

**Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL.
Cátedra de Tecnología de la leche.**

MICROBIOLOGIA DE LA LECHE – Año 2007.

Dr. Gerónimo E. Heer

Introducción:

La leche debido a su compleja composición bioquímica y por su alto contenido de agua, es un buen sustrato para los microorganismos saprófitos y también para los patógenos que la utilizan como sustrato para su reproducción.

La actividad de las bacterias saprófitas prácticamente no tiene influencia sobre la salud, pero son indicadoras de:

- la higiene en el ordeño, y la
- posterior conservación de la leche.

Generalidades.

Entre la flora bacteriana existente en:

- la leche cruda,
- leche pasteurizada, y
- productos lácteos

hay importantes diferencias. Intervienen muchas variables y el tipo de bacterias y la contaminación de productos alimenticios dependen de:

1. Los microorganismos pueden producir cambios deseables en las características físico químicas de la leche durante la elaboración de diversos productos lácteos.
2. Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor.
3. Los microorganismos pueden causar alteraciones de la leche y productos lácteos afectando la calidad de sus subproductos.

Contaminación inicial de la leche.

Una vez que la leche ha atravesado el canal del pezón tiene un determinado número de bacterias. Es importante diferenciar y conocer el contenido de bacterias antes y después de la secreción.

Es fundamental obtener leche con un **bajo recuento inicial de bacterias y refrigerarla inmediatamente a 4 – 8°C**. Si se logra eso, tendremos bacteriológicamente hablando, una excelente materia prima.

Para lograr una leche de buena calidad bacteriológica, es fundamental la participación y la autogestión de los tamberos.

Contenido de bacterias de la leche antes de la secreción.

Infecciones de la ubre. En infecciones agudas el contenido de bacterias de cuartos individuales al comienzo del ordeño puede superar el 1.000.000/ml (Ej: mastitis debidas a *Streptococcus agalactiae*). La leche de los cuartos con infecciones subclínicas debidas a

Streptococos y estafilococos contienen alrededor de 25.000 bacterias/ml en la leche mezcla de los cuartos. Infecciones latentes debida a estafilococos y estreptococos contienen alrededor de 40.000 bacterias/ml en el comienzo del ordeño y unas 3.000/ml. en la leche mezcla de los cuartos.

Canal del pezón: tiene una flora muy variada. Hay *Staphilococcus aureus* coagulasa positivos, Micrococcaceae, Corinebactrerium (especialmente bovis), estreptococos no patógenos. Aún cuando se toma una muestra de leche desinfectando bien la punta del pezón (durante 20 segundos con alcohol al 80%), no es posible eliminar esa flora. Trabajos de investigación han demostrado que la única forma de evitar esa flora del canal del pezón es, obtener la muestra de leche mediante punción de la cisterna de la ubre o del pezón. También se ha demostrado que no todas las bacterias que viven sobre la piel son capaces de desarrollarse en el canal del pezón. En la piel predominan los micrococos y no así en el canal del pezón. Mientras que los estafilococos, que no predominan en la piel, lo hacen en el canal del pezón.

Contaminación postsecretoria.

Piel de los pezones: aquí se encuentra una amplia variedad de bacterias que pueden multiplicarse en los restos de la leche (cuando quedan restos de leche en los equipos por deficiente lavado). No obstante estas bacterias no influyen demasiado (son bacterias que aún no están adaptadas a leche) en el recuento total de bacterias.

La proporción de bacterias provenientes de la piel de los pezones puede ser significativa cuando se ordeñan pezones sucios con barro y bosta, por el “efecto de lavado de los pezones” (teat washing effect). Eso es fácil de comprobar: si se ordeñan pezones sucios, al retirar las unidades de ordeño los encontramos limpios.

Las bacterias provenientes de la materia fecal como *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, tienen un rol muy importante (como se verá mas adelante) en la calidad de la leche y los subproductos. Estas bacterias pueden demostrarse con cultivos específicos, en el recuento total de bacterias estas no aparecen, pero como se dijo, tienen mucha influencia sobre la calidad de los productos terminados (rutina de ordeño!).

Del ambiente: con las actuales instalaciones y sistemas de ordeño, es escasa la contaminación del ambiente. Se debe fundamentalmente al polvo de los alimentos concentrados y bosta de los pisos que contaminan las pezoneras cuando éstas se caen. Las bacterias son *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, etc.

Equipamiento de ordeño y tanques de frío. Cuando estos equipos no están suficientemente higienizados, sin duda son la mas importante fuente de contaminación. La importancia aquí es doble:

- Por un lado los equipos de ordeño y de frío tienen una enorme superficie que está en contacto con toda la leche.
- Por otro lado esas bacterias en presencia de restos de leche “se adaptan” y reproducen entre los tiempos de ordeño. Como consecuencia las superficies pueden tener una gran cantidad de bacterias y además “adaptadas” a leche.

Hay trabajos que demuestran que, cuando la leche del tanque tiene mas de 100.000 UFC/ml no hay una suficiente higiene del equipamiento.

Del agua: el equipamiento de ordeño y los utensilios de ordeño deben enjuagarse con agua potable.

El agua potable en 100 ml debe contener 0 coliformes y no mas de 100 bacterias saprofitas totales.

Los contaminantes mas comunes del agua son del Gén. *Pseudomonas*. Cuando el agua está contaminada, con el enjuague las bacterias contaminan el equipamiento y éste a la leche. No existen datos ni relevamientos, pero la contaminación de los pozos de agua en los tambos es alta. La solución mas común es clorar el agua.

Las fuentes de contaminación de la leche se pueden resumir en la siguiente escala:

Bacterias provenientes del aire	100 – 1.500	UFC/ml
De la ubre	300 – 4.000	UFC/ml
Piel de los pezones	500 – 15.000	UFC/ml
Infecciones de la ubre	300 – 25.000	UFC/ml
Equipamiento	desde miles hasta millones de UFC/ml.	

Multiplicación de las bacterias en la leche.

Factores de los que dependen las asociaciones microbianas en alimentos.

Tipo y tamaño de la contaminación:

La evolución de la contaminación varía de acuerdo a la cantidad de bacterias contaminantes y al tipo de bacterias.

