

**UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO  
AGROPECUARIO**

**TEMA:  
MICROBIOLOGÍA DE LECHE DE ORIGEN BOVINO, PROCESADAS PARA  
CONSUMO HUMANO**

**AUTOR:  
MIGUEL ÁNGEL PÁEZ QUINCHE**

**TUTORA:  
NANCY FABIOLA BONIFAZ GARCÍA**

**Quito, abril de 2016**

### **Cesión de Derecho de autor**

Yo Miguel Ángel Páez Quinche, con documento de identificación N° 1003576343, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado “Microbiología de Leches de origen bovino, procesadas para consumo humano”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería Agropecuaria, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(f) \_\_\_\_\_

Miguel Ángel Páez Quinche

100357634-3

Quito, abril de 2016

Declaración de Coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollada el Trabajo Experimental Microbiologías de Leches de origen bovino, procesadas para consumo humano realizado por Miguel Ángel Páez Quinche, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerada como trabajo final de titulación.

Quito, abril de 2016

(f) 

Nancy Fabiola Bonifaz García

C.I. 0602085110

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia y en especial a mi madre, quien fue el pilar fundamental durante mi carrera como estudiante, tanto al inicio como a la culminación de la misma.

A mis docentes que me acompañaron durante un largo tiempo en mi formación de estudiante de la carrera.

A mi tutora quien supo encaminarme en todo momento en la realización del proyecto, y enmarcarme en el último escalón hacia un futuro en la cual sea participe del mejoramiento de las nuevas tecnologías de enseñanza y aprendizaje dentro del campo agropecuario.

## **Agradecimiento**

Mi principal agradecimiento como autor del presente proyecto agradezco a los Ing. Docentes de la Universidad Politécnica Salesiana, y las personas que laboran en el Laboratorio de Calidad de Leche de la Universidad, quienes me brindaron todo su apoyo, ya que gracias a ellos se hizo posible la realización de este proyecto.

## Índice

Introducción .....	1
Capítulo 1 .....	3
Marco Conceptual .....	3
1.1. Microbiología de alimentos.....	3
1.1.1. Crecimiento de los microorganismos en los alimentos .....	3
1.1.2. Factores intrínsecos .....	3
1.1.3. Factores extrínsecos .....	4
1.2. La leche de Consumo .....	4
1.2.1. Generalidades .....	4
1.3. Características de la leche .....	4
1.3.1. Textura.....	4
1.3.2. Color .....	5
1.3.3. Sabor.....	5
1.4. Procedimiento de conservación no térmica. Congelación .....	6
1.4.1. Destrucción de gérmenes.....	6
1.4.2. Conservación por frío. Congelación.....	6
1.4.3. Expresión de la acción bacteriana .....	6
1.5. Fuentes contaminantes en la leche .....	7
1.6. Microorganismos en la leche .....	7
1.7. Microorganismos mesófilos aerobios .....	8
1.8. Microorganismos coliformes .....	8
1.8.1. Condiciones fisiológicas para su crecimiento .....	8

1.8.2. Coliformes totales.....	9
1.9. Microbiología general .....	9
1.9.1. Crecimiento microbiano .....	9
Capítulo 2 .....	10
Materiales y Métodos .....	10
Capítulo 3 .....	16
Resultados y Discusión .....	16
3.1. Resultados obtenidos en la determinación de mesófilos aerobios en leches pasteurizadas. ....	16
3.2. Resultados obtenidos en la determinación de mesófilos aerobios en leches Ultrapasteurizadas (UHT) .....	17
3.3. Resultados para la determinación de Coliformes totales en leches pasteurizadas ....	19
3.4. Determinación de Coliformes Totales para leches Ultrapasteurizadas .....	20
Conclusiones .....	23
Recomendaciones.....	24
Referencias.....	25
Anexos .....	28

## Índice de tablas

Tabla 1. Ufc de Coliformes Totales en leches pasteurizadas.....	19
Tabla 2. Determinación de Ufc de Coliformes Totales en leches UHT consumidas en la ciudad de Quito.....	20
Tabla 3. Determinación de Antibióticos en leches pasteurizadas consumidas en la ciudad de Quito.....	21
Tabla 4. Determinación de Antibióticos en leches UHT consumidas en la ciudad de Quito.....	22

## Índice de Figuras

Figura 1. Interpretación de los resultados de mesófilos aerobios Ufc/mL de las 4 marcas de leches pasteurizadas.....	16
Figura 2. Interpretación de resultados de mesófilos aerobios Ufc/mL en 10 marcas de leches Ultrapasteurizadas.....	18

## Anexos

Anexo 1. Fotografías.....	28
Anexo 2. Codificación de la leches a analizar obtenidas en la ciudad de Quito 2012....	32
Anexo 3. Determinación de mesófilos aerobios en leches pasteurizadas de acuerdo a las Normas.....	33
Anexo 4. Determinación de mesófilos aerobios en leches UHT de acuerdo a las Normas.....	34
Anexo 5. Formato de encuesta dirigida a las madres de familia de la ciudad de Quito..	35
Anexo 6. Formulario de recepción de las muestras de leche.....	36
Anexo 7. Funciones y características del papel petrifilm.....	37
Anexo 8. Método COPAN MILK TEST.....	38
Anexo 9. Formato de tabulación de datos.....	39
Anexo 10. Normas INEN para los requisitos microbiológicos en leches pasteurizadas..	40
Anexo 11. Características microbiológicas de leches ultrapasteurizadas índice permisible de microorganismos.....	41
Anexo 12. Protocolos para el análisis microbiológico de alimentos.....	42
Anexo 13. Protocola para el análisis de Coliformes totales.....	43
Anexo 14. Protocolo para la determinación de mesófilos aerobios.....	44

## **Resumen**

El objetivo de esta investigación fue la de analizar distintas marcas de leche previamente establecidas, mediante encuestas dirigidas a madres de familia quienes aporten con las muestras esenciales y de mayor consumo, con el fin de conocer la calidad de un alimento de consumo diario y masivo.

Para la realización de este trabajo no se utilizó ningún diseño experimental, ya que solo consiste en evaluar y comparar resultados con normas ya establecidas las cuales permite dar a conocer si estas muestras se encuentren dentro del rango establecido de buena calidad o caso contrario determinar aquellas que no cumplan con las normas.

En los análisis de leches pasteurizadas, se pudo determinar que estas cumplen con los rangos determinados en las normas INEN, estando por debajo de lo establecido, lo mismo ocurre con las leches UHT, las cuales nos muestran rangos nulos o por debajo de estos, siendo así leches de excelente calidad y un buen control fitosanitario.

Con respecto al análisis de antibióticos el trabajo determina que las muestras tanto pasteurizadas como Ultrapasteurizadas resultaron positivas y en este ámbito se determina que no existe un control adecuado, para ambos procesos.

Palabras claves: microorganismos, mesófilos aerobio, coliformes totales, antibióticos positivo y negativo

## **Abstract**

The objective of this research was to analyze different brands of previously established milk, by targeting mothers who contribute to the essential samples and higher consumption, in order to know the quality of a food journal and consumer surveys.

To carry out this work no experimental design was not used, since only is to evaluate and compare the results with established standards which allow presenting if these samples are within the established range of good quality or otherwise determine those do not meet the standards.

In analyzes of pasteurized milk, it was determined that these meet the range specified in the INEN standards, still well below the established, so does the UHT milk, which show zero ranges or well below these wellbeing of excellent quality milk and good phytosanitary control.

Regarding the analysis of antibiotics work samples determined that both pasteurized and ultrapasteurized were positive and in this area is determined that there is no adequate control for both processes.

