o tampón de lavado. Una vez preparada será transparente y de color claro.

c) Medio según Fraser, Base de Caldo (ISO 11290-1:1996) Medio de enriquecimiento para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*.

Fundamento:

El medio Fraser está basado en la formulación descrita por Fraser y Snerber y se diseñó para aislar *Listeria* tanto en alimentos como en muestras ambientales. Una característica de todas las especies de *Listeria* es su capacidad para hidrolizar la esculina a esculentina.

La esculentina genera un complejo de color negro al reaccionar con los iones de hierro presentes en la fórmula, que se hace visible al producirse un oscurecimiento del caldo inoculado con muestras presuntamente positivas una vez producida la incubación.

La incorporación de cloruro de litio en el medio permite inhibir el crecimiento de aquellos microorganismos acompañantes que al igual que *Listeria* hidrolizan la esculina, como es el caso de *Enterococcus*. La adición de ácido nalidíxico y el amonio citrato, a través de la incorporación de los suplementos, hace al medio muy adecuado para la recuperación de *L. monocytogenes*. Para obtener mejores resultados son aconsejables dos fases de enriquecimiento, el primero con un caldo Fraser 1/2 concentrado y un segundo enriquecimiento con caldo Fraser completo.

Composición (g/l):

Esculina	1,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
Extracto de Carne	5,0 g
Litio Cloruro	3,0 g
Potasio di-hidrógeno Fosfato	1,35 g
Proteosa Peptona	5,0 g
Sodio Cloruro	20,0 g
di-Sodio Fosfato	12,0 g
Triptona	5,0 g

pH final: 7,2 ± 0,2

d) Medio *Listeria*, Agar Cromogénico (ISO 11290-1:2004) Medio cromogénico selectivo para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*.

Sinónimos: Aloa, Agar - Agar *Listeria* Ottaviani & Agosti

Fundamento: Medio selectivo para el aislamiento e identificación presuntiva de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* recomendado en la ISO 11290-1 para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Es utilizado después de enriquecer en Caldo Fraser ½. El nitrógeno, vitaminas, aminoácidos y minerales son proporcionados por la Peptona de Carne y la Triptona.

El extracto de levadura proporciona las vitaminas B. El cloruro de sodio da equilibrio osmótico. Mientras que el piruvato de sodio actúa como fuente de energía y revivifica las bacterias. Este medio incorpora como hidrato de carbono fermentable la glucosa. El Cloruro de Litio, Deftazidima, Polimixina, Ácido nalidíxico y Cicloheximida proporcionan selectividad al medio.

El sustrato cromogénico detecta el enzima β -glucosidasa, común en todas las especies de *Listeria* virando sus colonias a color azul. Otros organismos que poseen esta enzima, por ejemplo, los enterococos son inhibidos por los agentes selectivos presentes en el medio.

El sustrato Lipasa C es el responsable del halo color blanco opaco que rodea de forma característica a *Listeria monocytogenes*. El halo de opalescencia caracteriza a *Listeria monocytogenes* del resto de *Listeria spp.* Con la sola excepción, hasta ahora detectada, de *Listeria ivanovii* (patógeno de animales).

Composición (g/l):

Peptona de Carne.....	18,00 g
Litio Cloruro	10,00 g
Extracto de Levadura.....	10,00 g
Triptona	6,00 g
Sodio Cloruro.....	5,00 g
di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro	2,50 g
Glucosa.....	2,00 g
Sodio Piruvato	2,00 g
Magnesio Glicerofosfato.....	1,00 g
Magnesio Sulfato.....	0,50 g
X-Glucosido.....	0,05 g
Agar Bacteriológico	13,50 g

pH: 7,2±0,2

e) Medio PCA, Agar Cromogénico

Para el conteo de microorganismos totales en muestras diversas.

Fundamento:

El medio PCA Agar Cromogénico está recomendado para la enumeración de bacterias de interés que puedan ser indicadores de contaminación o carga microbiana en alimentos. El digerido enzimático de la caseína proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es la fuente de vitaminas, particularmente del grupo B.

La D-glucosa es el carbohidrato que es la fuente de carbono y energía. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

El sustrato cromogénico permite la visualización más rápida de los microorganismos gracias a su color magenta. Las levaduras crecen como colonias de color blanco.

Composición (g/l):

Digerido enzimático de caseína	5,00 g
Extracto de levadura	2,50 g
Mezcla de cromogénicos	0,12 g
D-Glucosa.....	1,00 g
Agar bacteriológico	15,0 g

pH: 7,0 ± 0,2

Preparación:

Suspender 23,6 g de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver mediante calentamiento con frecuente agitación. Hervir durante un minuto hasta completar la disolución. EVITAR EL SOBRECALENTAMIENTO. NO AUTOCLAVAR. Dispensar en contenedores apropiados. El medio es de color ámbar ligeramente opalescente.

* **Procedimiento:**

Una vez preparados los medios, se procede a la inoculación de la muestra en el medio de cultivo y su posterior incubación.

Nuestro análisis microbiológico se dividió en dos partes:

- Por un lado, análisis de microbiológico de muestras de leche pasteurizadas, en el cual se realizó una siembra en el medio VRBG para el recuento de enterobacterias y en el medio *Listeria* cromogénico para investigación (presencia/ ausencia) de *Listeria monocytogenes*.
- Por otro lado, análisis microbiológico de muestras de leche cruda de diferentes especies, en el cual se utilizó el medio PCA para el recuento total de bacterias mesófilas aerobias.

Leches pasteurizadas:

En el caso de leches pasteurizadas, utilizamos 4 muestras diferentes por lote: (Figura 1)

- Leche pasteurizada entera envasada en bolsa
- Leche pasteurizada entera envasada en brick
- Leche pasteurizada semidesnatada envasada en brick
- Leche pasteurizada semidesnatada sin lactosa envasada en brick



Figura 1. Muestras de leche pasteurizada

Una vez preparadas las muestras se homogenizan y se procede a la siembra en masa.

Para el recuento de enterobacterias, se transfieren 2 ml de las diferentes muestras en placas Petri y a continuación, con el medio enfriado a una temperatura entre 45° y 48°C, se añade a cada placa aproximadamente 15 ml del medio líquido. Seguidamente, se homogeniza girando lateralmente las placas en un sentido y otro. Dejar enfriar hasta solidificación y posteriormente incubar a 37°C durante 24-48h. (Figuras 2 y 3)



Figura 2. Adición del medio

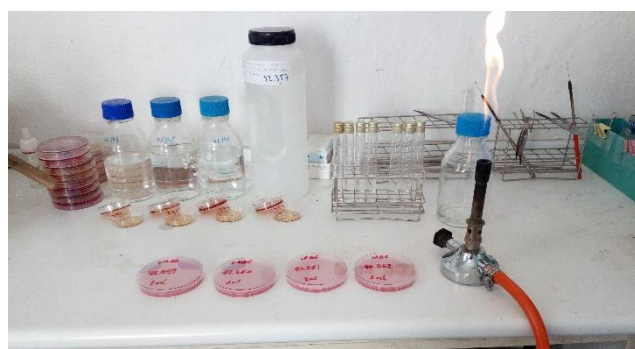


Figura 3. Siembra en masa medio VRBG

Para la investigación (presencia/ausencia) de *Listeria monocytogenes*, en primer lugar, se transfiere 1 ml de cada muestra de leche a 9ml de caldo de enriquecimiento Fraser y se incuba en la estufa 24h a 37°C (Figura 4). Tras 24h, se procede a la siembra en el medio *Listeria* Agar Cromogénico (ALOA). Se inoculan 0,1 ml de cada muestra enriquecida en el caldo y las muestras son distribuidas de forma homogénea sobre el medio con la ayuda de la espátula de Drigalsky. A continuación, se incuban 24-48h en la estufa a 37°C (Figura 5).



Figura 4. Caldo Fraser



Figura 5. Siembra en medio ALOA

Todo el proceso se realiza siempre en condiciones estériles al lado del mechero Bunsen.

Leches crudas:

En cuanto a la leche cruda, se utilizaron muestras de diferentes especies animales: (Figura 6).

- Leche cruda de vaca
- Leche cruda de cabra
- Leche cruda de oveja



Figura 6. Muestras de leche cruda.

Para el recuento de bacterias totales, una vez homogeneizadas las muestras, se preparan diluciones seriadas a razón de -1,-2,-3,-4 de las cuales se emplearon para la siembra las diluciones -3 y -4.

Para las diluciones seriadas, se preparan 4 tubos de ensayo en una gradilla a los cuales se le añaden 9 ml de agua de peptona (diluyente). Para la dilución -1 se adiciona 1 ml de la suspensión madre (muestra) a los 9 ml de agua de peptona y se continúa sucesivamente de forma seriada (Figura 7).