Factores intrínsecos:

La microflora puede ser determinada mediante factores que se encuentran en el mismo alimento (**factores intrínsecos**) entre los que deben distinguirse los factores químicos y físicos. Así de los alimentos se desprenden: la acidez, la necesidad de oxígeno de las bacterias, antimicrobianos naturales, el contenido de agua, la micro y macroestructura y su influencia sobre la microbiología de los productos.

La microflora misma puede influir sobre los factores intrínsecos de los alimentos como la viscosidad o la estructura.

Todas las influencias tecnológicas que involucran los factores intrínsecos o la microflora son denominados **factores de procesamiento**. Así por ejemplo la microflora puede influir en forma determinada sobre la acidez y alterarla (por ej. en el Yoghurt y elaboración del queso).

Los verdaderos factores intrínsecos se pueden dividir de la siguiente forma:

- **Actividad agua (A_w).**
- **pH.**
- **Valor Eh (Potencial redox).**

Actividad agua (A_w).

La disponibilidad de agua en un alimento es el agua que se encuentra libre en el mismo y es necesaria para que las bacterias se multipliquen. Este agua "no comprometido" con ningún nutriente recibe el nombre de actividad de agua (a_w). y se indica con un número que va desde 0 hasta 1.

Cuanto más cercano a cero es ese valor, menos disponible está el agua para las bacterias y mayor tiempo durará el alimento sin deteriorarse. La mayoría de los alimentos frescos tienen valores de actividad de agua cercanos a 1.

Es una medida para el agua no ligada, la que está disponible para los microorganismos.

El metabolismo y la reproducción de los microorganismos dependen del agua. No se trata del agua del ambiente, sino del agua libre disponible en los alimentos (leche, carne, etc). El agua libre disponible se denomina **actividad agua** y su medida se expresa: a_w .

Actividad de agua (aw): Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del alimento (P) y la presión de vapor de agua del agua pura (P0) a igual temperatura.

El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR). El valor aw del agua pura es = 1 (ver tabla de valores aw de los alimentos).

$$a_w = p/p_0$$

Por un lado los alimentos tienen distinta actividad agua (leche 0,98, miel 0,60, etc), por otro lado están los microorganismos que y su capacidad de poder multiplicarse en baja disponibilidad de agua.

Si un producto es conocido por su valor-aw, se puede deducir qué bacterias tienen chance de crecer en ella. Debe tenerse en cuenta que un mismo producto puede tener distinta **actividad agua** (ante todo si son de distinta partida y si fueron conservados en distinta forma).

La actividad agua mínima, en la cual todavía se pueden reproducir las bacterias, para la mayoría de las bacterias saprofitas es de 0,95. Las levaduras y hongos toleran baja actividad agua. Por debajo de 0,60 ya no hay posibilidad de crecimiento de bacterias.

Las bacterias no necesariamente mueren por un valor aw bajo, se pueden conservar por un tiempo prolongado, depende del género. Las Salmonelas por ej se pueden conservar en medios proteicos como la caseína, a un valor aw de 0,25 durante años.

Valores límites de Aw para la multiplicación de distintas bacterias			
Tipo de bacteria	Aw	Tipo de bacteria	Aw
Campylobacter	0,99	Bacillus cereus	0,93
Pseudomonas fluorescens	0,97	Listeria monocytogenes	0,92
Lactobacillus spp.	0,95	Bacillus subtilis	0,90
Salmonella spp.	0,95	Staphylococcus aureus	0,83
Escherichia coli	0,95	Hongos, Levaduras	0,88 – 0,77

Valor agua de distintos alimentos	
<i>Alimento</i>	<i>Valor aw</i>
Leche, pescado	0,98
Queso Gouda	0,98 – 0,93
Salame, jamón, leche condensada	0,85 – 0,93
Extracto de carne, pescado salado, frutas desecadas	0,60 – 0,85
Chocolate, miel, leche en polvo	0,60

Valor pH

Divide en campo ácido – neutral - alcalino, la posibilidad de actuar de las bacterias en alimentos crudos (materias primas) o elaborados

La conservación de alimentos en medio ácido, por ej. productos lácteos fermentados, algunas clases de salame, chucrut, etc y muchas veces combinado con otros factores (baja actividad agua, calentamiento, agregado de conservantes) es una práctica de hace miles de años.

Los microorganismos se multiplican en un amplio rango de pH. toleran mejor el medio ácido que el alcalino. Dentro de un mismo grupo de bacterias se pueden encontrar diferencias en cuanto al pH óptimo (ver Tabla).

Por lo general los hongos y las levaduras se multiplican mejor que las bacterias en pH bajo. Por encima de pH 10 solamente crecen algunas bacterias . Eso es fácilmente demostrable en el laboratorio, pero no tan fácil en los alimentos, debido a los factores intrínsecos y extrínsecos de los mismos.

Un rol especial juega también el tipo de acidez. Así los Lactobacilos se pueden multiplicar en ácido un acético solamente por encima de pH 4, en cambio todavía toleran un pH 3 de ácido nítrico.

Influencia del pH en la multiplicación de las bacterias.

Valores mínimos y máximos de pH para la multiplicación de las bacterias en alimentos		
Especie	Valor pH mínimo	Valor pH máximo
Pseudomonas spp.	5,6	8,0
Clostridium perfringens	5,5	8,5
Bacillus cereus	5,0	8,8
Campylobacter spp.	4,9	9,0
Bacillus subtilis	4,5	8,5
Escherichia coli	4,4	9,0
Listeria monocytogenes	4,4	9,4
Staphylococcus aureus	4,2	9,3
Salmonella spp.	4,0	8,2
Lactobacillus spp.	3,4	7,2
Saccharomyces spp.	2,1	9,0
Aspergillus spp.	1,6	9,3

pH de distintos alimentos	
<i>Alimento</i>	<i>Rango pH</i>
Carne fresca	7
Aves	6,3 – 5,8
Queso Gouda	5,32 - 5,28
Yoghurt	4,2 – 3,8
Leche	6,6 – 6,8
Pescados	6,6 – 6,8
Frutas	4,5
Clara de huevo	9,0
Chucrut	3,7 – 3,1

Acidez de la leche y productos lácteos.