Keywords: microorganisms, mesophilic aerobic, total coliforms, positive antibiotics y negative

## **Introducción**

La leche es uno de los alimentos más consumidos por la humanidad, por la tradición de los pueblos tanto por sus características organolépticas y sus propiedades nutricionales. La composición química de la leche confiere un extremado valor en la dieta del hombre pero al mismo tiempo se convierte en un medio excelente para el crecimiento incontrolado de una gran cantidad de microorganismos, que pueden conducir a la alteración de este producto y a veces al desarrollo de patógenos (Varnam, 1994).

El aumento poblacional de microorganismos a determinado tiempo no se refiere al crecimiento de un único microorganismo (ciclo celular), sino toma en cuenta al estadístico de la población. Cabe señalar que el tiempo de generación (duplicación) que es el tiempo requerido para que una célula se divida en dos, el tiempo puede ser minutos, hora, o días (Ramos, 2014).

Según (GLOBAL HEALING CENTER, 2012) debido a los procesos extremos a los que es sometida la leche, al igual que la gran cantidad de antibióticos, hormonas, y sustancias genéticamente modificadas a las que las vacas son expuestas, hay peligros reales y eminentes relacionados con tomar la leche de vaca.

El presente trabajo experimental pretende caracterizar la calidad de leche consumida en la ciudad de Quito, mediante análisis microbiológico de mesófilos aerobio, coliformes totales, en leches pasteurizadas y Ultrapasteurizadas con el fin de comparar los resultados obtenidos con las Normas INEN de microorganismos presentes en leches

procesadas y determinar si cumplen con las normas, y determinar presencia de antibióticos en leches, mediante el método Copan Milk Test.

Por lo expuesto, los objetivos de esta investigación fueron: Caracterizar la calidad microbiológica de la leche de origen bovino procesada para consumo humano en la ciudad de Quito, mediante análisis de laboratorio, para verificar el cumplimiento de los requisitos de inocuidad del producto; Determinar mediante el análisis microbiológico la cantidad de microorganismos patógenos, Mesófilos aerobios y Coliformes Totales; Determinar la presencia o ausencia de antibióticos en la leche; Comparar los resultados obtenidos con las normas vigentes.

# Capítulo 1

## Marco Conceptual

### 1.1. Microbiología de alimentos

En una infección alimentaria, el alimento sirve de vehículo para la transferencia de patógenos al consumidor, donde el patógeno crece y causa enfermedad. En una intoxicación alimentaria, el microorganismo crece en el alimento y producen toxinas que pueden afectar al consumidor (Frazier & Westhoff, 1993).

#### 1.1.1. Crecimiento de los microorganismos en los alimentos

Según (MICROORGANISMOS Y ALIMENTOS, 2016) Al hablar de un crecimiento microbiano, se puede decir que es el aumento de las células en donde la velocidad de crecimiento se dice que será mayor a cuando se den todas las condiciones y estas sean las mejores.

#### 1.1.2. Factores intrínsecos

La composición de los alimentos es un factor intrínseco que influencia el crecimiento microbiano. Si un alimento consiste principalmente de carbohidratos, predomina el crecimiento fúngico, más que el bacteriano, y la descomposición no genera olores importantes. Así, los alimentos como el pan, las mermeladas, y algunas frutas presentan primero el proceso de descomposición debido al crecimiento de hongos. Cuando los alimentos tienen la presencia de grandes cantidades de proteínas y grasa (por ejemplo, la carne y la mantequilla), el crecimiento bacteriano produce varios olores fétidos. Solo hace falta pensar en el olor de huevos podridos. El procesamiento anaerobio de las proteínas da lugar a compuestos de aminas de olor fétido y se denomina putrefacción (Frazier & Westhoff, 1993).

### **1.1.3. Factores extrínsecos**

La temperatura y la humedad relativa son factores extrínsecos importantes para determinar si un alimento se descompondrá. A humedades relativas elevadas, el crecimiento microbiano se inicia más rápidamente, incluso a temperaturas bajas (especialmente cuando las neveras no se mantienen en un estado descongelado). Cuando se colocan alimentos secos en ambientes húmedos, puede ocurrir una absorción de la humedad en la superficie del alimento, permitiendo finalmente el crecimiento microbiano (Frazier & Westhoff, 1993).

## **1.2.La leche de Consumo**

### **1.2.1. Generalidades**

La leche cruda tiende a desaparecer del mercado de leche de consumo de países con alto grado de evolución social e industrial, sin embargo, en muchos países, y fuera de las grandes poblaciones, una gran parte de consumidores permanece fiel a la leche vendida en muchas ciudades de 100. 000 habitantes. Esta persistencia en la demanda de leche cruda plantea problemas técnicos especiales; también presenta problemas en cuanto al control de la calidad y a la educación del consumidor (Alais, 2003).

## **1.3.Características de la leche**

### **1.3.1. Textura**

La leche tiene una consistencia líquida, es pegajosa y ligeramente viscosa. Esto tiene que ver a al contenido de azúcar, sales disueltas en ella y caseína (Ochoa & Garcia, 2016).

### **1.3.2. Color**

La leche por lo general posee una coloración blanco amarillenta, pero cuando a esta se la adiciona agua o se ha descremado, presenta una coloración blanco azulosa. La intensidad de color comúnmente se basa en el mayor o contenido de grasa, caseína (proteína de la leche), carotenos (colorantes que se encuentra en la hierba verde) (Ochoa & Garcia, 2016).

### **1.3.3. Sabor**

Comúnmente la leche posee un sabor dulce, el cual dependerá fundamentalmente de la lactosa o el azúcar presente en la leche. Además el sabor puede variar por acción de la alimentación, traumatismos que pueda presentarse en las ubres, alteraciones en el estado de salud de la vaca, sustancias ajenas y extrañas en el medio ambiente o de los recipientes en los que se colocan la leche (Ochoa & Garcia, 2016).

### **1.3.4. Olor**

La leche posee un olor característico que recuerda como el alimento predominante de la vaca. Este olor se puede apreciar en los primeros ordeños, puesto que el olor y sabor se pierden con la exposición al aire y al tiempo que ha transcurrido después del ordeño. Además la vacas de raza lechera, a través de sus paredes externas de sus ubres producen cierta sustancia cerosa, cuyo aroma puede confundir el de él y la leche. Algunas veces la leche también se impregna de olores provenientes de los lugares en donde se realiza el ordeño (Ochoa & Garcia, 2016).

## **1.4.Procedimiento de conservación no térmica. Congelación**

### **1.4.1. Destrucción de gérmenes**

La “actinización” de la leche es un método mixto que asocia la acción de los rayos ultravioletas a la de los infrarrojos. La energía calórica de estos últimos es la causa principal de la pasterización (pasterización eléctrica).

Los métodos químicos suelen estar prohibidos. El oxígeno libre y el agua oxigenada se toleran en algunos países. El oxígeno tiene un efecto inhibitor sobre numerosas especies microbianas; el agua oxigenada actúa por medio del oxígeno liberado por las enzimas de la leche (peroxidasa, catalasa) (Alais, 2003).

### **1.4.2. Conservación por frío. Congelación**

A las temperaturas usuales de aplicación, el frío no destruye los gérmenes en proporción apreciable, pero impide el desarrollo microbiano en medio de conservación cuya eficacia es tanto mayor cuanto más baja es la temperatura que se alcanza.

La inestabilidad de las proteínas a causa de la congelación ha dado lugar a numerosos trabajos en estos últimos años; se refiere sobre todo a la leche concentrada 3/1 (Alais, 2003).

### **1.4.3. Expresión de la acción bacteriana**

Recordaremos que el coeficiente de temperatura, en que aparece una modificación, como el oscurecimiento o el sabor a cocido, es netamente inferior a los citados y que siempre interesa elegir un valor elevado de la relación temperatura/tiempo de calentamiento (Alais, 2003).