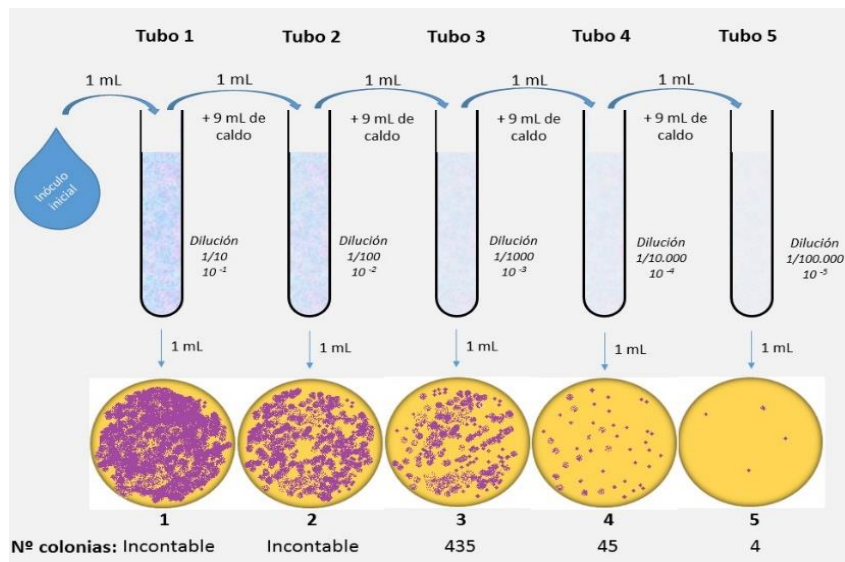


Figura 7. Preparación de diluciones seriadas

Una vez preparadas las diluciones, se procede a la siembra en masa. Se transfiere 1 ml de la dilución -3 y -4 y se inoculan en una placa petri estéril. A continuación, se añaden 15-20 ml de medio PCA esterilizado y atemperado a 45° aproximadamente y se agita suavemente la placa en círculos para la completa homogeneización de la muestra. Incubar las placas a 37° C durante 24-48 horas y contar las colonias desarrolladas teniendo en cuenta el factor de dilución.

4.4.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

* Detección de aflatoxina M1 en leche cruda.

Fundamento:

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*. Estas toxinas son tóxicas y carcinogénicas para animales, además de los humanos. La aflatoxina M1 es un metabolito de la aflatoxina B1 ingerida por los animales y aparece en la leche que estos producen.

La legislación Europea establece que la leche destinada al consumo directo y a la fabricación de productos lácteos no debe contener una concentración de Aflatoxina M1 (AFM1) que exceda las 0,05 µg/Kg (0,05 ppb o 50 ppt).

Para nuestro análisis se utilizó Aflasensor, un test rápido que se presenta en formato de tira reactiva y que permite la detección y cuantificación de AFM1 en la leche (Figura 8).



Figura 8. kit Aflasensor.

Procedimiento:

1. Lavar y secarse las manos. Sacar el kit del sistema de refrigeración.
2. Sacar del envase tantos microtubos como número de muestras de leche necesitemos analizar. Se aconseja no quitar el tapón de aquellos microtubos que no vayan a ser utilizados y depositarlos inmediatamente en el envase.
3. Homogeneizar las muestras.
4. Colocar una punta en la micropipeta y añadir 200 μ l de la muestra de leche al microtubo. Una vez se ha transferido la muestra, mezclar y homogeneizar el producto con ayuda de la punta de la pipeta hasta obtener un color rosa homogéneo.
5. Colocar los microtubos en el incubador e incubar durante 3 minutos en estufa a 37°C.
6. Transcurrido el tiempo, y sin extraer las muestras de la estufa, se introduce en cada pocillo una tira reactiva y se realiza una segunda incubación durante 7min.
7. Al terminar la segunda incubación, se extrae la tira reactiva de cada microtubo y se miden los niveles de aflatoxinas en el aparato de detección LIMELE.

Esta máquina presenta un límite de detección de 20 ppt y cuantifica con un margen de incertidumbre de +/- 15 ppt (Figura 9).



Figura 9. Procedimiento del test Aflasensor y cuantificación en máquina de detección LIMELE

* **Detección de sustancias inhibitoras en leche en leche cruda. Test Eclipse 50.**

La detección de residuos de medicamentos en leche tiene una gran importancia debido a sus repercusiones en la Salud Pública. El uso de este tipo de sustancias en el tratamiento de procesos infecciosos del ganado es recomendado y generalizado para el control de las enfermedades. Sin embargo, dichos tratamientos pueden producir la presencia de los inhibidores en los alimentos y, especialmente en la leche, pueden encontrarse concentraciones por encima de los límites máximos de residuo permitidos.

Fundamento:

El kit ECLIPSE 50 es un test de cribado que permite detectar un amplio espectro de antibióticos en leche. El kit se presenta en formato de placa microtiter, cuyos pocillos contienen un medio de cultivo específico con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* y un indicador ácido-base. Tras la incubación de la placa a 65°C, las esporas germinan y se multiplican acidificando el medio y provocando el viraje del indicador de un color azul a amarillo. Si la muestra de leche contiene una concentración de antibiótico superior al límite de detección del test, el crecimiento del microorganismo se inhibe y por lo tanto no se producirá el viraje del indicador del medio (Figura 10).



Figura 10. Test Eclipse 50

Procedimiento del test:

1. Recortar con un cúter o bisturí la lámina metálica que protege la placa y separar los pocillos presionando por la parte inferior. Es importante no despegar la lámina de los pocillos que no se vayan a usar y guardarlos en refrigeración, de lo contrario el medio podría secarse.
2. Levantar la lámina adhesiva y aplicar 50 μL de muestra por pocillo. Aplicar en cada ensayo un control negativo.
3. Sellar cuidadosamente los pocillos con la lámina adhesiva (también puede usarse cinta adhesiva tipo celo) e incubar a 65°C hasta que el control negativo haya virado a amarillo (tiempo aproximado 2 h 15' – 2 h 45').
4. Cuando el control negativo haya virado a amarillo, eliminar la leche de los pocillos volcando la placa. Lavar los pocillos con agua destilada llenando los pocillos con un frasco lavador. A continuación, vaciar los pocillos dando la vuelta a la placa y golpeando los pocillos suavemente contra papel absorbente. Realizar este lavado 2 ó 3 veces
5. Resultados: Lectura visual. Invertir la placa y comparar los colores de las muestras con el control negativo. Los pocillos de color azul se identificarán como positivos y los pocillos de color amarillo negativos. Colores intermedios indican presencia de inhibidores en concentración cercana al límite de detección del test. En este caso se recomienda repetir esta muestra en un nuevo ensayo (Figura 11).

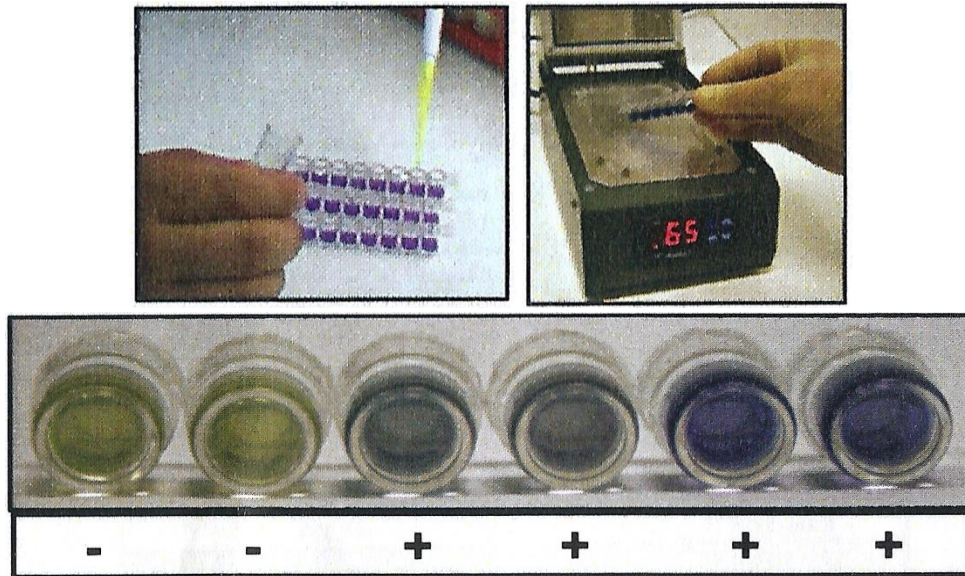


Figura 11. Procedimiento del test Eclipse 50

* **Método cualitativo para la detección de fosfatasa en leche pasteurizada.**

Fundamento:

La fosfatasa es una enzima presente en la leche cruda y progresivamente inactivada por calentamiento a temperaturas normales de pasteurización (superiores a 60°C). Se ha demostrado que esta enzima es más difícil de destruir que la mayoría de los organismos patogénicos termo-resistentes que pudieran estar presentes en la leche. Esta prueba es de gran utilidad para decidir si la leche ha sido o no pasteurizada, si la leche pasteurizada se ha mezclado con leche cruda, o incluso si la pasteurización ha sido deficiente.

La actividad de la fosfatasa alcalina se determina por la acción hidrolítica de dicha enzima sobre un sustrato sintético dando lugar a una coloración azul a la muestra de leche.

Procedimiento:

1. Transferir a 2 tubos de ensayo P (muestra problema) y C (Control) 10 ml de agua destilada y adicionar a cada uno de ellos una tableta de Lagnostoc I y Lagnostoc II (Figura 12).

2. Es conveniente machacar las tabletas en un mortero antes de adicionarlas ya que es difícil disolverlas en agua.
3. Una vez añadidas las tabletas, agitar con una varilla para su completa disolución.
4. Pipetear 1 ml de leche en cada uno de los tubos según corresponda el tipo de muestra e introducir en el baño o estufa durante 1h a una temperatura de 37°C.
5. Posteriormente, añadir a cada tubo una cucharadita del reactivo Lagnostoc III y homogeneizar.
6. Leer el color a los 10 min.



Figura 12. Test Lactognost

La existencia de color azul indicará la presencia de fosfatasa alcalina. La ausencia de fosfatasa indica claramente una correcta pasteurización (Figura 13).

Coloración	Resultado
Azul	Positivo
Verde	Débilmente positivo
Marrón	Negativo

Figura 13. Cuadro interpretativo de resultados del test Lactognost

* Determinación del contenido graso en leche. Método Gerber

El contenido de grasa de la leche y los derivados lácteos puede determinarse por medio de diversos métodos. Su determinación es muy importante en el control de calidad de la industria láctea, tanto para cuantificar su contenido nutricional como para detectar adulteraciones fraudulentas. Los métodos químicos tradicionalmente utilizados para la determinación de la materia grasa en lácteos se basan en medir la grasa separada, después de destruir su estado globular, o mediante la extracción de la grasa por medio de un disolvente. En este trabajo, se describe el método butirométrico de Gerber.