La acidez de la leche se debe a la actividad metabólica de las bacterias lácticas. Especialmente representantes de los Géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.

Pueden ser:

Homofermentativos: a partir de la lactosa producen solamente ácido láctico por ej: *Lactococcus* spp, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus vulgaricus* y *helveticus*.

Heterofermentativos: *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus kefir*. A partir de la lactosa, además de ácido láctico producen ácido acético, etanol, CO₂.

Con la acidificación se alcanzan distintos valores de pH los que pueden quedar como producto final (Yogurt) y de esa forma actuar como protección contra bacterias no deseadas.

La acidificación se puede regular a determinado pH y someter la leche a otros procesos, donde puede haber una recontaminación (quesos blandos).

En la leche y los productos lácteos los Lactobacilos tienen una buena tolerancia al pH bajo. Se pueden reproducir hasta en valores de 3,7.

Las Enterobacteriaceae detienen su crecimiento en un pH de 4,5. Eso vale también para el resto de las bacterias.

El yogurt por ejemplo sufren pocas contaminaciones bacterianas

Potencial redox:

Potencial de Óxido-Reducción (Redox, Eh): el potencial redox de los alimentos esta determinado por la presencia de elementos reductores (que ganan oxígeno o pierden electrones) y oxidante (que pierden oxígeno o ganan electrones). El Eh puede tener valores positivos, cuando la sustancia o el alimento se comporta como oxidante o negativos cuando se comporta como reductor. El oxígeno disuelto en la leche contribuye a que la misma posea un Eh de +250 a +350 mV (milivoltios). Los microorganismos al multiplicarse, debido a su metabolismo liberan electrones y consumen oxígeno, lo cual hace que el Eh disminuya. En medios no “bufferados” una pequeña parte de microorganismos (10⁵ /g) pueden causar cambios en el potencial, en cambio en alimentos bien amortiguados una población mayor (10⁸ /g) apenas modificará el Eh. Según las necesidades de oxígeno los microorganismos se clasifican en:

- a. **Aerobios Estrictos:** los que necesitan oxígeno para desarrollarse, no se multiplican en ambientes anaeróbicos. Ejemplos: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, mohos.
- b. **Anaerobios Facultativos:** Son microorganismos que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Ejemplo: Enterobacterias, *Staphilococcus*.
- c. **Anaerobios Estrictos:** microorganismos que solo crecen en ausencia de oxígeno. Ejemplos: *Clostridium*, *Propionibacterium*
- d. **Microaerofilos:** aquellos que para crecer necesitan solo una pequeña fracción de oxígeno en la atmósfera. Ejemplos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Por lo general en ciertos alimentos el desarrollo inicial de los microorganismos es aeróbico y posteriormente al reducirse el Eh comienza el desarrollo de los anaeróbicos. En la leche las bacterias ácido lácticas se consiguen en abundancia y por ser varias de ellas anaerobias facultativas, pueden desarrollarse en ambos ambientes.

Factores extrínsecos.

- **Temperatura**
- **Humedad relativa**
- **Gases Atmosféricos**

Factores extrínsecos: Entre los factores extrínsecos, el más importante es la **temperatura**.

Es posible clasificar las bacterias de acuerdo a sus posibilidades de multiplicación, según la temperatura (**IMPORTANTE**).

Clasificación de las bacterias según su posibilidad de multiplicación a distintas temperaturas (H. Böhm - W. Heeschen - P. Teufel, 2001).			
T e m p e r a t u r a °C			
Grupo	Mínima	Optima	Máxima
Termófilas	40 - 45	55 - 75	60 - 90
Mesófilas	5 - 15	30 - 45	25 - 47
Psicrófilas	-5 hasta +5	12 - 15	15 - 20
Psicrotrofas	-5 hasta +5	25 - 30	30 - 35

Desde el punto de vista higiénico, los factores de proceso juegan un rol muy importante porque actúan directamente sobre la microflora para que no se puedan producir peligros desde el punto de vista sanitario.

El factor de proceso esencial en el campo de la leche/productos lácteos es la **temperatura** (pasterización, ultra alta temperatura, esterilización), que elimina las bacterias vegetativas (pasterización) como así también la mayoría de los esporos (ultra alta temperatura, esterilización).

Los factores de proceso por excelencia, que ante todo tienen importancia en la quesería, son: **temperatura, Actividad w, pH, estructura, atmósfera, microorganismos** (fermentos), **sustancias antimicrobianas** (por ej. Nitrato), etc.

No todos los microorganismos crecen a la misma temperatura. Según la temperatura óptima de crecimiento se pueden distinguir tres grupos: los mesófilos, los psicrófilos y los termófilos. Al grupo de las bacterias Mesófilas pertenece la mayoría de la flora que se encuentra con mayor frecuencia en la leche, principalmente las bacterias lácticas. Bacterias Psicrófilas son las que crecen a temperaturas de refrigeración. Son bacterias psicrófilas los miembros del género Pseudomonas, Flavobacterium, Acinetobacter, Alcaligenes, Bacillus. Bacterias Termófilas son aquellas que crecen bien a temperaturas entre 45 a 55 °C, en este grupo están el Lactobacillus bulgaricus, L. fermenti, L. Lactis, L. helveticus, L. acidophilus, Streptococcus termophilus. Otro grupo que merece ser descrito lo constituyen las Bacterias Termoduricas que son bacterias en su mayoría mesófilas que resisten temperaturas de pasteurización; algunas de ellas son termófilas. Se encuentran en este grupo los Micrococcus, Microbacterium, Esporas de Bacillus y Clostridium.

Los microorganismos psicrotrofos y los termotrofos, son microorganismos mesófilos pero que igualmente pueden crecer a temperaturas bajas o altas, respectivamente (véase el Cuadro anterior). La temperatura a la cual se encuentra la leche después del ordeño favorece la rápida multiplicación microbiana. La mayor proporción de la flora bacteriana presente, son microorganismos mesófilos, es por ello que la inmediata refrigeración a temperaturas de 4 a 5 °C se hace fundamental para asegurar la calidad de la leche. **Pero su almacenamiento no debe ser prolongado (máximo 24 horas) ya que entonces se favorecería el aumento en**

número de la flora psicrotrofa. Cuando la leche no vaya a ser procesada el mismo día de recepción debe ser sometida a un proceso de termización.