### **1.5.Fuentes contaminantes en la leche**

Los microorganismos se encuentran en todos lados, en animales, en el aire, en las personas, en la tierra y en el agua y por ende en la leche. La leche de buena calidad, que sea segura para el consumo humano, debe ser el resultado de muy buenas practicas sanitarias monitoreadas a lo largo de los procesos que a esta se la da desde la recolección de la misma hasta cuando ya se la distribuye a la población consumidora (Marroquin Solarte, 2016).

El número de las bacterias que se presentan en la leche reflejara las condiciones bajo las cuales ha sido procesada y nos permitirá determinar el periodo de preservación. En donde las principales fuentes de contaminación en la leche de microorganismos deben estar constituidas por las superficies tales como las ubres y los materiales y utensilio utilizados en el momento del tratamiento y proceso de la leche (Marroquin Solarte, 2016).

Cuando existe la manipulación de la leche, las manos al momento de la extracción de la leche puede ser una fuente principal de contaminante debido a que las manos poseen una gran cantidad de bacterias. Por ello, es muy importante realizar el lavado minucioso de las manos y las superficies con agua limpia (Marroquin Solarte, 2016).

### **1.6.Microorganismos en la leche**

Según (TN RELACIONES, 2016) la leche debido a su composición química y su elevada cantidad de agua, es un magnifica fuente de crecimiento de una gran diversidad de microorganismos. De los cuales se pueden presentar una gran variedad siendo estos benéficos de los que encontramos las bacterias lácticas y algunas alterantes y las esenciales que son muy perjudiciales para nuestra salud.

### **1.7. Microorganismos mesófilos aerobios**

Son todas aquellas bacterias aerobias, mesófilos capaces de crecer en agar nutritivo. Se investigan por el método de recuento en placa con siembra en profundidad, que se basa en contar el número de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido (Agar para recuento en placa o PCA), donde se ha sembrado un volumen conocido de la solución madre o sus disoluciones (1ml), incubadas a 37° C en 24 horas (Food News Latam, 2014).

### **1.8. Microorganismos coliformes**

Los coliformes son bacterias que tienen forma de bastoncillo, que no forman esporas, y son Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas, su característica principal es que fermenta la lactosa con formación de gases al cabo de 48 horas a una temperatura de 35° a 37°C, donde los coliformes se diferencian de estas por ser termo tolerantes y resistentes a temperaturas de 44° a 46° (Camacho, y otros, 2013).

La denominación “Coliformes totales” y “Coliformes fecales” no presentan una validez taxonómica, los cuales estos términos determina o asigna a un grupo de bacterias capaces de crecer en condiciones experimentales específicas (Camacho, y otros, 2013).

#### **1.8.1. Condiciones fisiológicas para su crecimiento**

Estos microorganismos crecen a 20°C y también a temperaturas próximas a 50°C. El crecimiento en los alimentos es pobre a temperaturas de 5°C, aunque ciertos autores afirman que los coliformes crecen entre 3 – 6°C, con respecto al pH se ha señalado que crecen dentro de un amplio margen, con valores comprendidos entre 4,4 a 9.

A diferencia de la mayoría de las bacterias, fermentan la lactosa con producción de gas y esta característica es suficiente para efectuar determinadas presuntivas de coliformes (Camacho, y otros, 2013).

### **1.8.2. Coliformes totales**

El grupo Coliforme está formado por los siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*. No todos los autores incluyen al género *Citrobacter* dentro del grupo Coliformes. No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efectos de emplearlos como indicadores de contaminación. Se distinguen por lo tanto, los Coliformes Totales, que comprende la totalidad del grupo y los Coliformes fecales, aquellos de origen intestinal (Camacho, y otros, 2013).

## **1.9. Microbiología general**

### **1.9.1. Crecimiento microbiano**

Entendemos por **crecimiento microbiano** a un aumento considerable de microorganismos en un determinado tiempo. A lo cual se refiere al crecimiento de un único microorganismo del que se denomina ciclo celular, cambiando al demográfico de una población (Schlegel, 1997).

## **Capítulo 2**

### **Materiales y Métodos**

El presente trabajo investigativo para la recolección de muestras se lo realizó en la ciudad de Quito en tres sectores diferentes Norte (Calderón), Centro (La Marín), Sur (Quitumbe) y para el análisis de las muestras se ejecutó en el Laboratorio de Leche de la Universidad Politécnica Salesiana de Cayambe. Su altitud es de 2830 m.s.n.m, con una temperatura anual promedio de 12 °C.

De esta investigación trata del análisis de microorganismos mesófilos aerobios y coliformes totales al igual de la detección de la presencia o ausencia antibióticos en la leche para ello los resultados se compararon con las normas vigentes en calidad microbiológica de alimentos, por lo tanto el trabajo de investigación no presenta ningún tipo de diseño experimental.

Los tratamientos evaluados fueron a 14 marcas de las cuales fueron 4 de leches pasteurizadas y 10 de ultrapasteurizadas de leche obtenidas en tiendas y panaderías de tres diferentes sectores de la ciudad de Quito (Norte, Centro y Sur) a las cuales se realizaron 4 análisis en el laboratorio cuales durante la realización del trabajo de titulación serán efectuados 4 análisis en el laboratorio.

Debido a que el trabajo de investigación fue una propuesta del Laboratorio de Calidad de Leche de la Universidad Politécnica Salesiana, para determinar la calidad sanitaria de la leche expendida en la ciudad de Quito mediante análisis microbiológico.

Para evitar cualquier inconveniente de tipo legal, nos vemos obligados a no proporcionar nombres de las marcas evaluadas, si no que a todas ellas se las denominó con un código previamente establecido con las letras del alfabeto. (Anexo 1).

Se procedió a identificar los sitios estratégicos en los cuales se realizaron las encuestas dirigidas a las madres de familia del Distrito Metropolitano de la ciudad de Quito, durante los meses de Agosto y Septiembre del 2012.

Las encuestas fueron realizadas en Cumbaya, La Marín, y Calderón, proporcionando estas encuestas a distintas personas en particular madres de familia procedentes de distintos sectores de la ciudad.

Llegando así a obtener un total aproximado de 300 encuestas realizadas.

Encuesta (Anexo 5) se procedió a identificar las marcas de leche más consumidas por los habitantes de la ciudad de Quito, al igual que la determinación de los sitios de mayor expendio.

Posteriormente se procedió a determinar las marcas que servirán de muestras para que el presente trabajo de investigación.

Una vez identificadas las marcas, se procede a la obtención de las mismas en las tiendas y panaderías de la ciudad de Quito en los sectores Norte, Centro y Sur las cuales posteriormente son llevadas al Laboratorio de Leche de la Universidad para su respectivo análisis llenando un formulario (Anexo 6) previamente elaborado el cual sirve para determinar el estado en el que fue adquirido las muestras.

Una vez llevado al Laboratorio se realizó una medición de temperatura y posteriormente se colocó en los refrigerados del Laboratorio de Leche de la Universidad Politécnica Salesiana, luego se elaboraron etiquetas con una codificación para cada muestra las cuales fueron colocadas en los respectivos frascos asépticos en donde se colocó una determinada cantidad que pasaron por distintas etapas de análisis.

Pero antes de ser transvasadas a los frascos, las muestras son analizadas microbiológicamente con las adecuaciones respectivas para evitar cualquier fuente contaminante que pueda afectar los resultados.

Para cada análisis se sigue ciertos protocolos de laboratorio de microbiología los cuales se tomó a consideración para el correcto manejo (Anexo 12) realizando así las soluciones y medios de acuerdo al número de muestras obtenidas durante cada mes.