Fundamento:

El método Gerber, consiste en la separación de la materia grasa por disolución en ácido sulfúrico de todos los componentes, seguida por centrifugación en tubos especialmente calibrados (Figura 14). Se separa la grasa dentro de un recipiente medidor, llamado butirómetro, medir el volumen e indicarlo en un tanto por ciento en masa.

La grasa existe en la leche en forma de pequeños glóbulos de diferente diámetro, que oscila entre 0,1 y 10 micrómetros. Los glóbulos grasos forman una emulsión permanente con el líquido lácteo. La envoltura de los glóbulos de grasa evita la coalescencia de los mismos y estabiliza el estado emulsionado. La separación completa de la grasa precisa la destrucción de la envoltura protectora de los glóbulos grasos. Ello se lleva a cabo por medio del ácido sulfúrico concentrado, de entre el 90 y el 91 % de masa.

Por otra parte, la adición de alcohol amílico (3-metil 1 butanol) facilita la separación de la grasa y, al final, resulta una línea divisoria clara entre la grasa y la solución ácida.

Mediante centrifugación, la grasa es separada en el vástago graduado del butirómetro, donde se puede leer directamente el contenido en grasa expresado en gramos/100 g de muestra.



Figura 14. Butirómetro

Procedimiento:

Para la preparación de la muestra, en primer lugar, homogeneizar cuidadosamente la muestra. Debe lograrse la distribución homogénea de la grasa, pero debe evitarse la formación de espuma.

Una vez homogeneizadas las muestras se preparan los butirómetros en una gradilla, estos deben estar completamente limpios y sobre todo libres de restos de grasa. A ellos se transfiere:

- 10 ml de ácido Gerber (este ácido se prepara en el laboratorio a razón de 500 ml de ácido sulfúrico concentrado y 75 ml de agua destilada, es altamente tóxico y corrosivo). El ácido sulfúrico oxida e hidroliza los componentes orgánicos de la envoltura protectora de los glóbulos de grasa, las fracciones de las albúminas de leche y la lactosa.
- 11 ml de la muestra de leche. La adición se debe realizar con cuidado y muy lentamente de manera que la muestra caiga lentamente por las paredes del butirómetro de forma que los líquidos no se mezclen evitando así que se produzca la reacción antes de tiempo (Figura 15).
- 1 ml de alcohol amílico 3 metil - 1 butanol y cerrar el butirómetro.

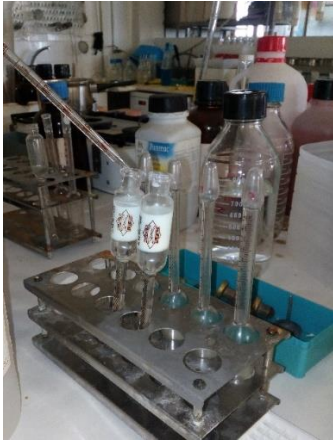


Figura 15. Adición de muestra y reactivos

Una vez añadidos la muestra y los reactivos, los butirómetros se agitan enérgicamente hasta que la leche y el ácido sulfúrico se mezclen y la proteína esté totalmente disuelta. En este paso, el butirómetro se calienta considerablemente y los productos que se forman tiñen la disolución de color rosáceo/marrón (Figura 16).



Figura 16. Aspecto de los butirómetros tras ser agitados.

A continuación, introducimos las muestras en la lactrocentrífuga previamente encendida y a una temperatura entre 50-60°C y se centrifugan a 65°C durante 10 min a 2500 r.p.m. (Figura 17).



Figura 17. Muestras preparadas y lactocentrífuga

Para la lectura del resultado, con ayuda del tapón, se coloca la columna de grasa de forma que la línea divisoria ácido sulfúrico/ grasa este sobre una de las líneas de la escala. En la escala del butirómetro se puede leer el contenido en grasa de la leche sin necesidad de hacer ningún cálculo (Figura 18).



Figura 18. Lectura del resultado directa sobre la escala del butirómetro

5 RESULTADOS

5.1 Resultados microbiológicos:

Leches Pasterizadas

* Recuento total en medio VRBG (Enterobacterias)

Se entiende por recuento total de bacterias el número de bacterias por ml o por gramo de muestra.

MEDIO VRBG						
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS			
			Leche entera pasterizada	Leche entera pasterizada	Leche pasterizada semidesnatada	Leche pasterizada semidesnatada sin lactosa
1	12/12/2017	Bolsa	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias
2	10/01/2017	Brick	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Presencia de 4 colonias
3	16/01/2018	Brick	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias
4	23/01/2018	Brick	Ausencia de colonias	Ausencia de colonias	Presencia de 5 colonias	Presencia de 4 colonias

Tabla 2. Resultados del recuento total de los distintos tipos de muestras de leche.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las muestras de los diferentes lotes, podemos observar (Tabla 2) ausencia de crecimiento en todos los lotes de las muestras de leche entera pasterizada, tanto en envase brick como en bolsa. Sin embargo, con respecto a las muestras de leche pasterizada semidesnatada (lote 5) y semidesnatada sin lactosa (lote 2 y 5) encontramos presencia de colonias de color rosáceo con presencia de halo de inhibición (Figura 19). La mayoría de los organismos que presentan estas características son Enterobacterias, sin embargo, no es completamente específico.

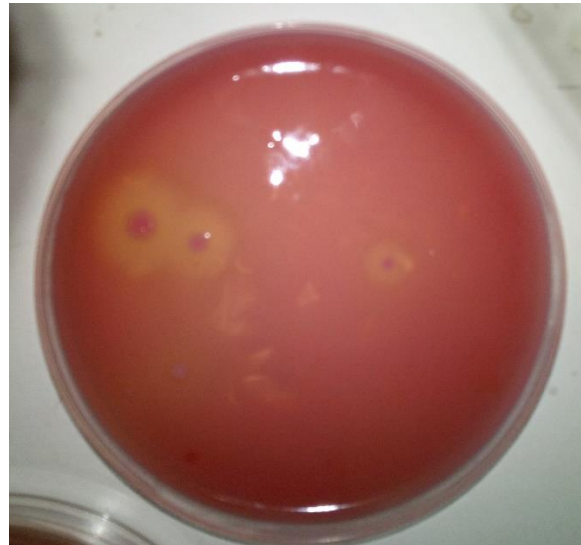


Figura 19. Presencia de enterobacterias en medio VRBG

*** Investigación (Presencia/ Ausencia) de *Listeria monocytogenes***

MEDIO ALOA						
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS			
			Leche entera pasterizada	Leche entera pasterizada	Leche pasterizada Semidesnata	Leche pasterizada semidesnata sin lactosa
1	12/12/2017	Bolsa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2	10/01/2017	Brick	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3	16/01/2018	Brick	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
4	23/01/2018	Brick	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Tabla 3. Resultados de investigación de *Listeria monocytogenes*.

La identificación de especie es importante ya que todos los miembros del género *Listeria* son capaces de contaminar alimentos, pero sólo *L. monocytogenes* produce patología en humanos.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 3, podemos decir que hubo ausencia de crecimiento en todas las muestras de los diferentes lotes con respecto *Listeria monocytogenes*, ya que se observó crecimiento de colonias de color azul-verdoso sin embargo ninguna presentaba el halo característico de la especie patógena (Figura 20).

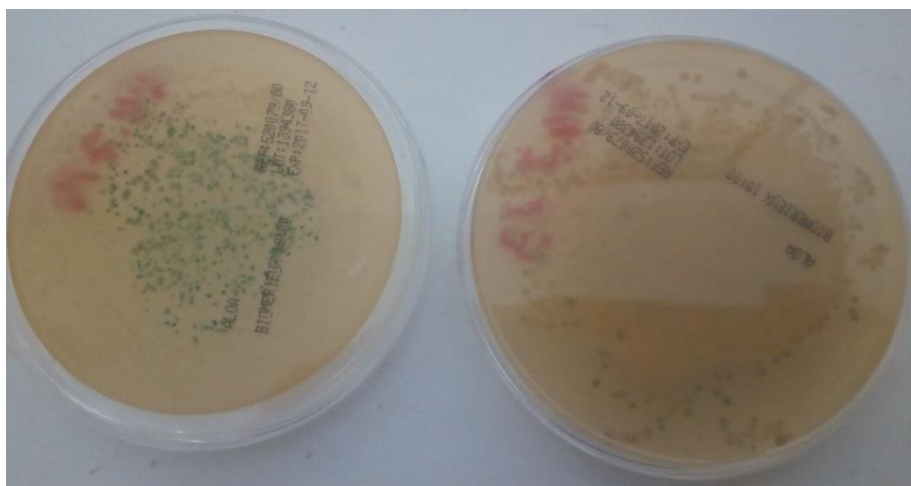


Figura 20. Crecimiento de ssp *Listeria*. Ausencia de halo de inhibición. Ausencia de *Listeria monocytogenes*.