Humedad relativa: la humedad de la atmósfera influye en la humedad de las capas superficiales de los alimentos en almacenamiento. En leche fluida no juega un papel importante, contrario al que puede jugar en quesos en almacenamiento o en cavas de maduración.

Gases Atmosféricos: al igual que la humedad relativa, los gases atmosféricos no influyen marcadamente en la calidad microbiológica de la leche cruda, salvo que la misma sea sometida a procesos de agitación fuerte donde el oxígeno del aire pueda ser incorporado al alimento y favorecer el crecimiento microbiano aeróbico. Este factor debe ser considerado en el almacenamiento de ciertos derivados lácteos los cuales pueden verse alterados por una alta presión de oxígeno en la atmósfera (leche en polvo, leche evaporada, quesos, etc).

Factores implícitos.

Dentro de los factores implícitos se describen los relacionados directamente con las especies microbianas, su metabolismo y las relaciones que establecen.

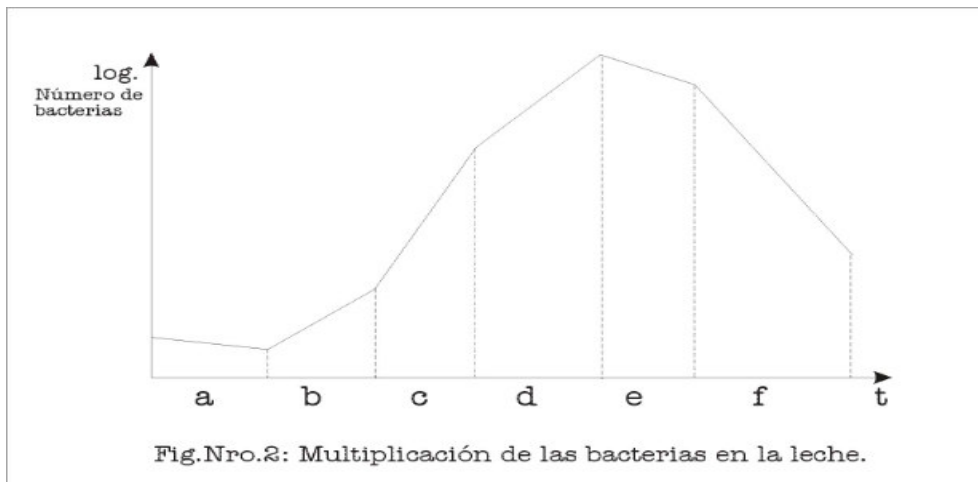
No todas las bacterias tienen la capacidad de crecer en la leche, aún cuando encuentren condiciones óptimas. Esto es debido al estado como se encuentran los diferentes componentes. Por ejemplo, no todas las especies tienen la capacidad de metabolizar la lactosa, si no que necesitan que esta este hidrolizada para así poder utilizar la glucosa o galactosa.

De manera que aquellas que estén capacitadas para producir las enzimas necesarias se verán más favorecidas en crecer. Así mismo pasa con las proteínas, muchos microorganismos no tienen poder proteolítico, por lo que dependen de otros que metabolizan las proteínas y así poder utilizar las aminoácidos libres. De esa manera en la leche y productos lácteos se pueden observar varios ejemplos de relaciones simbióticas, siendo la más destacada la que se da entre el *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus*, durante la elaboración del yogurt. En estos el primero se favorece de la capacidad proteolítica del segundo, a la vez que este incrementa su desarrollo a medida que el estreptococo produce ácido formico y baja el pH de la leche.

Curva de crecimiento de las bacterias.

Una bacteria se puede duplicar en 10 minutos. Otras necesitan 20, 60 minutos o 24 hs. Este tiempo se designa tiempo de generación. Esos tiempos son distintos para las distintas especies de bacterias.

Cuadro N° Curva y fases de crecimiento de las bacterias.



<u>Fases.</u>	<u>Nombre.</u>	<u>Velocidad de crecimiento.</u>
A	Deadaptación	Nulo.
B	De aceleración.	Crecimiento.
C	Exponencial.	Constante.
D	De declinación.	Decreciente.
E	De estacionamiento.	Nulo.
F	De mortandad	Negativo.

Ejemplo de cómo se multiplican las bacterias.

Generación:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Nº bacterias:	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1.024

A partir de una bacteria, después de su XI generación se obtienen más de 1.000 bacterias. El tiempo de generación es más corto en la fase de crecimiento logarítmico. En esta fase por ej. los estreptococos lácticos, bajo condiciones favorables, se pueden multiplicar cada 10 – 20 minutos, los lactobacilos cada 30 – 40 minutos y los coliformes cada 25 – 30 minutos. Una considerable proporción de las bacterias del ambiente y del cuerpo del animal necesitan una larga fase de adaptación.

Factores internos de la leche: a comparación de otros alimentos, la leche es un sustrato de elección para la mayoría de las bacterias. Ello depende del tipo de y cantidad de bacterias. Debe tenerse en cuenta en este aspecto que la leche puede tener inhibidores naturales y contaminantes.

Si por ejemplo en un equipo de ordeño quedan bacterias provenientes del agua, estas deben adaptarse al medio leche. **Si el equipo de ordeño no fue higienizado correctamente y las bacterias se multiplican con los restos de leche, cuando son barridas hacia el tanque por la leche del próximo ordeño, ya generalmente se encuentran en la fase C (multiplicación exponencial).**

Alteración de los recuentos durante el tratamiento y la elaboración de la leche:

Con el tratamiento térmico de la leche se eliminan, según el tipo de tratamiento, entre el 98 – 100% de las bacterias.

Entre las bacterias sobrevivientes (termodúricas) están en primer lugar los esporulados provenientes de los forrajes y de la bosta. Entre ellos están los aerobios como: Bacillus

subtilis, B. cereus, B. circulans, B. licheniformis y B. pumilus. El contenido de estas bacterias en animales alimentados en base a pasturas suele ser de 10 – 20/ml y de hasta 100 – 200 en vacas estabuladas.