Pesar 20 gramos de agua de peptona por cada 1000 ml de agua destilada. Posteriormente en un vaso de precipitación de 1800 ml de capacidad colocamos los 20 gramos de agua de peptona y 1000 ml de agua destilada. Luego colocamos la solución en la estufa aproximadamente 15 min, y con la ayuda de una bala magnética agitamos la solución hasta que los grumos del agua de peptona se disuelvan completamente. Después de obtener la solución colocamos 90 ml en vasos asépticos (1 vaso por cada 10 ml de leche a analizar). Colocar 9 ml de agua de peptona en los tubos de ensayo (3 tubos por cada 1ml de leche analizar). Una vez colocadas las respectivas soluciones en los vasos y tubos de ensayo, procedemos a colocarlas en la autoclave para que los materiales y soluciones estén completamente asépticos para evitar cualquier fuente de contaminación. Procedemos a pesar 35 gramos de azul de metileno por cada de 1000 ml de agua destilada. Colocamos 1000 ml de agua destilada en el vaso de precipitación de 1800 ml, posteriormente añadimos la solución de azul de metileno en los 1000 ml de agua destilada. Posteriormente colocamos la solución en la estufa y con la ayuda de un agitador, agitamos la solución hasta que esté totalmente homogeneizada. Luego colocamos la solución homogeneizada en 2 matraces distintos de 500 ml, cubrimos la abertura de los matraces con papel aluminio y los colocamos en la autoclave aproximadamente 20 min. Por último

esparcir la solución azul de metileno en las cajas petri para su posterior siembra. Una vez preparados los medios y completamente esterilizados en el autoclave, se procedió a colocar el agar azul de metileno en las cajas petri verificando que se encuentre completamente esparcidas por las cajas. Limpiamos la cámara de flujo con alcohol, encendemos el mechero ubicada en la cámara con el fin de mantener el ambiente aséptico para evitar cualquier fuente de contaminación y seleccionamos las muestras a analizar, las rociamos con un poco de alcohol antiséptico en la una esquina de la muestras (funda), y posteriormente cortamos la esquina de las fundas y cogemos 10 ml de muestra (leche) y los colocamos en los 90 ml de agua de peptona una para cada muestras, una vez completada 100 ml en los vasos de agar, cogemos 1 ml y colocamos en los tubos de ensayo de 9 ml de agar, también inoculamos 1 ml de la solución en el papel petrifilm (Anexo 7) 2 por muestra.

Para la solución de agar de azul de metileno, sacamos del autoclave lo enfriamos de inmediatamente hasta que la solución este a unos 40°C debemos tener cuidado de que no se solidifique, colocamos la solución de agar en las cajas petri y las cubrimos y las dejamos en la cámara de flujo, una vez solidificadas, procedemos a inocular la solución de agua de peptona de 100 ml solución con agar y muestra y esparcimos en las cajas petri las sellamos y las colocamos en la incubadora a 37°C, las dejamos por un día para que el siguiente se proceda al conteo.

Para la determinación de antibióticos presentes en las leches, se utilizó el método COPAN MILK TEST (Anexo 8) con el siguiente procedimiento. Recortar cuidadosamente los tubos que contienen la solución de agar, de acuerdo al número de muestras que se desea analizar. Con la pipeta especial No Drop Count Pipet se toma 100 uL de leche. Colocar

las muestras de leche, previamente obtenidas con las pipetas en los tubos que contienen la solución de agar.

Finalmente colocar los tubos en la incubadora, previamente encendida, y revisada que se encuentre a 64° C. Esperar 3 horas, tiempo en el que dura la incubación, una vez terminada, revisar las muestras y de acuerdo a la tabla de coloración determinar la presencia de antibióticos.

Luego de 24 horas de haber realizado la siembra se procedió al conteo respectivo de mesófilos aerobios (Anexo 14), contabilizando todas las colonias rojas de borde regular identificadas en las placas petrifilm, realizando estimaciones en placas que contenían de 30 a 300 colonias, contando el número de colonias en uno o más cuadros representativos y obteniendo el promedio y multiplicando dicho número por 20 (medida de crecimiento circular aproximada de los petrifilm).

Después de 3 horas exactamente tiempo en el que dura la prueba, se procede a sacar las muestras de la incubadora eléctrica 230 V AC a 64°C, se observa los tubos con solución de agar y con la ayuda de una tabla de especificaciones la cual determina la presencia o ausencia de antibióticos con una coloración morado violeta si las muestras tienen contaminantes o verde agua si no presentan contaminantes.

Se tabularon los datos de acuerdo a un formato elaborado para este trabajo de investigación (Anexo 9).

Los datos obtenidos después de haber realizado las siembras y conteos fueron llenados en la hoja de Excel para su posterior análisis de acuerdo a las normas establecida de microbiología para alimentos para comparar los resultados obtenidos y establecer un

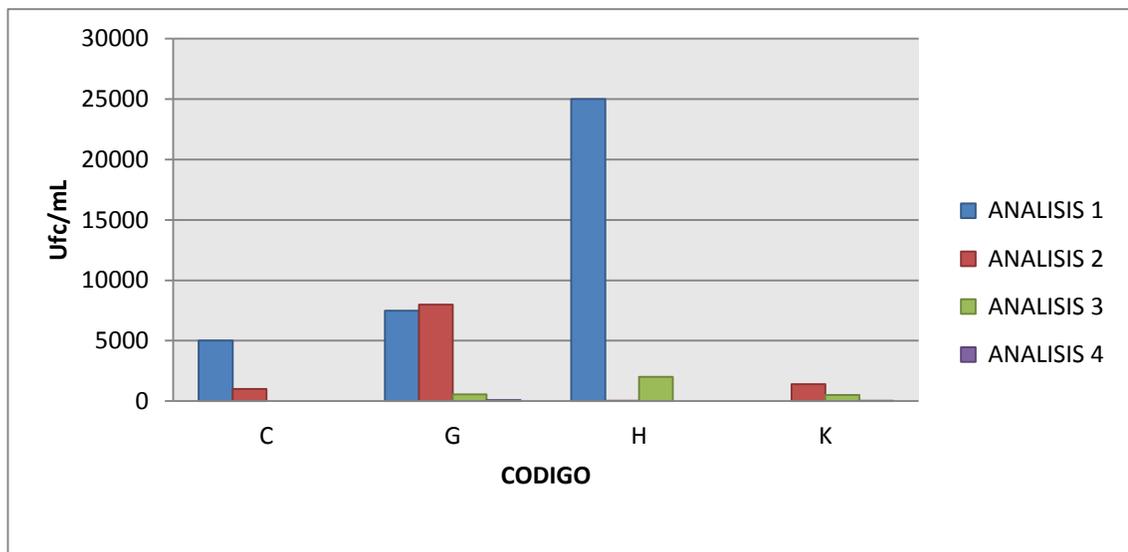
criterio asertivo para el trabajo. Al igual que las de antibióticos de acuerdo a la coloración tomada de las muestras una vez incubadas.

## Capítulo 3

### Resultados y Discusión

#### 3.1. Resultados obtenidos en la determinación de mesófilos aerobios en leches pasteurizadas.

Las marcas de leche pasteurizadas C, G, H, K, presentaron Ufc de Mesófilos aerobios, colonias por debajo de las normas establecidas (Anexo 10)



**Figura 1.** Interpretación de los resultados de mesófilos aerobio Ufc/mL de las 4 marcas de leches pasteurizadas. Elaborado por M. Páez. (2012).