Leches crudas:

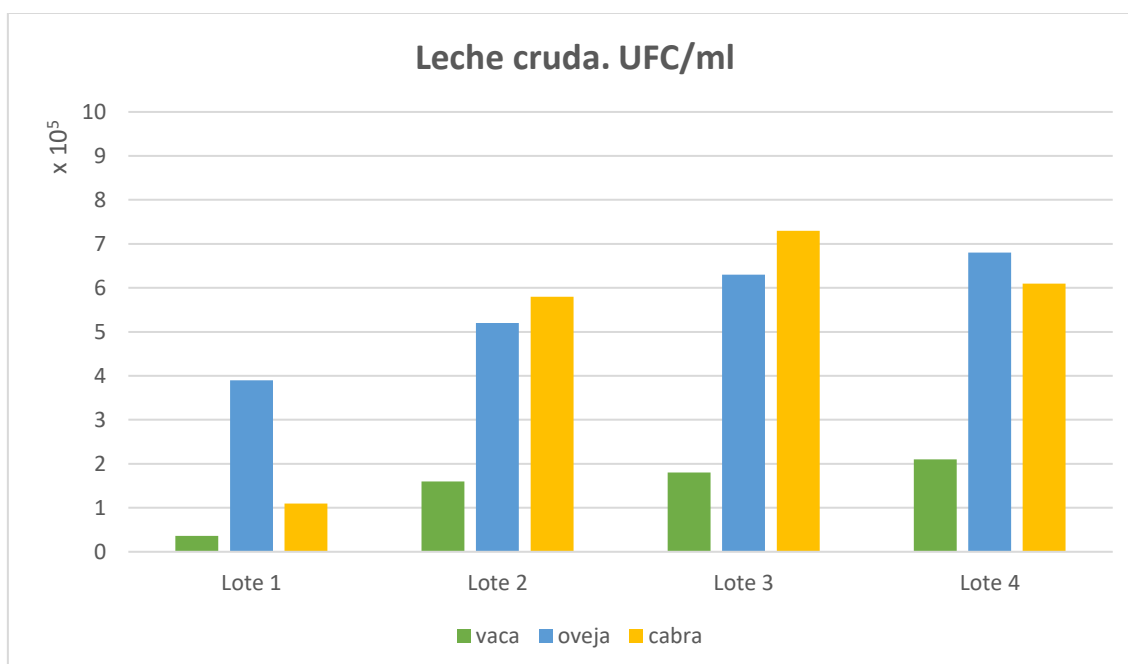
*** Recuento y carga microbiana de bacterias totales.**

Para el recuento se seleccionan las placas en las cuales el número de colonias se encuentre entre 30-300 colonias. Seguidamente, el recuento de colonias es expresado en Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro de alimento (UFC/g) que sirve para evaluar la carga microbiana de los alimentos empleados.

MEDIO PCA. UFC/ml					
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS		
			Leche cruda de vaca	Leche cruda de oveja	Leche cruda de cabra
1	11/12/2017	Bote estéril	$3,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
2	08/01/2017	Bote estéril	$1,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
3	15/01/2018	Bote estéril	$1,8 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$
4	22/01/2018	Bote estéril	$2,1 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$

Tabla 4. Resultados de la carga microbiana (UFC/g) de las distintas muestras de leche cruda sembradas en medio PCA.

En la Tabla 4, que hace referencia a los resultados obtenidos en cuanto a bacterias totales en diferentes muestras de leche cruda. Observamos mayor carga microbiana en las muestras de leche cruda de oveja y cabra, sobre todo en los lotes 3 y 4, en comparación con los resultados obtenidos en las muestras de leche cruda de vaca (Gráfica 1).



Gráfica 1. Representación de la carga microbiana de las muestras de leche cruda de diferentes especies presente en los distintos lotes.

5.2) Resultados físico -químicos:

Leches Pasterizadas

* Resultados cualitativos de fosfatasa

FOSFATASA						
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS			
			Leche entera pasterizada	Leche entera pasterizada	Leche pasterizada semidesnatada	Leche pasterizada semidesnatada sin lactosa
1	12/12/2017	Bolsa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	10/01/2017	Brick	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	16/01/2018	Brick	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	23/01/2018	Brick	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 5. Resultados cualitativos de fosfatasa

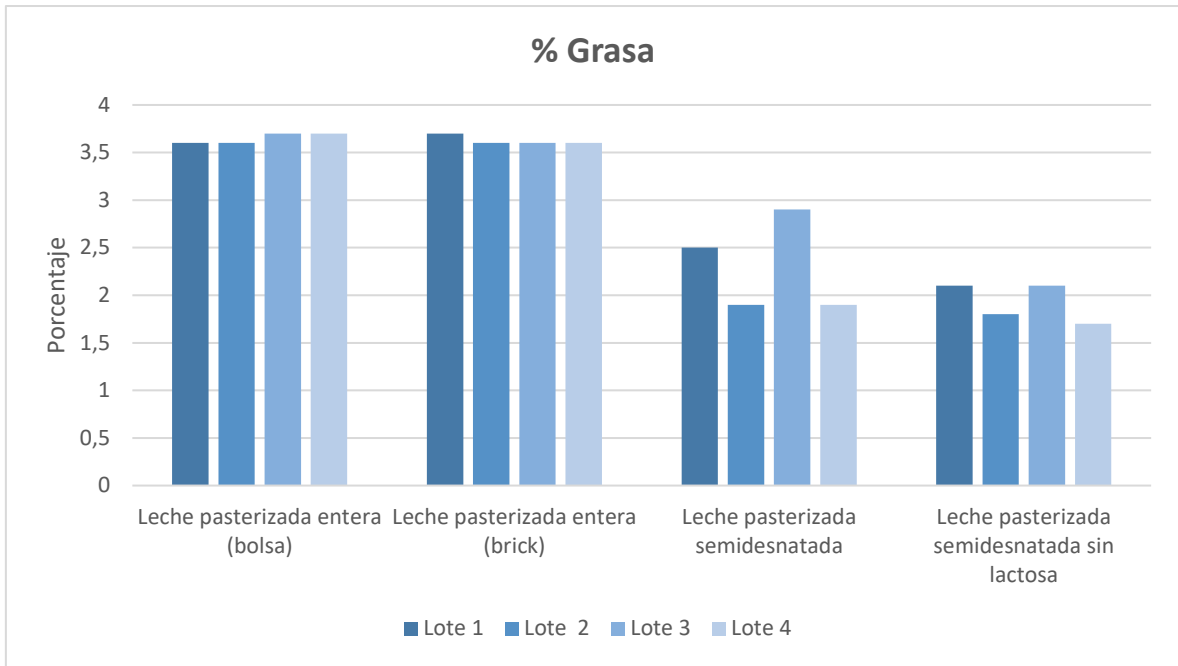
En la Tabla 5, se muestran los resultados cualitativos a cerca de la presencia de fosfatasa. La fosfatasa es una enzima presente en la leche cruda y progresivamente inactivada por calentamiento a temperaturas normales de pasterización. Podemos apreciar que en todas las diferentes muestras de leche pasterizada de los distintos lotes los resultados son negativos, indicativos de una pasterización correcta.

* **Contenido en materia grasa (%)**

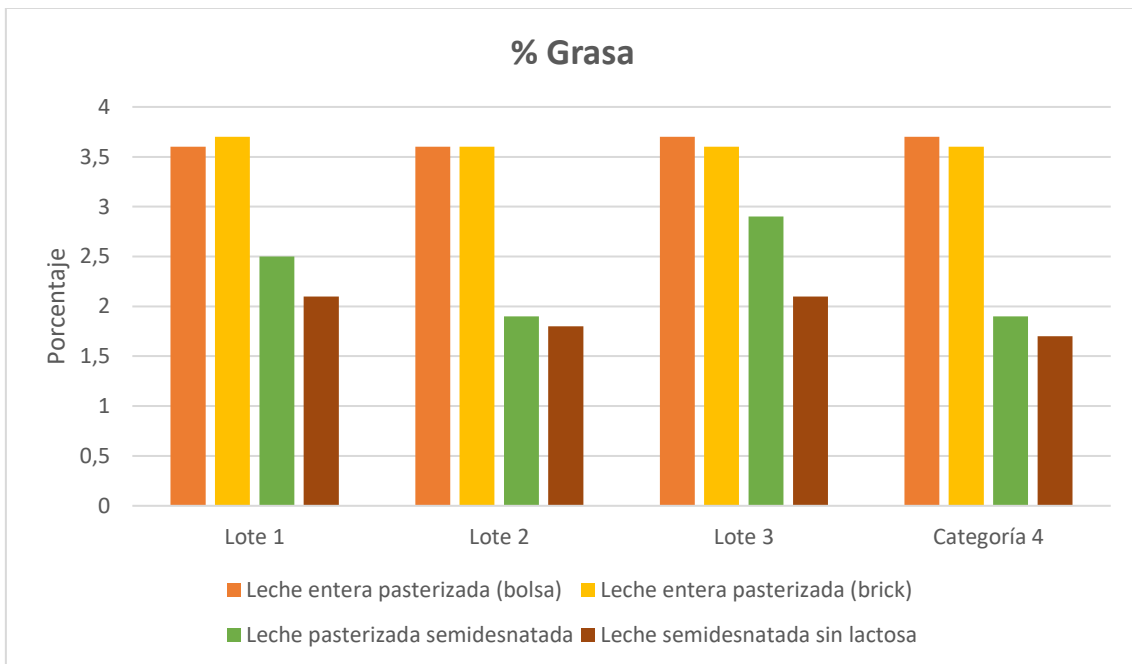
LOTE	FECHA	ENVASE	% GRASA			
			MUESTRAS			
			Leche entera pasterizada	Leche entera pasterizada	Leche pasterizada semidesnatada	Leche pasterizada semidesnatada sin lactosa
1	12/12/2017	Bolsa	3,6	3,7	2,5	2,1
2	10/01/2017	Brick	3,6	3,6	1,9	1,8
3	16/01/2018	Brick	3,7	3,6	2,9	2,1
4	23/01/2018	Brick	3,7	3,6	1,9	1,7

Tabla 6. Resultados del porcentaje de grasa en diferentes muestras de leche pasterizada.