También hay bacterias termodúricas que no son esporígenas como Streptococcus thermophilus, Str. Durans, y Str. Bovis. Microbacterium lacticum, Micrococcus luteus. En leche pasteurizada pueden haber entre 2.000 – 10.000 de estas bacterias, ese número depende de la limpieza y desinfección del equipamiento de ordeño.

En la leche pasteurizada también pueden haber esporígenos psicrotrofos como Balillus cereus.

Clasificación de las bacterias según temperatura óptima de crecimiento.

(Por su importancia se repite este cuadro).

Clasificación de las bacterias según su posibilidad de multiplicación a distintas temperaturas (H. Böhm - W. Heeschen - P. Teufel, 2001).			
Temperatura °C			
Grupo	Mínima	Optima	Máxima
Termófilas	40 - 45	55 - 75	60 - 90
Mesófilas	5 - 15	30 - 45	25 - 47
Psicrófilas	-5 hasta +5	12 - 15	15 - 20
Psicrotrofas	-5 hasta +5	25 - 30	30 - 35

Determinación del contenido de bacterias en leche.

Generalidades: el contenido de bacterias de la leche se puede obtener mediante Métodos. El método se elige según el objetivo del recuento. Si son muchas muestras, Pocas, si es para un trabajo científico, para clasificar la leche proveniente de tambos, si se quiere determinar grupos de bacterias, etc.

3.3.1. Recuento total de bacterias (Recuento de colonias).

Se entiende por recuento total de bacterias el número de bacterias por ml o por g. de una sustancia. El número de bacterias obtenido depende del método elegido y no necesariamente tiene que ser idéntico para otros métodos.

Se pueden usar métodos directos e indirectos. Uno directo es el microscópico según Breed. Los recuentos indirectos se hacen mediante cultivos, especialmente el de las cajas de Petri según Koch

Recuento directo de bacterias (método microscópico).

Procedimiento según Breed: se toman 0,01 ml de leche y se hace un extendido de 1 cm² sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Se seca el extendido sobre una plana, se fija, se desengrasa y se tiñe en forma monocromática con azul de metileno.

Se cuentan las bacterias con lente de inmersión y se multiplica su promedio por el factor microscópico (ver práctico sobre Recuento de células somáticas en leche)

Existe un método indirecto automático para el recuento de bacterias mediante el cual se tiñen las bacterias con un colorante fluorescente y son contadas como impulsos fluorescentes (Bactoscan).

Recuento óptico fluorescente según Bactoscan. (Fos Electric), Bactocount (Bentley).

Este método se utiliza en los Laboratorios Regionales para bajar los costos de los recuentos con la ayuda de un sistema fluorescencia óptica.

El método se basa en el principio de la detección de bacterias teñidas con colorante fluorescente naranja acridina. Se extiende una fina película de leche sobre una superficie giratoria y se ilumina con una luz de una determinada longitud de onda.

Las bacterias teñidas con colorante naranja-acridina reflejan la luz que es captada por el sistema para determinar el número de bacterias.

El recuento se hace en forma totalmente automática. El equipo toma 5 ml de la leche muestra.

A esos 5 ml se les agrega una solución que produce la lisis de las micelas de caseína y de las células somáticas. Una centrifugación gradual del aparato separa la bacterias de las células somáticas y la grasa por una lado, y la proteína lisada por otro. A la suspensión de bacterias obtenida se la agrega una solución de enzimas y se incuban durante 5 minutos a 40 °C. Después de la incubación se agrega colorante fluorescente. El recuento de bacterias teñidas de esa suspensión se hace con un microscopio de trabajo continuo. Las señales de luz emitidas por las bacterias “fluorescentes” son captadas por un fotodetector, y reforzadas electrónicamente de tal

forma que puedan ser contadas como impulsos (ver Figura N°)

Antes del análisis las muestras se mezcla y se termizan a 40°C. Durante el recuento el equipo es chequeado constantemente con la repetibilidad de los resultados. Si no se logra, inmediatamente se interrumpe el recuento hasta que se detecta el error.

Deben respetarse exactamente las instrucciones de los fabricantes.

Los resultados se evalúan como sigue:

Los recuentos obtenidos con el método de Thompson son comparables al método de referencia de Koch. Pero para los resultados obtenidos con el Bactoscan, se elaboró una tabla “equivalente” al método de Koch.

Bactoscan	Método de Koch
<2	<10
20	10
40	20
50	25
90	50
150	80
200	100
410	200
600	300
1050	500
1950	800
2700	1000
6000	2000
7000	2500
9000	3000
11000	5000
>11000	>5000

Recuento-Bactoscan	Recuento-referencia
Hasta 3.300	(hasta 300.000)
Hasta 8.100	(hasta 1.000.000)
Hasta 18.500	(hasta 3.000.000)
Mas de 18.500	(mas de 3.000.000)

Recuento indirecto de bacterias.

Método de las placas según Koch (método de cultivo).

Con el método de recuento de bacterias aerobias, se entiende el recuento de bacterias aerobias y microaerófilas en medio de cultivo entre 48 – 72 hs. A 30°C y se expresa en número de bacterias por ml o g.

Medio de cultivo: Plate Count Agar

Desarrollo del método.

Antes de su procesamiento las muestras se termostatan en baño de agua a 20°C, durante máximo 10 minutos, y se mezclan con agitación durante 20 segundos con un recorrido de 30 cm para obtener una muestra homogénea.

Para hacer las diluciones se toman 10 ml de leche de la muestra con una pipeta estéril y se colocan en un frasco para diluciones que contiene 90 ml de diluyente, se tapa y homogeneiza. De la primera dilución se sacan 10 ml y se colocan en el segundo frasco de dilución, se mezcla y así sucesivamente, se hacen tantas diluciones como las que sean necesarias para obtener recuentos de entre 20 y 300 colonias en las respectivas cajas de Petri.