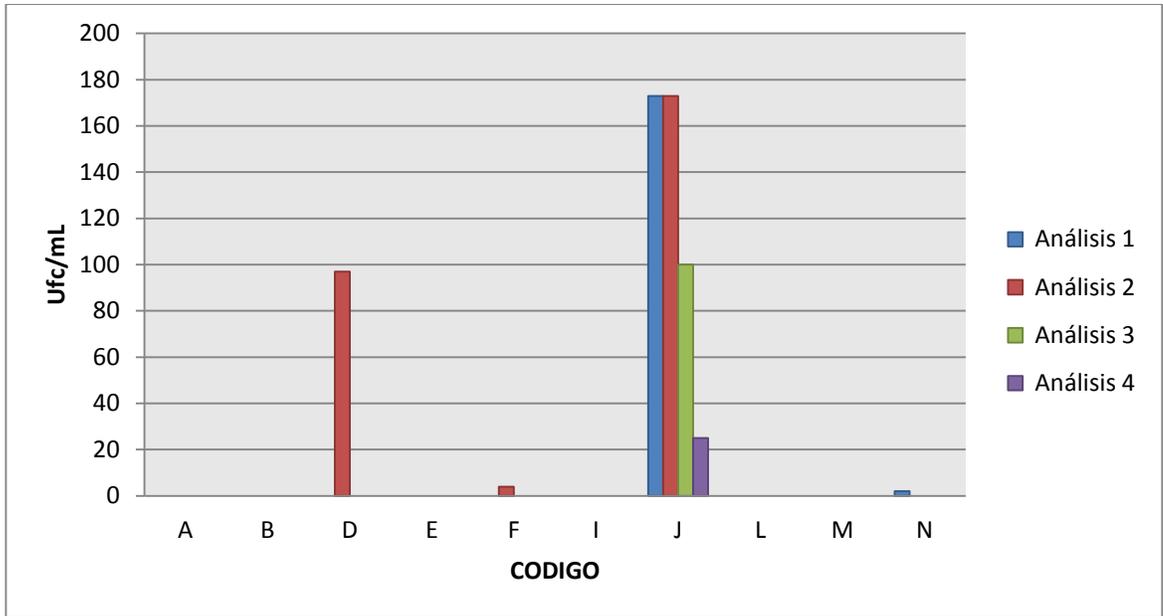
De acuerdo a las Normas INEN (Leche pasteurizada. Requisitos, 2015) en la cual determina que el requisito microbiológico para leches pasteurizadas es de 30 000 Ufc /cm<sup>3</sup> índice máximo permisible para indicar nivel de buena calidad, las marcas analizadas **C**, **G**, **H** y **K**, se encuentran fuera de ese rango, determinando que las leches pasteurizadas son de buena calidad a nivel microbiológico.

La marca **H** se encuentra en un rango de 25 000 Ufc/mL, estando por debajo de la Norma INEN (Leche pasteurizada. Requisitos, 2015), siendo la marca que presentó un mayor

conteo de colonia de mesófilos aerobios con respecto a las otras marcas, de acuerdo por la Norma COVENIN (Max.  $2 \times 10^4$  Ufc/mL) (Valvuen, y otros, 2016), el cual podemos notar que de acuerdo a esta norma la marca de leche H sale de este rango el cual sería catalogada como leche de baja calidad, pero no en nuestro caso ya que para las normas ecuatorianas esta entre el rango permitido.

### **3.2. Resultados obtenidos en la determinación de mesófilos aerobios en leches Ultrapasteurizadas (UHT)**

De acuerdo a los resultados obtenidos (Anexo 4) que los rangos establecidos en el ensayo fueron para las muestras **A, B, I, J, M y N** de cero contaminación, mientras la **D** con 97 Ufc, en la muestra **E** hubo presencia de 4 Ufc, mientras que en las otras muestras no hubo presencia, en la **F** con rangos de 173 Ufc en el primer análisis, 173 Ufc en el segundo análisis, 100 Ufc en el tercer análisis y 25 Ufc en el cuarto análisis, en la muestra **L** solo se encontró mesófilos en la primera muestra con 2 Ufc, de acuerdo a la Norma NTE INEN 2 335 (Anexo 11) la cual determina la presencia de 10 colonias Ufc/mL es decir 1000 Ufc presentes, las muestras analizadas se encuentran muy por debajo de la cantidad establecida con lo que se puede decidir que las muestras cumplen con las normas establecidas.



**Figura 2.** Interpretación de resultados de mesófilos aerobios Ufc/mL, en 10 marcas de leches ultrapasteurizadas. Elaborado por M. Páez (2012).

Como podemos observar la marca J fue la que presento un mayor rango de presencia de mesófilos aerobios estando entre 160 a 180 Ufc/mL, pero de acuerdo a la Norma NTE INEN 2 335 (Ministerio de la Protección Social, 2015), determina 1000 Ufc/mL por lo cumple con la norma.

### 3.3. Resultados para la determinación de coliformes totales en leches pasteurizadas

Tabla 1. Ufc de Coliformes Totales en leches pasteurizadas.

Código	Suma de Si cumple la norma <1 Ufc/mL	Suma de no cumple la norma > 1 Ufc/MI	Suma de Si cumple la norma < 1 Ufc	Suma de no cumple la norma > 1 Ufc	Suma de Si cumple la norma < 1 Ufc2	Suma de no cumple la norma > 1 Ufc2	Suma de Si cumple la norma < 1 Ufc3	Suma de no cumple la norma > 1 Ufc3
C	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0	0
Total general	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: Elaborado por M. Páez (2012)

Como se observa, las marcas C, G, H, K no tienen presencia de Coliformes Totales aunque la Norma de requisitos microbiológicos (Leche pasteurizada. Requisitos, 2015) determina que el recuento de coliformes, UFC/cm<sup>3</sup> es de <1 índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad (Anexo 11)

Por lo tanto las leches fluidas que se expenden en la ciudad de Quito, no sobrepasan los niveles de microorganismos presentes, por ende cumplen con las normas vigentes.

De acuerdo a las norma COVENIN determina  $1,0 \times 10^2$  Ufc/mL (Valvuela, y otros, 2016) el cual determina 100.

### 3.4. Determinación de coliformes totales para leches Ultrapasteurizadas

Tabla 2. Determinación de Ufc de Coliformes Totales en leches UHT consumidas en la ciudad de Quito.

Código	Suma Si cumple la norma <1 Ufc/mL	Suma no cumple la norma >1 Ufc/mL	Suma Si cumple la norma <1 Ufc/mL	Suma no cumple la norma >1 Ufc/mL	Suma Si cumple la norma <1 Ufc2/mL	Suma no cumple la norma >1 Ufc2/mL	Suma Si cumple la norma <1 Ufc3/mL	Suma no cumple la norma >1 Ufc3/mL
A	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0
F	264	0	312	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>264</b>	<b>0</b>	<b>312</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

general

Nota: Elaborado por M. Páez (2012)

Como podemos observar, las muestras de leches no presentaron presencia de coliformes presentes a excepción de la marca **F** la cual en los conteos presento un rango dando en el

primer análisis 264 ufc y en el segundo análisis 312 ufc superando así la cantidad establecida para leches UHT (Anexo 11). Al ser de proceso ultrapasteurizadas no debería existir presencia, por lo cual esta marca no cumple con las normas por lo tanto se la cataloga como de muy baja calidad.

### 3.5. Determinación de antibióticos en leches pasteurizadas.

Tabla 3. Determinación de antibióticos en leches pasteurizadas consumidas en la ciudad de Quito.

Código	Antibiótico							
	Análisis 1		Análisis 2		Análisis 3		Análisis 4	
	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
C		Positivo		Positivo	Negativo		Negativo	
G		Positivo		Positivo		Positivo		Positivo
H	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
K	Negativo		Negativo			Positivo	Negativo	

Nota: Elaborado por M. Páez (2012)

Con respecto a la determinación de antibióticos, se encontró antibióticos por medio del método COPAN, en la marca C de 4 muestras analizadas en 2 se encontró antibióticos y las otras 2 el resultado dio negativo con lo cual nos muestra un 50 por ciento de presencia en las marcas analizadas, catalogándola así como leche de baja calidad.

En la marca G la presencia de antibiótico fue positiva de las 4 muestras analizadas dando un 100 por ciento de presencia la cual también se la cataloga como leche de baja calidad.

La marca H de 4 muestras analizadas el resultado fue negativo, lo cual se puede decir que esta leche es de buena calidad.