Con respecto a los resultados reflejados en la Tabla 6, podemos decir, en cuanto al porcentaje de grasa obtenido en el mismo tipo de muestra, pero en diferentes lotes, los resultados presentan aproximadamente un porcentaje de grasa similar como se ve reflejado en la Gráfica 2. Sin embargo, comparando los distintos tipos de muestras observamos que el porcentaje de grasa de las muestras de leche entera pasterizada (bolsa y brick) presentan un porcentaje mayor que las muestras de leche semidesnatada y semidesnatada sin lactosa (Gráfica 3).



Gráfica 2. Comparación del porcentaje de grasa en diferentes lotes para el mismo tipo de muestra en leches pasterizadas.



Gráfica 3. Comparación del porcentaje de grasa entre distintos tipos de muestras.

Leches crudas:

*** Resultados cualitativos de sustancias inhibidoras**

SUSTANCIAS INHIBIDORAS						
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS			
			Leche cruda de vaca	Leche cruda de oveja	Leche cruda de cabra	
1	11/12/2017	Bote estéril	Negativo	Negativo	Negativo	
2	08/01/2017	Bote estéril	Negativo	Negativo	Negativo	
3	15/01/2018	Bote estéril	Negativo	Negativo	Negativo	
4	22/01/2018	Bote estéril	Negativo	Negativo	Negativo	

Tabla 7. Resultados cualitativos de sustancias inhibidoras en muestras de leche cruda de diferentes especies y lotes.

Los resultados mostrados en la Tabla 7 indican, en todos los lotes, ausencia de sustancias inhibidoras en las muestras analizadas. El resultado del test realizado para el análisis presentaba una coloración amarilla lo que indica un resultado negativo (Figura 21).



Figura 21. Resultado negativo del test para sustancias inhibidoras en muestras de leche cruda.

* **Resultados cuantitativos de aflatoxinas**

AFLATOXINAS					
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS		
			Leche cruda de vaca	Leche cruda de oveja	Leche cruda de cabra
1	11/12/2017	Bote estéril	< 20 ppt	< 20 ppt	< 20 ppt
2	08/01/2017	Bote estéril	< 20 ppt	< 20 ppt	< 20 ppt
3	15/01/2018	Bote estéril	< 20 ppt	< 20 ppt	< 20 ppt
4	22/01/2018	Bote estéril	< 20 ppt	< 20 ppt	< 20 ppt

Tabla 8. Resultados test de aflatoxinas.

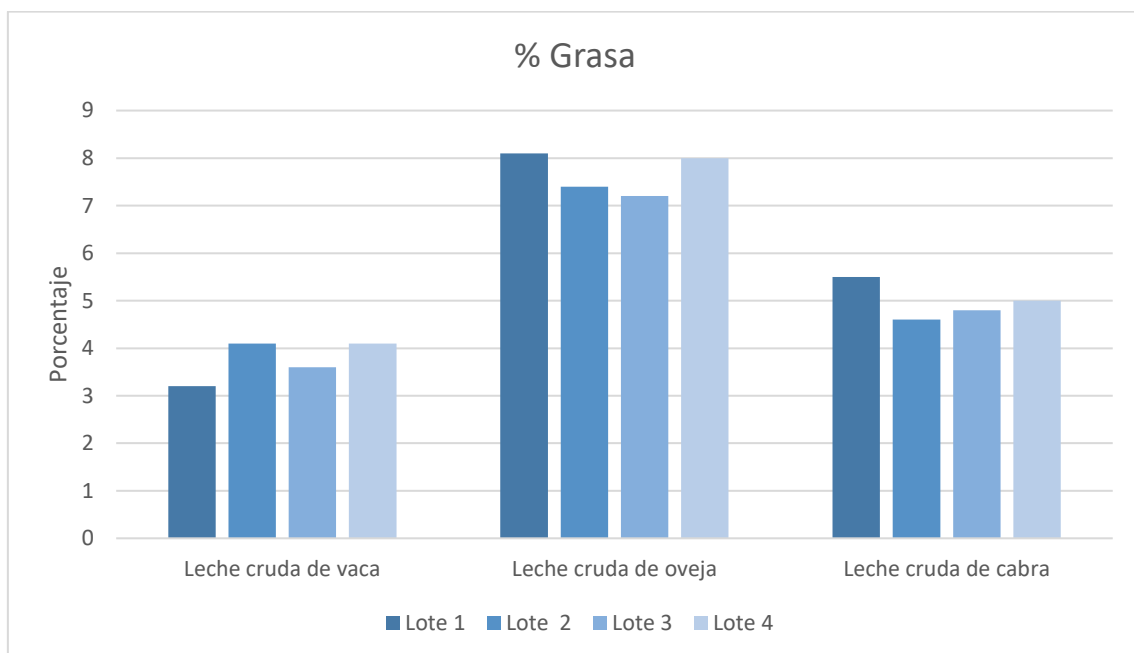
Los resultados obtenidos del análisis de aflatoxina M1, muestran una detección del metabolito inferior a 20 ppt en todas las muestras y lotes analizados (Tabla 8). Hemos de tener en cuenta que este aparato presenta un límite de detección máximo de 20 ppt y cuantifica con un margen de incertidumbre de +/- 15 ppt.

* **Contenido en materia grasa**

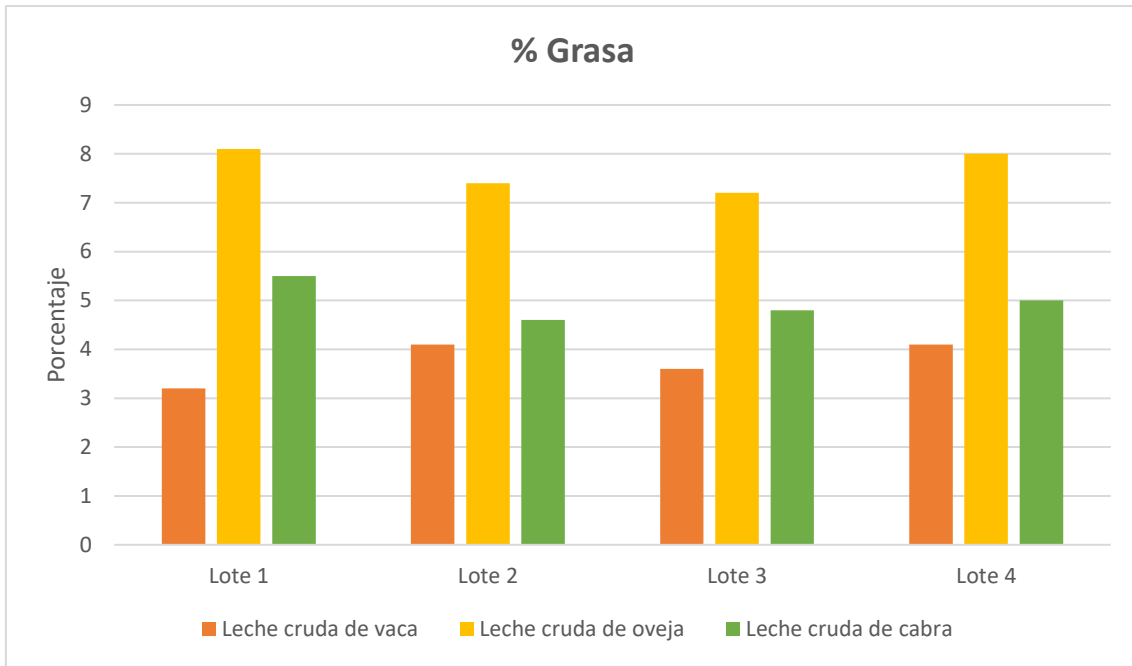
% GRASA					
LOTE	FECHA	ENVASE	MUESTRAS		
			Leche cruda de vaca	Leche cruda de oveja	Leche cruda de cabra
1	11/12/2017	Bote estéril	3,2	8,1	5,5
2	08/01/2017	Bote estéril	4,1	7,4	4,6
3	15/01/2018	Bote estéril	3,6	7,2	4,8
4	22/01/2018	Bote estéril	4,1	8,0	5,0

Tabla 9. Resultados del porcentaje de grasa de muestras de leche cruda de diferentes especies.

Los resultados reflejados en la Tabla 9 en cuanto al porcentaje de grasa, nos muestran que el mismo tipo de muestra, pero en diferentes lotes presenta aproximadamente un porcentaje de grasa similar (Gráfica 4). Sin embargo, comparando los resultados entre las diferentes especies (vaca, oveja y cabra) observamos que el porcentaje de grasa de las muestras de leche cruda de oveja es mucho mayor que el obtenido en las muestras de leche de cabra o vaca. No obstante, la leche cruda de vaca es la que presenta el menor porcentaje como podemos ver en la Gráfica 5.



Gráfica 4. Comparación del porcentaje de grasa en diferentes lotes para el mismo tipo de muestra en crudas.



Gráfica 5. Comparación del porcentaje de grasa entre las muestras de diferentes especies.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se incluyeron diferentes estudios microbiológicos y físico químicos para evaluar la calidad de las muestras de leche, tanto cruda como pasteurizada.

En la presente investigación, al evaluar la calidad sanitaria (microbiológica) de muestras de leche pasteurizada se observó ausencia de crecimiento en la mayoría de las muestras analizadas, a excepción de dos muestras en las que se encontró presencia de 3 o 4 colonias entre los recuentos de enterobacterias. Aun así, las muestras de leche pasteurizada no excedieron los límites microbiológicos permitidos. El grado de aceptabilidad de las muestras de leche pasteurizada, según lo establecido por la normativa española, fue satisfactorio.