De las diluciones realizadas, de cada frasco se saca 1 ml de la dilución y se siembra en la caja de Petri correspondiente a la dilución, levantando la tapa lo mínimo necesario, (usando una pipeta estéril para cada siembra).

A las cajas de Petri inoculadas (como máximo 15 minutos después) se les agrega de 10 – 12 ml de medio de cultivo termizado a 45°C. Una vez hecho esto, se mueven las cajas en forma de 8 sobre la mesada (para mezclar el medio con el inóculo).

Una vez solidificado el medio de cultivo, se depositan las cajas en la estufa de cultivo a 30°C apilando como máximo 4 cajas. De cada dilución se cultivan 2 cajas paralelas.

Incubación: PC-Agar 72 horas a 30°C.

Recuento:

Se cuentan las colonias solamente de aquellas cajas que tienen entre 20 y 300 colonias. El número de bacterias se obtiene del promedio aritmético de los recuentos de las dos cajas paralelas por dilución, multiplicado por el factor de dilución.

Alcance del método de Koch:

Con este método debe tenerse en cuenta un error del 30%. Al margen de los “errores Internos y externos de dilución”, la rotura de los grumos de bacterias durante la dilución y errores subjetivos de lectura, hay que tener en cuenta otras consideraciones.

Sobre el agar no se cuentan bacterias individuales, sino unidades formadoras de colonias (UFC). *Esto quiere decir que una colonia en la caja no significa una bacteria en la leche sino que puede ser el resultado de un grumo de bacterias de por ejemplo 300.000 bacterias/ml.*

En todos los recuentos con caja de Petri, es importante señalar el método y el medio de cultivo utilizados, para que no sean interpretados como iguales, métodos distintos y medios de cultivo distintos

Algunas industrias lácteas utilizan un contador electrónico (Bactoscan), que cuenta bacterias vivas y muertas. Pero el resultado se informa al productor como UFC, eso es así, porque se hizo una tabla que “traduce” los recuentos electrónicos en UFC (Ver Recuento óptico fluorescente).

Si se utiliza el método para determinar el contenido de bacterias en leche cruda y leche de consumo para calificarla según calidad, deben tenerse en cuenta los siguientes puntos de vista:

1. El material y el trabajo están sujetos a errores.
2. No hay estándares de referencia (para auditar el trabajo y los laboratorios de análisis).
3. Especiales dificultades en la toma de muestras.
4. El error del procedimiento es grande. En recuentos superiores a 100.000UFC los errores disminuyen.

Método de las placas con ansa según Thompson.

Material:

Un ansa exacto de 0,001 ml según Burri y una pipeta automática de 1- 2 ml (ver Figura N° , diluyente, cajas de Petri, PC – Agar.

Método:

El ansa de Burri introducido en una cánula (aguja hipodérmica N° , se adapta a la jeringa de Corwall con un ángulo de 30°. El aro del ansa se encuentra a 3 – 4 mm de la cánula (aguja cortada). El ansa se introduce verticalmente en la muestra de leche y la “ansada” de leche de la muestra es “lavada” con la solución de Ringer dentro de la caja de Petri. No es necesario flamear el ansa después de cada muestra. Es suficiente lavar el ansa dos veces consecutivas con 1 ml de la misma solución Ringer (estéril) que se utiliza para la siembra.

El procedimiento posterior es idéntico al método de las caja de Petri según Koch.. Ver descripción del método en el Anexo.

Pruebas de reducción.

Prueba del azul de metileno: es una prueba que no se usa mas, salvo en queserías muy chicas.

Se ponen 10 ml de leche en un tubo de ensayo y 1 ml de azul de metileno (5mg. de azul de metileno en 100 ml de agua destilada). Cada tubo identificado corresponde a la leche total de un tambo. Se tapa el tubo, se mezcla y se incuba a 37°C en baño de agua. El azul de metileno debido al metabolismo de las bacterias se reduce a su leucobase incolora. La prueba se controla cada 30 minutos hasta completar 6 horas e incubación. En las observaciones, los tubos decolorados se retiran y se anotan. Si un tubo está decolorado mas de 2/3 también se retira. La leche que mas rápido se decolora es la mas contaminada y la que no se decolora hasta las 6 horas la menos contaminada.

Debe tenerse en cuenta que esta prueba mide en cierta la “actividad” de las bacterias. Hay bacterias que en 6 horas aún no entran en actividad. Esta prueba no sirve para leche fría, porque las bacterias necesitan adaptarse a la temperatura de 37°C lo cual daría un resultado erróneo.

Prueba de la rezasurina.

Esta prueba nunca se usó en nuestro país, si en Europa. Ambas pruebas ya no se usan mas por la información incompleta que brindan y porque fueron superadas por la tecnología.

Microorganismos de interés tecnológico en lechería.

Bacterias lácticas.

Son un grupo de bacterias de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son formadoras de textura y ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos. Por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH iso-eléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos. En la elaboración de crema y mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumentar el rendimiento. Algunas especies producen polisacáridos (gomas, mucina), que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura (*S. termophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lc.cremoris*).

Aportan sabor y aroma, ya que como parte de su metabolismo fermentativo se da la producción de acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. El diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla. La acetoina lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados.

Además la producción de enzimas que intervienen en el afinado de los quesos por degradación de las proteínas y las grasas afectan notablemente las características organolépticas de los mismos.

Ejercen efecto biopreservador manifestado en la prolongación de la vida útil de los productos elaborados con sus cultivos. Este efecto se lleva a cabo por varios mecanismos: a) ciertas especies producen bacteriocinas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus*) las cuales son proteínas que se comportan como antibióticos y que inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con estas; b) con la producción de ácido y descenso del pH se logra la inhibición de otras especies bacterianas y la conservación de los alimentos; c) el efecto biopreservador también se cumple gracias a la competencia por nutrientes que se da entre las diversas especies bacterianas.

Aportan beneficios para la salud de los consumidores, el cual se ha descrito como efecto probiótico. Este puede manifestarse de manera específica en la prevención y reducción de los síntomas en los cuadros diarreicos. Además se le han atribuido a las BAL, efecto preventivo de tumores, anticolesterolemico y modulador del sistema inmunológico.