Y la última muestra de leches pasteurizadas la marca K del total de las 4 muestras analizadas 1 dio como resultado positivo, las 3 restantes negativo, dando un 20 por ciento entre las muestras, por cual se puede decir que la marca esta entre leches de buena calidad

### 3.6. Determinación de antibióticos en leches Ultrapasteurizadas

Tabla 4. Determinación de Antibióticos en leches UHT consumidas en la ciudad de Quito

Código	Antibiótico							
	Análisis 1		Análisis 2		Análisis 3		Análisis 4	
	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
A	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
B		Positivo		Positivo		Negativo		Positivo
D	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
E	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
F		Positivo	Negativo		Negativo		Negativo	
I		Positivo		Positivo		Positivo		Positivo
J	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
L	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
M	Negativo		Negativo		Negativo		Negativo	
N		Positivo	Negativo		Negativo		Negativo	

Nota: Elaborado por: M. Páez (2012)

De acuerdo a las muestras y a los resultados obtenidos podemos determinar que las leches UHT al ser de procesos mucho más estandarizados y estrictamente controlados presentan poca presencia de antibióticos sin embargo varias muestras presentaron presencia de antibióticos por lo cual no estamos exentos o con la seguridad de que estamos consumiendo leches de buena calidad.

## **Conclusiones**

De las muestras analizadas en dos procesos diferentes como lo son las leches pasteurizadas y Ultrapasteurizadas, podemos concluir que existe un bajo porcentaje de mesófilos aerobios y coliformes totales cumpliendo así las con normas INEN.

Con respecto a las leches UHT mismas que cumplen un estricto control de procesamiento se determinó una baja cantidad de mesófilos aerobios y coliformes, lo que quedaría saber es si lo encontrado se debió a un mal manejo durante el proceso de elaboración o fue durante el análisis de las mismas donde se produjo la contaminación, pero aun así las leches cumplen con las normas siendo estas leches de buena calidad.

Con respecto a la presencia de antibióticos las leches pasteurizadas presentan un alto porcentaje de presencia de antibióticos.

En las leches UHT que deben cumplir un estricto proceso de calidad para garantizar el consumo, se determinó la presencia de antibióticos en mínima cantidad con respecto a las pasteurizadas pudiendo ser catalogadas de buena calidad dejando a un lado la determinación y análisis individual de las marcas.

El consumo de leches como producto alimenticio principal de nuestro país, y sobre todo en el control que se realiza en la adquisición del producto como lo es la leche cruda, se deja pasar leche contaminada con residuos de antibióticos, sobre todo el control de leche cruda lo que muestra un desinterés por parte de las empresas y autoridades competentes ya que a largo plazo el consumo de las mismas puede traer consigo problemas de salud al consumidor.

## **Recomendaciones**

Se debería realizar un estudio más afondo acerca de los procesos que siguen tanto leches pasteurizadas y UHT, para determinar así las fuentes contaminantes y en qué fase de producción se produce la contaminación, para así tomar medidas de control y asegurar la calidad de un producto sobre la población que la consume.

Socializar estas investigaciones para mantener informado al consumidor con el fin de exigir que lo que consumimos sea de muy buena calidad.

Las empresas deben tener más control en la adquisición de la leche cruda con el fin de que se garantice un producto libre de antibióticos reduciendo los riesgos para nuestra salud.

## Referencias

- Alais, C. (2003). Ciencia de la leche. En *Principios de Técnica Lechera*. España: Reverté, S.A.
- Camacho, A., Giles, M., Palao, M., Ortegón, A., Serrano, B., & Velázquez, O. (17 de 09 de 2013). *Método para la determinación de coliformes* . Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP\\_6529.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf)
- CMT-Copan Milk Test. (16 de 09 de 2015). *CMT*. Obtenido de [https://www.globalcube.net/clients/beldico/content/medias/products/6\\_imp/labo/diagnostics/diary/copan\\_copan\\_milk\\_test.pdf](https://www.globalcube.net/clients/beldico/content/medias/products/6_imp/labo/diagnostics/diary/copan_copan_milk_test.pdf)
- Food News Latam. (18 de 09 de 2014). *Food News Latam ¿Que son los microorganismos mesofilos?* Obtenido de <http://www.foodnewslatam.com/inocuidad/53-control-calidad/2499-%C2%BFque-son-los-aerobios-mesofilos.html>
- Frazier, W., & Westhoff, D. (1993). Microbiología de alimentos. En *Microbiología de Alimentos 4ta Edición*. Zaragoza: Acribia.
- GLOBAL HEALING CENTER. (25 de JULIO de 2012). *LOS PELIGROS DE BEBER LECHE DE VACA*. Obtenido de <http://www.globalhealingcenter.net/salud-natural/peligros-leche-vaca.html>
- Leche pasteurizada. Requisitos. (18 de 09 de 2015). *NTE INEN 0010* . Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0010.2012.pdf>
- Marroquin Solarte, K. T. (09 de 04 de 2016). *LÁCTEOS: FUENTES DE CONTAMINACIÓN*. Obtenido de <http://lacteostama.blogspot.com/p/fuentes-de-contaminacion.html>

MICROORGANISMOS Y ALIMENTOS. (09 de 04 de 2016). *Microorganismos y Alimentos-Epralima*. Obtenido de [http://www.epralima.com/infoodquality/materiais\\_espanhol/Manuais/3.Microorganismos\\_y\\_alimentos.pdf](http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf)

Ministerio de la Protección Social. (25 de 10 de 2015). Ministerio de la Protección Social. Colombia.

Ochoa, I., & Garcia, O. (09 de 04 de 2016). *Derivados Lacteos*. Obtenido de Características físicas de la leche: [http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21\\_1/alephe/www\\_f\\_spa/icon/31496/pdf/b2\\_car1.pdf](http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21_1/alephe/www_f_spa/icon/31496/pdf/b2_car1.pdf)

Protocolo microbiología general Manual. (10 de 02 de 2016). *protocolos microbiología general Manual-Biblioteca digital*. Obtenido de <http://bibliotecadigital.usbcali.edu.co/jspui/bitstream/10819/187/1/ProtocolosMicrobiologia.pdf>

Ramos, N. (16 de 11 de 2014). *Crecimiento microbiano en la leche* by Nuria Ramos on Prezi. Obtenido de <https://prezi.com/vywagnphxoo/crecimiento-microbiano-en-la-leche/>

Schlegel, H. G. (1997). *Microbiología General*. Barcelona: Omega .

Schweis. (16 de 09 de 2015). *Consistencia y Productividad*. Obtenido de [http://solutions.3mschweiz.ch/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en\\_WW&lmd=1307530995000&assetId=1273685360656&assetType=MMM\\_Image&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.3mschweiz.ch/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en_WW&lmd=1307530995000&assetId=1273685360656&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile)

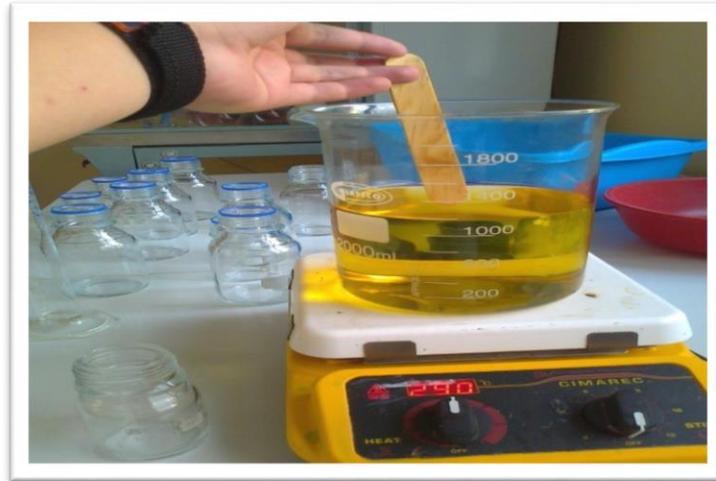
TN RELACIONES. (10 de 04 de 2016). *Microbiología de la leche-Tn Relaciones*. Obtenido de [http://www.tnrelaciones.com/cm/preguntas\\_y\\_respuestas/content/240/3180/es/microbiologia-de-la-leche.html](http://www.tnrelaciones.com/cm/preguntas_y_respuestas/content/240/3180/es/microbiologia-de-la-leche.html)

Valvuen, E., Castro, G., Lima, K., Acosta, W., Bríñez, W., & Tovar, A. (7 de 02 de 2016). *calidad microbiológica de las principales marcas de leche* . Obtenido de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28016/2/art8.pdf>

Varnam, A. (1994). *Leche y productos lácteos*. Acribia.