Se empleó el método de recuento de enterobacterias (coliformes totales) en placas Pretri, utilizando como valor máximo permitido 5 UFC/ ml (Reglamento (CE) nº 2073/2005. BOE)

Los resultados obtenidos en este estudio difieren a los de otros investigadores como Luigi et al. (2013) que obtuvieron un 72% de las muestras analizadas con índice de contaminación por encima de lo permitido. Se debe mencionar que, de este porcentaje de muestras fuera del límite microbiológico recomendado, 14% exhibió una carga de microorganismos por encima de 10 UFC/ml.

Por ejemplo, Valbuena et al. (2004), donde reportaron recuentos desde $4,0 \times 10$ UFC/ml hasta $1,1 \times 10^3$ UFC/ml; valores tan elevados como los conseguidos por otros investigadores en Venezuela, donde en la ciudad de Maracaibo reportan valores máximos de $2,0 \times 10^4$ UFC/ ml, en la región central del país $5,8 \times 10^3$ UFC/ml y en el oriente, específicamente en Cumaná, de $1,3 \times 10^4$ UFC/ml.

Con respecto a los resultados obtenidos en el análisis de *L. monocytogenes*, su identificación se llevó a cabo por ausencia/ presencia. Observando los resultados obtenidos, no se obtuvo presencia alguna de *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras de leche pasteurizada analizadas.

Listeria monocytogenes, se ha convertido en un problema de salud pública. A pesar de que el número de personas afectadas por esta enfermedad es relativamente bajo en comparación con otras enfermedades, la mortalidad es

alta (30%). Es así como Ramírez y Pineda (2010), mencionan que la Listeriosis, puede ocurrir en adultos y niños aún en buen estado de salud, constituyendo las mujeres embarazadas un grupo de alto riesgo, en las cuales esta bacteria puede inducir abortos o nacimientos prematuros, que tienen como secuelas la hidrocefalia y deficiencia mental. Según Martino et al. (2005), «tiene un prolongado período de incubación y sus manifestaciones clínicas son muy variadas, por lo que se dificulta el diagnóstico y se eleva la letalidad».

Según Lundén et al. (2004), la mayoría de los casos reportados de esta enfermedad, a nivel mundial, se debe al consumo de leche no pasteurizada o subproductos elaborados con la misma. Brotes ocurridos a pesar de la pasteurización dejan claro que el proceso no elimina el riesgo de contaminación posterior y, por lo tanto, los alimentos pasteurizados conllevan el mismo peligro que la leche cruda.

Según Fernández–Garayzabal et al. (1986), en un estudio sobre la leche pasteurizada realizado en España, se aisló *L. monocytogenes* en 6 muestras (21,4%) de las 28 que se tomaron de leche pasteurizada que había sufrido un tratamiento térmico de 78°C durante 14 segundos.

Al evaluar la calidad de las muestras de leche cruda analizadas y teniendo presentes los valores de los límites permitidos por legislación, podemos observar que la leche cruda de vaca oscila entre unos valores medios $1,4 \times 10^5$, resultado que cumple los requisitos legales establecidos.

Los resultados obtenidos, son similares a los de otros investigadores, quienes refieren, en leche pasteurizada, recuentos medios de 10^5 como, por ejemplo, Cepero et al. (2005), encontraron recuentos promedios de $2-3 \times 10^5$ UFC/ml.

En cuanto al contenido microbiano de la leche cruda en Venezuela, Román et al (2003), analizaron muestras refrigeradas de leche cruda y reportaron un promedio de la carga de bacterias aerobias mesófilas de $5,2 \times 10^7$ UFC/ml. Otros autores como Román et al. (2003) y Revelli et al. (2004), reportaron medias por encima de 10^7 UFC/ml y 10^5 UFC/ml, respectivamente. De manera similar, Dávila et al. (2006), señalan recuentos de $1,5 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^6$ UFC/ml. Asimismo, Sraïri et al. (2006), reportaron al analizar muestras de leche cruda, una media de $4,2 \times 10^8$ UFC/ml. Con relación a este tema, es importante destacar que, entre otros

autores, Díaz (2000), comentó que cuando la leche cruda es de mala calidad microbiológica, aún, cuando se apliquen procesos de higienización, se puede correr el riesgo de accidentes indeseables en la elaboración de productos diversos, con las consiguientes pérdidas económicas, así como la posibilidad de encontrar patógenos en el producto final que implican riesgos a la salud del consumidor.

Con respecto a los resultados obtenidos en leche cruda de oveja y cabra, estos oscilaron entre los 1×10^5 y 7×10^5 UFC/ml, por lo que se encuentran dentro de los límites permitidos tomando en consideración que se ha establecido como recomendación un recuento menor de $1,5 \times 10^6$ en leche cruda de oveja y cabra (Reglamento (CE) nº 2073/2005. BOE).

En cuestión de resultados físico-químicos podemos decir, que promedio de los porcentajes de leche cruda de vaca fue del 3,7%, un valor similar al propuesto por Calderón et al. (2012), que reportaron medias con un valor de 3,7% en sus muestras analizadas. Valores similares a los reportes del 3,44% y 3,66% por Calderón et al. (2006), en el Sinú y Calderón et al. (2007), en Montería.

El promedio de leche cruda de cabra es del 5%, resultados similares a los que describieron Frau et al. (2007), con una media del contenido porcentual de grasa de $5,21 \pm 0,54\%$. Fue superior a los informados por otros autores para rebaños de la misma raza: Misiunas et al. (1999), $4,81 \pm 0,28\%$; Soryal et al. (2005), $4,37 \pm 0,57\%$ y Álvarez y Paz (1998), 4,91%, mientras que Páez et al. (1996) determinaron tenores de grasa superiores en leche de cabra cruzadas Criollas x Anglo Nubian ($6,30 \pm 0,90\%$).

Según el Reglamento (CE) nº 2597/97, en lo que respecta al porcentaje de grasa obtenido en leches pasteurizadas, presentaron unos porcentajes promedios que se encuentran dentro de los márgenes legales en leches enteras. Sin embargo, las muestras de leche semidesnatada exceden los límites legales.

Los antibióticos vienen siendo utilizados como agentes terapéuticos, promotores de crecimiento y profilácticos en la producción de animales de granja desde hace tiempo (Sawant et al., 2005), donde aquellos pertenecientes a los grupos β -lactámicos y las tetraciclinas son los más comúnmente usados (Berenguel, 1990; Jevinova et al., 2003; Sawant et al., 2005). El empleo de estos agentes

antimicrobianos en el tratamiento de animales resulta en la excreción de residuos a través de los fluidos o secreciones corporales como la orina y la leche, así como su acumulación en tejidos corporales (Adesiyun et al., 1997).

La presencia de residuos de antibióticos en leche ha llegado a ser una de las principales preocupaciones para la industria lechera (Jones y Seymour, 1988), debido a que pueden ocasionar diversos problemas en la salud pública, así como en los procesos industriales, en especial a los que involucran tratamientos fermentativos de la leche (Nascimento et al., 2001). Por esta razón, las empresas lácteas monitorean permanentemente la presencia de estos residuos en la leche que acopian y los resultados son considerados en sus políticas de pago (IDF, 2002); inclusive, en ciertos países, las regulaciones gubernamentales prohíben la presencia de residuos de antibióticos en la leche destinada al consumo humano (Ruegg et al., 2000).

Los resultados de nuestro estudio indicaron ausencia de inhibidores en las muestras de leche cruda analizadas, resultados contrarios a los presentados por Ortiz et al. (2008), cuyos resultados indicaron una alta frecuencia de muestras contaminadas por β -lactámicos dentro del grupo de muestras positivas a inhibidores en leche de vacas de la cuenca de Arequipa, en concordancia con estudios previos realizados en la misma región (Sanz, 2001).

Asimismo, Noa-Lima et al. (2009) detectaron 26 (9.8%) muestras positivas de un total de 264 analizadas; de ellas 20 fueron de leche pasteurizada con un total de 144 muestras, y 6 de leche cruda en las 120 muestras recibidas en todo el periodo de muestreo. Estos resultados son similares a los publicados en Corea por Chung et al. (2008), quien reportó 21 muestras positivas de 269 analizadas mediante un método microbiológico.

Las aflatoxinas son metabolitos fúngicos que se encuentran en alimentos. Cuando los rumiantes ingieren alimentos que contienen aflatoxina B1 (AFB1), esta toxina se metaboliza y la aflatoxina M1 (AFM1) se excreta en la leche.

El interés por las aflatoxinas aumentó en la década de 1960 cuando se identificó esta clase de micotoxinas por primera vez después de que se produjera un brote de micotoxicosis aguda relacionada con la alimentación en Inglaterra (Blount et al., 1961). Desde entonces, diferentes estudios atribuyeron a estos compuestos

algunos efectos tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e inmunosupresores en animales y humanos, definiendo al hígado como el principal órgano diana (Meissonnier et al., 2007). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) evaluó los estudios epidemiológicos y de laboratorio e indicó que las flatoxinas son cancerígenas (Grupo 1) y potencialmente carcinogénicas para los humanos (Grupo 2B).

Los tratamientos térmicos como la pasteurización generalmente no disminuyen la concentración de AFM1, por lo que en el presente trabajo se estudió la presencia de AFM1 en leche cruda en los que se obtuvieron resultados negativos en todas las muestras de leche analizadas. El resultado difiere de lo reportado por Landeros et al. (2012), los cuales detectaron AFM1 en el 100% de las muestras estudiadas, con niveles en el rango de < 0.005 a 0.100 µg/L y de < 0.005 a 0.637 µg/l en leche cruda y pasteurizada respectivamente.

En Argentina, López et al. (2003) reportó la presencia de AFM1 en el 23 % de muestras estudiadas (leche cruda, en polvo y pasteurizada), en todos los casos los niveles fueron inferiores a los permitidos para este producto.