Micrococcus: débilmente fermentadores, forman parte de la flora inocua que contamina la leche cruda. Tienen poca actividad enzimática, por lo tanto son de muy poca importancia como agentes de adulteración en la leche. Sin embargo por ser la flora más abundante en leche cruda y tener cierta capacidad proteolítica pueden llegar a ser causante de alteraciones en leches pasteurizadas mal almacenadas.

Estafilococos: son anaerobios facultativos, fuertemente fermentadores. Son de gran importancia desde el punto de vista sanitario. Causan mastitis y pueden provocar enfermedades o intoxicaciones en los humanos. *Staphilococcus aureus* produce una exotoxina que causa fuertes trastornos intestinales en los humanos, la cual es termorresistente, por lo cual no es destruida con la pasteurización. El *Staphilococcus epidermidis* se ve implicado en algunos casos de mastitis, por lo cual puede llegar a contaminar la leche.

Bacterias esporuladas: los Bacillus son bacterias aeróbicas con actividad enzimática variada producen acidificación, coagulación y proteolisis. 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. Cobran importancia en productos lácteos como en leche pasteurizadas, quesos fundidos, leches concentradas, quesos de pasta cocida. Resisten la pasteurización por su capacidad de producir esporas, las cuales solo se destruyen a temperaturas por encima de 100 °C.

Pseudomonas.

Más del 50% de la flora Gram negativa de la leche cruda esta representada por este género. Juegan un papel importante en la conservación de productos lácteos, ya que además de ser psicrófilas, varias especies tienen un gran poder proteolítico y lipolítico. Además se ha descrito que algunas de estas enzimas resisten temperaturas por encima de los 80 °C, por lo cual pueden causar alteraciones aún en productos elaborados con leches pasteurizadas.

Enterobacteriaceae.

Generalidades y sistemática.

Restos de materia fecal pueden contaminar los alimentos con patógenos fecales. Antiguamente se asoció el hallazgo de Enterobacterias en leche con a una contaminación con materia fecal. Hoy se sabe que muchas Enterobacterias se multiplican fuera del intestino y su relación con una contaminación fecal se reduce solamente a una sospecha.

Coliformes.

Se entiende como coliformes todos los representantes de la familia Enterobacteriaceae que desdoblán la lactosa produciendo ácido y gas.

Géneros: **Escherichia, Citrobacter, Klebsiella y Enterobacter.**

Son indicadores de falta de higiene en la rutina de ordeño.

Los Coliformes se determinan con medios líquidos y sólidos debido a su acción sobre la lactosa formando ácido o gas.

Con medio de cultivo

- sólido forman ácido, y con
- líquido forman gas.

Se determinan mediante siembra en medio agar rojo violeta lactosa bilis (BRVA), caldos (NMP), o el más usado verde brillante lactosa bilis (BGLB).

Bacterias Psicrotrofas.

Se denominan psicrotrofas a aquellas bacterias que pueden desarrollarse desde -5 hasta 20°C. Su temperatura óptima de desarrollo es de 12 a 15°C.

Origen: suelo, aire, agua, forrajes, equipamiento, materia fecal.

Pertencen a las Psicrotrofas los siguientes géneros: Pseudomonas, Alcalígenes, Lactobacillus, Micrococcus, Streptococcus y géneros de la Familia Enterobacteriaceae.

Bacillus cereus crece a por debajo de los 10°C.

La actividad proteolítica y lipolítica se mantiene a esa temperatura y a veces está potenciada.

Estas bacterias son de importancia tecnológica, porque además de desarrollarse a bajas temperaturas, sus enzimas proteolíticas y lipolíticas **son termoestables** (no así las bacterias que se destruyen), **no se destruyen con la pasterización y siguen actuando en los subproductos**. Cuando están presentes en un número elevado, pueden causar alteraciones en el sabor.

Las bacterias Psicrotrofas se encuentran en la leche en forma proporcional al recuento total de bacterias:

Leche con bajos recuentos de bacterias: 10% de psicrotrofas.

Leche con altos recuentos de bacterias: hasta 75% de psicrotrofas.

Producen enzimas lipolíticas y proteolíticas resistentes a los tratamientos UHT y HTST.

Proteasas de Pseudomonas: se inactivan: a 121°C, 10'; 149°C, 2'.

Consecuencias:

- Proteólisis: sabor frutado, pútrido, amargo, sucio.
- Lipólisis: sabor rancio, sucio, a jabón.
- Yoghurt: sabor.
- Queso: disminución del rendimiento (sol. de N).
- Leche pasterizada: sabor, coagulación dulce (κ -caseína).
 - Crema y manteca: sabores rancios y amargos.
 -

Nota: tener en cuenta que las enzimas proteolíticas y lipolíticas de las bacterias psicrotrofas no se destruyen con la pasterización.

Determinación: Método de las placas según Koch con PCA.

Incubación: 10-14 días a 7°C.

Streptococos fecales.

Normalmente se encuentran en la flora intestinal del hombre y de los animales.

Tienen importancia en la higiene de la alimentación como bacterias indicadoras de contaminación fecal. Pueden producir también intoxicaciones.

Los enterococos son buenos indicadores debido a su resistencia. Donde los coliformes ya no se desarrollan mas (por pH muy bajo, alto contenido de sal), estas todavía son demostrables.

Los enterococos tienen importancia por su alteración del aroma en los alimentos.

Algunos también pueden producir aminas biógenas por descarboxilación de aminoácidos por ej. histidina y tiramina.

Bacterias termófilas.

Se denominan bacterias termófilas aquellas que tienen su temperatura óptima de desarrollo por encima de 40°C. A ese grupo de bacterias pertenecen algunos género de Bacillus (Bacillus stearothermophilus variedad calidolactis, que se utiliza para la

determinación biológica de inhibidores en leche). Estas bacterias sometidas a temperaturas durante un tiempo prolongado tienen un crecimiento acelerado, como así también el Streptococcus thermophilus.

Determinación: con PCA según el método de Koch. Incubación durante 48 Hs a 55°C.

Bacterias Termodúricas.

En la industria lechera se denominan así a las bacterias que son resistentes a la Pasterización (30 minutos a 63-65°C).