## Anexos

### Anexo 1. Fotografías en Laboratorio



**Anexo 1a. Preparación de la solución de agua de peptona.**



**Anexo 1b. Preparación de azul de metileno.**



**Anexo 1c. Colocación de las soluciones en el autoclave para la respectiva esterilización.**



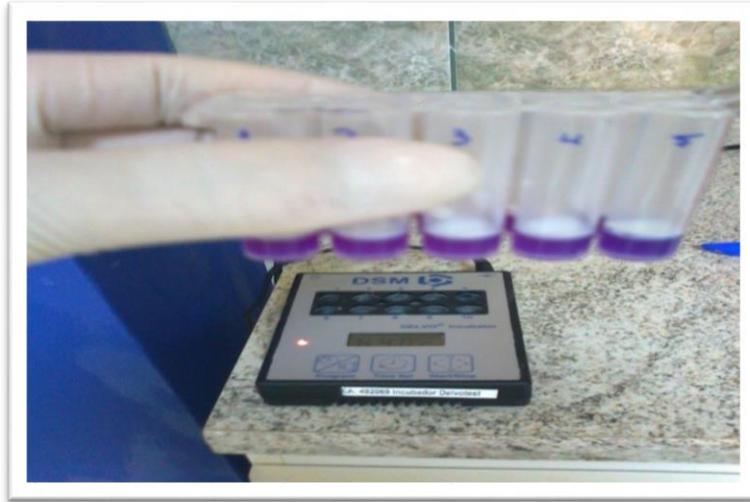
**Fotografía 4. Preparación de las cajas Petri en la cámara de flujo laminar.**



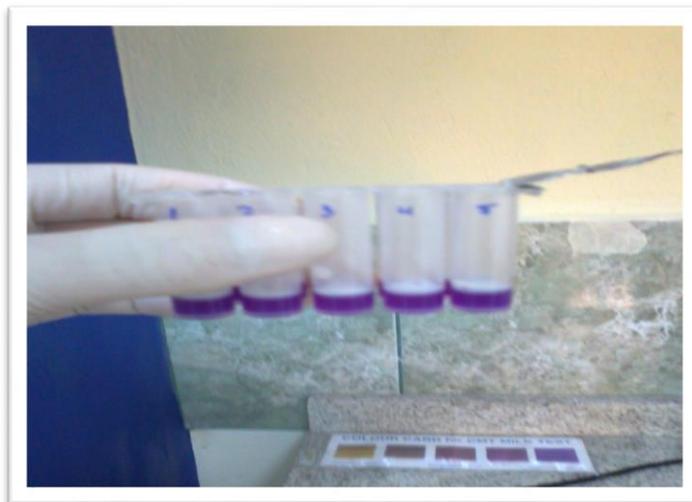
**Anexo 1d. Colocación de las cajas Petri en la incubadora.**



**Anexo 1e. Método COPAN MILK TEST, en la determinación de antibióticos de las muestras.**



**Anexo 1f. Determinación y análisis de los antibióticos presentes en las muestras.**



**Anexo 1g. Análisis de los antibióticos presentes en las muestras de leches mediante la tonalidad que presenten las muestras.**

## Anexo 2. Codificación de la leches a analizar obtenidas en la ciudad de Quito 2012

Nº	CODIFICACIÓN	TIPO	OBSERV
1	A	UHT	Funda
2	B	UHT	Funda
3	C	PASTEURIZADA	Funda
4	D	UHT	Cartón
5	E	UHT	Funda
6	F	UHT	Funda
7	G	PASTEURIZADA	Funda
8	H	PASTEURIZADA	Funda
9	I	UHT	Funda
10	J	UHT	Funda
11	K	PASTEURIZADA	Funda
12	L	UHT	Cartón
13	M	UHT	Funda
14	N	UHT	Funda

Nota: Elaborado por: M. Páez (2012)

**Anexo 3. Determinación de mesófilos aerobios en leches pasteurizadas de acuerdo a las Normas.**

Código	Suma de Si cumple la norma < 30000 Ufc/mL	Suma de no cumple la norma > 30000 Ufc/ml	Suma de Si cumple la norma < 30000 Ufc/ml2	Suma de no cumple la norma > 30000 Ufc/ml2	Suma de Si cumple la norma < 30000 Ufc/ml3	Suma de no cumple la norma > 30000 Ufc/ml3	Suma de Si cumple la norma < 30000 Ufc/ml4	Suma de no cumple la norma > 30000 Ufc/ml4
C	5000	0	1000	0	0	0	0	0
G	7500	0	8000	0	553	0	100	0
H	25000	0	12	0	2000	0	0	0
K	0	0	1400	0	517	0	14	0
<b>Total general</b>	<b>37500</b>	<b>0</b>	<b>10412</b>	<b>0</b>	<b>3070</b>	<b>0</b>	<b>114</b>	<b>0</b>

**Nota:** Elaborado por: M. Páez (2012)

**Anexo 4. Determinación de mesófilos aerobios en leches UHT de acuerdo a las Normas.**

Código	Suma de Si cumple la norma < 1000 Ufc/mL	Suma de no cumple la norma > 1000 Ufc/ml	Suma de Si cumple la norma < 1000 Ufc/ml2	Suma de no cumple la norma > 1000 Ufc/ml2	Suma de Si cumple la norma < 1000 Ufc/ml3	Suma de no cumple la norma > 1000 Ufc/ml3	Suma de Si cumple la norma < 1000 Ufc/ml4	Suma de no cumple la norma > 1000 Ufc/ml4
A	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	97	0	0	0	0	0
E	0	0	4	0	0	0	0	0
F	173	0	173	0	100	0	25	0
I	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	0	0	0
L	2	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total general</b>	<b>175</b>	<b>0</b>	<b>274</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>0</b>

Nota: Elaborado por: M. Páez (2012)

## Anexo 5. Formato de encuesta dirigida a las madres de familia de la ciudad de Quito.

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LA LECHE  
ENCUESTA**

**OBJETIVO**

Determinar las marcas y tipos de leche más consumidas en Quito, para hacer análisis físicos, químicos y microbiológicos de las mismas. Esta encuesta no tiene fines comerciales. Gracias por su colaboración

**ENFOQUE: Hombres y Mujeres entre 18-75 años de edad**

**1. DATOS DEL ENCUESTADO/A:**

Nombre:

Edad:

Sector donde vive en Quito: Norte \_\_\_\_\_ Centro \_\_\_\_\_ Sur \_\_\_\_\_

**2. ¿Con que frecuencia usted adquiere leche?**

Diario.....

Semanal.....

Quincenal.....

Mensual.....

Nota:

Elaborado por: M. Páez (2012)

**3. ¿A qué hora compra la leche ? (aclarar horas)**

▪ Mañana.....

▪ Tarde.....

▪ Noche.....