Los resultados obtenidos con respecto a la prueba de la fosfatasa en leches pasterizadas indicaron la ausencia de esta en todas las muestras analizadas. Se encontraron similitudes con los resultados ofrecidos por Faría et al. (2000) en los que se observa que la prueba de la fosfatasa alcalina para muestras de leche pasterizada es negativa.

La ausencia de fosfatasa alcalina ha sido universalmente aceptada como la evidencia de una eficiente pasteurización en leche (Reynolds et al., 1967)

7. CONCLUSIONES

- La calidad microbiológica de la leche pasteurizada determinada en los estudios de esta investigación, en su totalidad cumplieron con los límites establecidos por sus respectivas normas de calidad higiénica sanitaria, indicando ausencia de riesgo de adquirir enfermedades de transmisión por alimentos. Los resultados son indicativos de una pasteurización correcta. Se han incorporado criterios de valoración como son el recuento de Enterobacterias y la investigación de *Listeria monocytogenes*.
- La calidad higiénica sanitaria de la leche cruda de vaca, oveja y cabra se encontraron dentro de los límites permitidos por la legislación española en lo que respecta al número de bacterias totales establecidos.
- La presencia de sustancias antimicrobianas o inhibidores determinada en las muestras de leche cruda de las diferentes especies animales, cumplen con las normativas exigidas dentro del marco legal para la salud pública.
- Los niveles de aflatoxinas M1 determinados en el estudio de leche cruda de vaca, oveja y cabra, cumplen con legislación Europea que establece que la leche destinada al consumo directo y a la fabricación de productos lácteos no debe contener una concentración de Aflatoxina M1 (AFM1) que exceda las 0,05 µg/Kg (0,05 ppb o 50 ppt).
- Los valores obtenidos con respecto al contenido de materia grasa en leches pasteurizadas enteras se encuentran dentro del rango legal con unos valores que alcanzan como mínimo un 3,50% (m/m). Sin embargo, el contenido en materia grasa de la mayoría de las muestras de leche semidesnatada mostró valores que exceden los niveles permitidos (mínimo 1,5% y máximo 1,8%) para dicho parámetro.
- El contenido en materia grasa estudiado en leche cruda de vaca, oveja y cabra se encuentran dentro de los rangos de normalidad, siendo la leche cruda de vaca la que presenta un menor porcentaje graso, seguida de la

leche de cabra y por último la leche de oveja que es la que presenta con diferencia un mayor porcentaje de materia grasa. Hemos de tener en cuenta que el contenido de materia grasa de la leche varía en gran medida según la raza y la genética animal, además de otros factores como la alimentación, la época del año, el estado de lactación del animal y el número de partos y el manejo y estado sanitario del animal.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adesiyun, A.A.; Webb, L.A.; Balbirsingh, V. (1997). Prevalence of antimicrobial residues in preprocessed and processed cows' milk in Trinidad. *J Food Safety* 16: 301-310.

Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Editorial Reverte, S. A.

Alcayaga, S.; Hott, B. (2008). *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Rev Chil Salud Pública*; Vol 12 (3): 188-195.

Agudelo G., D. A.; Bedoya M., O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, vol. 2, núm. 1, enero-junio, 2005, pp. 38-42

Álvarez, R.; Paz, R.; Usandivaras, P.; Castaño, L.; Lamadrid, S; Togo, J. (2000). Evaluación de la producción láctea en explotaciones caprinas de la provincia de Santiago del Estero. *Revista de Investigaciones de Ciencia y Técnica de la UNSE* Nº 5, pág: 45-53.

Apella, M.C.; González, S.N.; Nader de Macías, M.E.; Romero, N.; Oliver, G. (1992). In vitro studies on the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. *Journal Applied Bacteriology* 73: 480-483.

Araneda, M. (2018). *Leche y derivados Composición y propiedades*.

Barcina, Y.; Zorraquino, M. A.; Pedauye, J.; Ros, G.; Rincón, F. (1987). Azidiol as a preservative for milk samples.

Baró R., L.; Lara V., F.; Corral R., E. (2010). *Leche y derivados lácteos. Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. 2º Edición. Editorial panamericana. Cap 1.pp: 1-25

Barranco S., A. (s.f). Página Oficial Laboratorios CONTROLAB.
<http://www.laboratorioscontrolabjaen.com/>

Berenguel J.L. (1990). Investigación de residuos de antibióticos en leche fresca en la provincia de Arequipa de mayo a setiembre de 1990.

Blount, W.P. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys* 1961, 9, 52–54. 2.

BOE (1967). Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. BOE 248 de 17 de octubre de 1967, pp: 14180-14187.

Burbano E., M.; Carrascal A., K.; Mercado, M.; Poutou, R. (2004). Validación de PCR para *Listeria Monocytogenes* en leches.

Calderón, A.; García, F.; Martínez, G. (2006). Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*. 11:725737.

Calderón, A.; Rodríguez, V.; Arrieta, G.; Martínez, N.; Vergara, O. (2012). Physicochemical and microbiological quality of raw milk in livestock enterprises dual purpose system in montería (Cordoba)

Calderón R., A.; Rodríguez, R., V.; Vélez R., S. 2007. Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el municipio de Montería. *Rev. MVZ Córdoba*. 12:912-920.

Campagnollo, F.B., Ganev, K.C., Khaneghah, A.M., Portela, J.B., Cruz, A.G., Granato, D., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F., Sant'Ana, A.S., (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: a review. *Food Contr.* 68, 310–329.

Carrillo, L.; Audisio, M. C. (2007). *Manual de Microbiología de los Alimentos*.

Cepero, O.; Aguiar, J.; Pérez, I. (2005). Efecto de los campos magnéticos en la conservación de la leche cruda sin refrigerar. *REDVET* 2005; 8: 1-12.

Cheftel, J.C. Cheftel, H. (2000). *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos, Volumen 1* Editorial Acribia, Zaragoza, España, 2000. p 48

Chung H.H.; Jung, L.; Yun-Hee, C. (2008) Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. Volume 113, Issue 1; Pages 297-301.

Claeys, W., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Contr.* 42, 188–201.

Codex Alimentarius (2004). *Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos*. CAC/RCP 572004.

Dávila, J.; Reyes, O. (2006). Evaluación Microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso tipo Gouda en una Industria Venezolana. *ALAN* 2006; 56:51-59.

Deibel, R. H.; Hartman, P.A. (1984) The enterococci, in Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd edn, (ed. M.L. Speck), American Public Health Association, Washington, DC pp. 405-7.

De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne, M., Christiaens H., Verstraete W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of *Lactobacilli*. J Appl Bacteriol 79:292-301.

Díaz, C. (2000). Microbiología de la leche y de los productos lácteos. Vol. I. Editorial Venezolana C.A. Mérida. Venezuela. 270 pp.

Dogan, B.; Boor, K.J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. Applied Environmental Microbiol 69: 130-138.

Early, R. (1998). Tecnología de los productos lácteos. Aspen Publisher.

Escobar M., A. (2014). Adulteraciones frecuentes en la leche y otros productos lácteos

FAO/STAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FeNIL y Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, (2014). Libro Blanco de los Lácteos. 2ª Edición. Madrid.

Fernández – Garayzabal, J.F. Dominguez- Rodríguez, L., Vazquez -Boland, J.A., Blanco- Cancelo, J.L., Suarez- Fernandez, G. (1986). *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. Canadian Journal of Microbiology, 32, 149-50.

Faría R., J.F.; García U., A.; Garcia, A.; Tovar V., A. (2000) eficiencia de la pasteurización de la leche de cabra en una miniplanta procesadora de queso. Revista Científica FCV-LUZ/ Vol. X, N°2, 119-123.

Frau, S.; Pece, N.; Font, G.; Paz, R. (2007). Calidad composicional de leche de cabras de raza Anglo Nubian en Santiago Del Estero.

Fuglsang, A., Nilsson, D., Nyborg, N.C.B. (2002). Cardiovascular Effects of Fermented Milk Containing Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Evaluated in Permanently Catheterized, Spontaneously Hypertensive Rats. *Applied Environmental Microbiol* , 68: 3566-3569.

García M., E.; Fernández S., I.; Fuentes L., A. (2013). Determinación del contenido en grasa de la leche por el método Gerber.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., Swings. J. (2002). Source of *Enterococci* in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Applied and Environmental Microbiol* 68: 3560-3565.

Gil. A., (2010). Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2º Edición. Editorial panamericana

Gilliland, S.E., Kim, H.S. (1984). Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *Journal Dairy Science* 67: 1-6.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L. (1977). Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer*, 40: 2421-2426.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L. (1984). The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 39: 756-761.

Gomez, M. (2005). Tecnología de lácteos.

González S.; Albarracín, G.; Locascio de Ruiz Pesce, M.; Male, M.; Apella, M. C.; Pesce de Ruiz Holgado, A.; Oliver, G. (1990). Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. *M A N* 8: 349-354.

ICMSF. (1998). Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, London, p 521.

IDF (International Dairy Federation) (1985). Definitions of heat treatments as applied to milk and milk products. D-Doc 32, Annual Session, 1985. Auckland, New Zealand.

IDF. International Dairy Federation. (2002). Payment systems for ex-farm milk. Brussels: IDF. Bull N° 379/2002. 65 p

Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). Modern Food Microbiology. 7^o ed. Springer, New York, p 149.

Jevinova, P.; Dudrikova. E.; Sokol, J.; Nagy, J.; Mate, D.; Pipova, M.; Cabadaj, R. (2003). Determination of oxitetracycline residues in milk with the use of HPLC method and two microbial inhibition assays. Bull Vet Inst Pulawy 47: 211-216.