Origen: suelo, forrajes, silaje, barro, bosta, equipamiento.

La temperatura óptima de crecimiento de este grupo de bacterias por lo general se halla entre 20 – 40 °C.

Pertencen a este grupo de bacterias las bacterias esporígenas aerobias y anaerobias, Pseudomonas, microbacterias, micrococos, lactobacillus, corinebacterias, algunos estreptococos, Alcalígenes.

En leche cruda su presencia indica falta de higiene del equipamiento de ordeño y se considera como normal hasta 200 UFC/ml de bacterias termodúricas.

La presencia de bacterias termodúricas en leche pasteurizada y de productos elaborados indica que la conservación de esos productos puede ser influenciada y sufrir alteraciones.

Determinación: tratamiento térmico en laboratorio de la muestra a 63°C durante 3 minutos.

Incubación: en PCA según método de Koch durante 48 hs. A 30°C.

Gén. Bacillus: cereus y mycoides

Gén. Clostridium:termosacchariticum, butiricum, tyrobutyricum, sporogenes.

Gén. Micrococcus – Microbacterium – Streptococcus – Lactobacillus – Corynebacterium – Bacillus – Clostridium.

Origen: suelo, forrajes, silaje, barro, bosta, equipamiento.

Importancia: resisten pasterización.

Alteraciones:

Gén. Bacillus

- Coagulación dulce
- Peptonización: sabor amargo
- Acidificación
- Gas

Gén. Clostridium

- Gas
- Proteólisis: putrefacción (compuestos azufrados, NH₃, aminas, indol, escatol, CO₂, H₂, etc).

Bacterias proteolíticas.

Son muchas las bacterias proteolíticas que descomponen la leche y sus subproductos y algunas pueden afectar la salud. Entre otras bacterias proteolíticas se encuentran:

Pseudomonas, Alcalígenes, Serratia, micrococos, estreptococos y esporígenas.

Especialmente las esporígenas aerobias se mantienen en la flora intestinal. La pasterización actúa sobre las bacterias esporígenas como un “shock térmico” para tomar la forma de bacterias y actuar libre de antagonistas (eliminadas durante la pasterización).

Las bacterias proteolíticas desdoblan las proteínas desde péptidos hasta aminoácidos y le dan a la leche un sabor amargo (por la descomposición de las proteínas) además de alterar la textura de los productos. No se descarta la formación de toxinas, las que pueden llevar a una intoxicación inespecífica. Durante la decarboxilación de aminoácidos se generan aminas biógenas, entre ellas tiramina e histidina que pueden ser tóxicas en los alimentos (cuando las monoaminooxidasas son inhibidas por factores como el alcohol).

Determinación:

Según método de Koch y agar con leche descremada. Incubación: 48-72 hs a 30°C..

Las colonias al consumir la caseína hacen el agar transparente. Se puede mejorar la lectura con una solución diluída de ácido clorhídrico.

Clostridios (esporulados anaerobios).

Tienen mayor importancia en la industria de la carne que en la de la leche. Es un indicador de la higiene del ordeño y generalmente provienen de la bosta.

Resisten la pasterización, aunque muchos son eliminados con este tratamiento.

Aparece en la leche cuando las vacas consumen silaje. Hay una estrecha relación en el contenido de esporos de Clostridios del silaje, bosta y leche.

Afecta a los quesos de pasta dura (*Clostridium tyrobutyricum* y *perfringens*) porque esos quesos tienen un estacionamiento largo. Producen la llamada “hinchazón tardía” de los quesos produciendo agujeros (cavernas) en su interior.

Determinación:

- a) Prueba de Weinzirl (es para todos los esporos anaerobios que producen gas).
- b) DRCM (Diferential Reinforced Clostridial Medium)

Lipolíticas (desdoblan la grasa).

La grasa de la leche es desdoblada por muchas bacterias. En la elaboración del queso, se utilizan bacterias lipolíticas para darle aroma.

Pero hay bacterias como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Serratia*, micrococos, levaduras y hongos que le confieren un sabor rancio a la leche a través del desdoblamiento de la grasa.

Muchas de las bacterias lipolíticas son psicrotrofas.

Para el recuento se usan medios básicos adicionados de grasa. Los microorganismos que poseen lipasas forman un halo claro alrededor de las colonias. El medio de cultivo es Agar azul de Victoria Tributirina.

Hongos, levaduras y mohos.

Algunos géneros de levaduras y mohos son de importancia para la industria láctea.

Su presencia indica deficientes condiciones higiénico-sanitarias. Pueden producir deterioros en la leche o en productos derivados. Los hongos que producen micotoxinas resultan muy peligrosos, sobre todo a que estos metabolitos son termorresistente.

Algunas especies son utilizadas como cultivos lácteos para el afinado de los quesos madurados como el *Penicillium candidum* y *Penicillium camemberti* en los quesos de corteza blanca como el Camembert y el *Penicillium roqueforti* en los quesos de pasta azul (Roquefort)

Otros como *Saccharomyces lactis*, *Penicillium commune* (hongo de sótanos), *Geotrichum candidum* u *Oospora lactis* (hongo de leche) y *Monilia nigra*, producen enzimas proteolíticas y lipolíticas que afectan la leche y los productos lácteos.

Sacharomices kefir. 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.

Virus:

La leche se puede contaminar con los virus causantes de la Fiebre Aftosa, Estomatitis Vesicular. Los más importantes para la industria láctea son los Bacteriofagos virus 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.

Determinación:

Levaduras: Malz Agar. Levadura-glucosa-cloramfenicol-agar (DIN 10286).

Bibliografía consultada.

1. Milch I y Milch II. Cátedra de Higiene y Tecnología de la Leche – Universidad Ludwig Maximilianus de Munich. Alemania (2003).
2. El nuevo derecho de la higiene de la leche 2000 - H.D.Böhm, W. Heeschen y P. Teufel - Gelsenkirchen – Alemania (2001).
3. Departamento para la Higiene y Tecnología de la Leche – Escuela Superior de Veterinaria de Hannover – Alemania (2002).
4. Apuntes de la Cátedra.