Jones G.M.; Seymour E.H. 1988. Cowside antibiotic residue testing. J Dairy Sci 71: 1691-1699.

KIRK, R.S., SAWYER, R., EGAN, H. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. 2 ed. México: Compañía Editorial Continental S.A. de C.V, 1996. 777p.

Landeros, P.; Noa, M.; López, Y.; González, D.G.; Noa, E.; Real, M.; Juárez, C.; Medina, M.S. (2012). Niveles de aflatoxina m1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. Rev. Salud Anim. Vol. 34 No. 1: 40-45

Lerche, M. (1969). Inspección veterinaria de la leche. Ed Acribia; Zaragoza España,; p 188.

López, C.; Ramos, L.; Ramadán, S.; Bulacio, L. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 2003;14:3134.

López, A.L.; Barriga, D.; Jara, J.; Ruz, J.M. (2015) Córdoba. Determinaciones analíticas en leche. Consejería de Agricultura y Pesca, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. –1-26 p.

Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper, B.R., Heinz, K., Magrum, L., WOESE, C.R., Fox, G.E., Estackebrandt, E. (1985). The Phylogenetic Position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of General Microbiology* 131, 543–551.

Luigi, T.; Rojas, L.; Valbuena, O. (2013) Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela *Salus*, vol. 17, núm. 1, abril, 2013, pp. 25-33 Universidad de Carabobo Bárbula, Venezuela

Lundén, J.; Tolvanen, R.; Korkeala, H. (2004). Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Sci* 87: E6-E12.

Mc Gee, H. (2010). Leche y Productos lácteos. La cocina y los alimentos. Enciclopedia de la ciencia y la cultura de la comida.

Mackey, B.M.; Bratchell, N. (1989). The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. A review. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 89—94

Madera, C., Monjardín, C., Suárez, J.E. (2004). Milk Contamination and Resistance to Processing Conditions Determine the Fate of *Lactococcus lactis* Bacteriophages in Dairies. *Applied Environmental Microbiol* 70: 7365-7371.

Marchese, S.; Polo, A.; Ariano, A.; Velotto, S.; Costantini, S.; Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development.

Martino T., Leyva, V.; Pérez, A.; De los Reyes, M.; Suárez, F.; César Lara, C. (2005). Determinación de *Listeria* spp, en Quesos y Embutidos Comercializados en Cuba; Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. INHA.

Mc Donough F.E., Wells, P., Wong, N.P., et al. (1983). Role of vitamins and minerals in growth simulation of rats fed yogurt. Fed Proc 42: 556.

Meissonnier, G.M.; Laffitte, J.; Loiseau, N.; Benoit, E.; Raymond, I.; Pinton, P.; Cossalter, A.M.; Bertin, G.; Oswald, I.P.; Galtier, P. (2007) Selective impairment of drug-metabolizing enzymes in pig liver during subchronic dietary exposure to aflatoxin B1. Food Chem. Toxicol. 2007, 45, 2145–2154.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Republica de Colombia. Boletín de análisis por producto, Boletín N° 6 Febrero de (2010), Grupo de Análisis Sectorial Leche.

Misiunas S., Cravero, B.; Rodríguez, V.; Aimar, M. (1999). Utilitation of *Opuntia ficus-indica* in dairy goats feeding: effect on ruminal environment, milk yield and chemical composition. Therios, 28 (149):209-215

Mossel D.A.A.; Moreno, B.; Struijk, C.B. (2003). Microbiología de los Alimentos. 2º ed. Acribia, Zaragoza, p 506, 636

Nascimento G., G.F.; Maestro, V.; Campos M., S.P. (2001). Ocorrência de residuos de antibioticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. Rev Nutr 14(2): 119-124.

Noa-Lima, E.; Noa, M.; González, D.G.; Landeros, P.; Reyes, W. (2009). Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. Rev. Salud Anim. Vol. 31 No. 1: 29-33.

Oozeer R.; Leplingard, A.; Mater, D. G.; Mogenet, A.; Michelin, R.; Seksek, I.; Marteau, P.; Doré, J.; Bresson, J.L.; Corthier, G. (2006). Survival of *Lactobacillus casei* in the Human Digestive Tract after Consumption of Fermented Milk. Applied Environmental Microbiology 72: 5615-5617.

Ortiz Z., C.; Vera A., R.; Cayro, J. (2008). Frequency of β -lactams and tetracyclines in raw milk in the arequipa milkshed. Rev Inv Vet Perú ; 19 (2): 140-143.

Oteo, J., Alós, J.I. (2009). *Listeria* Y Listeriosis. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid.

Perdigón, G.; B. de Jorrat, M.E.; F. de Petrino, S.; Valverde de Budeguerl, M. (1991). Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on various biological functions of the host. Food Agricultural Immunology 3: 93-102.

Perlera de Escalante, A., E. (2015). Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal producido en el departamento de Cabañas.

Rahmania, J.; Alipourb, S.; Miric, A.; Fakhriz, Y.; Riahi, S.M.; Keramatif, H.; Moradig, M.; Amanidazh, N.; Pouyai, R.H.; Bahmanij, Z.; Mousavi Khaneghahk, A.; (2018). The prevalence of aflatoxin M1 in milk of Middle East region: A systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. Revista: Food and Chemical Toxicology.

Ramírez E., y Pineda S. (2010). Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos, artesanales y hortalizas. Revista Ciencia y Tecnología, Latín América Journals online.

Revelli, G.; Sbodio, O.; Tercero, E. (2004). Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Rev Argent Microbiol. 2004; 36: 145-149.

Reynolds, R.G; Telford, J.P. (1967). Application of An Automated Procedure to the milk Phosphatase Test. Journal of Milk and Food Technology. 30 (1): 35-39.

Roca R., A. (2017). Las vitaminas de la leche. <https://www.lechepuleva.es/la-leche/vitaminas-leche>

Román, S.; Guerrero, L.; Pacheco, L. (2003) Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. Rev Cient FCV-LUZ; 13: 146-152.

Román, S.; Guerrero, L.; Pacheco, L. (2003) Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. Rev Cient FCV-LUZ; 13: 146-152.

Rosa, D.D., Dias, M.M., Grześkowiak, Ł.M., Reis, S.A., Conceição, L.L., Maria do Carmo, G.P., (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr. Res. Rev.* 30, 82–96.

Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Reglamento (CE) nº 2597/97 del Consejo, de 18 de diciembre de 1997, por el que se establecen las normas complementarias de la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos en los que se refiere a la leche de consumo.

Ruegg P., L.; Tabone T., J. (2000). The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J Dairy Sci* 83: 2805-2809.

Sabena, G.2009. Leche. Producción láctea. Capítulo 3: Microorganismos en la leche cruda.

Sanz, B. (2001). Residuos de antibióticos e inhibidores en leche cruda en hatos en las cuencas lecheras de Arequipa, Moquegua y Tacna 2000. Tesis de Biología. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

Sawant A.A.; Sordillo L.M.; Jayarao B.M. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal Dairy Science* 88: 2991-2999.

Schleifer K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and Related *Streptococci* to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 183-195.

Shahbazi, Y., Ahmadi, F., Fakhari, F., (2016). Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: an emphasis on permissible limits and risk assessment of exposure to heavy metals. *Food Chem.* 192, 1060–1067

Sharpe, M.E (1981). *The Prokaryotes*. Vol. II., Starr, M.P. eds. Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1679. 5.

Soryal, K.A.; Zeng, S.S.; Min, B.R.; Hart, S.P.; Beyene, F.A. (2004) Effect of feeding systems on composition of goat milk and yield of Domiati cheese. *Small Ruminant Research* 58 275-281.

Spreer, E. (1991). *Lactologia Industrial* 2 ed. Acribia, Zaragoza

Srairi, M.; Moudnib, J.; Rahho, L.; Hamama, A. (2006). How do milking conditions affect the hygienic quality of raw milk. Case study from Moroccan dairy farms. *Liv. Res. Rural. Develop.* 2006; 18 (97).

Torres-Lindarte, G., Vidal-Arboleda, J., Caraballo Guzmán, A., Vargas-Hoyos, K., Olivera-Angel, M. (2017). Efecto del conservante azidol sobre la detección por cultivo microbiológico de bacterias causantes de mastitis bovina.

Ucha, F. (2013). Lácteos. <https://www.definicionabc.com/general/lacteos.php>

USFAO, (2008). Dairy farm numbers world wide. Global dairy sector: status and trends. <http://www.fao.org/docrep/012/i1522e/i1522e02.pdf>.

Valbuena, E.; Castro, G.; Lima, K.; Acosta, W.; Bríñez, W.; Tovar, A. (2004). Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Veterinaria. Rev Cient FCV-LUZ* 2004; 14: 1-14.

Vázquez-Ojeda, E.; Pérez-Morales, E.; Hurtado-Ayala, L.; Alcántara-Jurado, L. (2014). Evaluación de la calidad microbiológica de la leche. Revisión Sistemática de 2003-2013.

World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC Press: Lyon, France, 2002; Volume 82, pp. 171–300. 3.

World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; IARC Press: Lyon, France, 1993; Volume 56, pp. 245–395.

Yoldi B., G.; Muñoz H., M. “Leche y derivados”. (1999) Alimentos: composición y propiedades. (MARTÍNEZ, J.A.; ASTIASARÁN, I. Eds.). Pamplona. Ed. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. EUROGRAF. p. 84

Páginas web consultadas.

<http://www.contextoganadero.com/blog/adulteraciones-frecuentes-en-la-leche-y-otros-productos-lacteos>

<http://www.zeulab.com/es/productos/toxinas/27-aflasensor.html>

<http://www.zeulab.com/es/productos/residuos-veterinarios/56-eclipse-50.html>

<http://www.fao.org/dairy-production-products/products/tipos-y-caracteristicas/es/>