**4. ¿Qué tipo de leche consume?**

Leche Procesada

Leche cruda

**5. En orden de importancia del 1 al 4, (1 más importante 4 menos importante) indique dónde compra leche?**

<b>Supermercado</b>	<b>Tienda</b>	<b>Panadería</b>	<b>Otro (especifique)</b>

**6. En orden de importancia mencione las marcas, envase y tipo de leche que prefiere.**

Nº	Marca	ENVASE			TIPO DE LECHE					
		Pasteurizada-funda	Funda UHT	Cartón	Leche entera	Leche en polvo	Descremada	Semidescremada	Deslactosada	Otros (especifique)
1										
2										
3										
4										
5										

Agradecemos cualquier sugerencia. \_\_\_\_\_

**Contactos: Laboratorio de Calidad de leche. Telf: 3962946 bioagrolab@ups.edu.ec/rcontero@ups.edu.ec**

## Anexo 6. Formulario de recepción de las muestras de leche

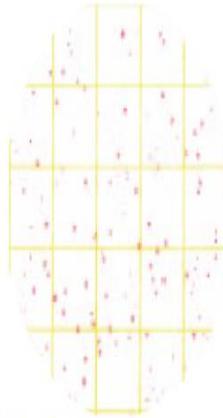
### Formulario de recepción de leche

Fecha de ingreso	Procedencia de la muestra	Tipo de leche	Marca	Hora de análisis	Observaciones

Nota: Elaborado por: M. Páez (2012)

## Anexo 7. Funciones y características del papel petrifilm

# Placas 3M™ Petrifilm™ ... Funciones y características.



Placa Petrifilm para recuento de aerobios

- Recuento de la flora total aeróbica.
- Lectura facilitada por un pigmento indicador que tiñe las colonias de rojo.



Placa Petrifilm para recuento de enterobacterias

- Recuento de *Enterobacteriaceae*.
- Evidencia de acidificación por medio de indicador de pH que vira a amarillo.
- Evidencia de producción de gas debido a que el film superior retiene el gas de fermentación de la glucosa.

Fuente: (Schweis, 2015)





## Anexo 10. Normas INEN para los requisitos microbiológicos en leches pasteurizadas.

NTE INEN 10

2012-04

**TABLA 2. Requisitos microbiológicos para leche pasteurizada**

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos mesófilos, UFC/cm <sup>3</sup>	5	30 000	50 000	1	NTE INEN 1 529-5
Recuento de coliformes, UFC/cm <sup>3</sup>	5	< 1	10	1	AOAC 991.14
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	0	-	0	ISO 11290-1
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	5	0	-	-	NTE INEN 1529-15
Recuento de <i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	-	0	AOAC 991.14

Donde:

n = Número de muestras a examinar.

m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

**5.1.6 Contaminantes.** El límite máximo de contaminantes es el que se indica en la tabla 3.

**TABLA 3. Límites máximo para contaminantes**

Requisito	Límite máximo (LM)	Método de ensayo
Plomo, mg/kg	0,02	ISO/TS 6733
Aflatoxina M1, µg/kg	0,5	ISO 14674

**5.1.7** Los residuos de medicamentos veterinarios y sus metabolitos no podrán superar los límites establecidos por el Codex Alimentario CAC/MLR 2.

**5.1.8** Los residuos de plaguicidas, pesticidas y sus metabolitos, no podrán superar los límites establecidos por el Codex Alimentario en su última edición CAC/MLR 1

### 5.2 Requisitos complementarios

**5.2.1** La leche pasteurizada envasada y colocada en el mercado, no debe ser reprocesada y debe ser vendida en su envase original.

**5.2.2** Los envases de polietileno deben llevar la declaración de "no reutilizable" y el signo de "reciclable"

**5.2.3** La leche pasteurizada debe mantener la cadena de frío en el almacenamiento, distribución y expendio a una temperatura de 4 °C ± 2 °C.

**5.2.4** El almacenamiento, distribución y expendio de la leche pasteurizada debe realizarse en el envase original.

## 6. INSPECCIÓN

**6.1 Muestreo.** El muestreo debe realizarse de acuerdo con la NTE INEN 4.

**6.2 Criterios de aceptación y rechazo.** Se acepta el producto si cumple con los requisitos establecidos en esta norma; caso contrario ser rechaza.

(Continúa)

Fuente: (Leche pasteurizada. Requisitos, 2015)

**Anexo 11. Características microbiológicas de leches ultrapasteurizadas índice permisible de microorganismos.**

**Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada**

Indices permisibles	n	M	M	C
Rto. Microorganismos mesófilos ufc/ ml	3	1.000	10.000	1
Rto. Coliformes ufc/ml	3	Menor de 1	-	0
Rto. Coliformes fecales ufc/ml	3	Menor de 1	-	0
Rto. Esporas anaerobias ufc/ml	3	Menor de 1	-	0
Rto. Esporas aeróbicas ufc/ml	3	Menor de 1	-	0

Fuente: (Ministerio de la Protección Social, 2015)

## Anexo 12. Protocolos para el análisis microbiológico de alimentos.

# Protocolo 7

## Análisis microbiológico de alimentos

La investigación de alimentos requiere especial atención para identificar microorganismos patógenos para el consumidor. Este examen permite obtener pautas para establecimiento y sobre todo para las normas de higiene.

*Microorganismos indicadores:* Este término se aplica a cualquier grupo taxonómico, fisiológico o ecológico de microorganismos cuya presencia proporcione evidencias indirectas de que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran determinar la llegada de microorganismos peligrosos o permitir la proliferación de especies patógenas o toxicogénicas. Los organismos patógenos son de gran utilidad tanto para determinar la calidad bacteriológica de los alimentos como la garantía que ofrecen al consumidor.

*Escherichia coli y coliformes:* Estos microorganismos habitan en el tracto digestivo de hombre y animales, su presencia indica contaminación directa o indirecta de origen fecal, la presencia de *E. coli* advierte el riesgo de que pudieran estar presente bacterias patógenas entéricas. Los coliformes son buenos indicadores de limpieza y desinfección inadecuada o de manipulación o tratamientos incorrectos de los alimentos.

*Streptococcus salivarius:* Es un microorganismo indicador de contaminación oral, puesto que forma parte de la flora bucal.

*Staphylococcus aureus:* Su presencia en el alimento se interpreta como contaminación proveniente de la piel, la boca o fosas nasales.

## Anexo 13. Protocola para el análisis de Coliformes totales

- Transferir 1 ml. de la dilución  $10^{-1}$  a un tubo que contenga 9 ml del diluyente (agua peptonada) para obtener la dilución  $10^{-2}$  y así sucesivamente hasta formar la dilución  $10^{-5}$
- Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración anterior. Los tubos deben estar bien rotulados.

### Inoculación

#### Número más probable de coliformes totales y fecales

##### Prueba presuntiva para coliformes totales

- Se debe pipetear 1 de cada una de las diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) en tubos con caldo brilla, utilizando 3 tubos por dilución.
- Incubar los tubos a 37C por 24-48 horas.
- Pasadas las 24-48 horas anotar los tubos que muestren producción de gas, lo cual puede observarse por el desplazamiento del tubo de Durham.

##### Prueba confirmativa para coliformes totales

Confirmar que los tubos con producción de gas en la prueba presuntiva son positivos, inoculando 3 a 5 gotas en otros tubos con caldo brilla

- Incubar los tubos a 44.5C por 24 horas baño maría.
- Pasado 24 horas anotar los tubos que muestren producción de gas.
- Anotar los tubos que tiene producción gas y revelar el caldo triptona con el reactivo de Kovac's; agitar suavemente y observar la presencia de un anillo rojo en la superficie.

##### Interpretación de los resultados

Leer la tabla NMP (Número más probable) para saber el resultado de acuerdo con el número de tubos positivos, tanto para los coliformes totales, según el resultado de la prueba confirmativa y para los coliformes fecales, según el caldo brilla y el caldo triptona incubado a 44.5 °C.

##### Determinación de E coli

Se logra a partir de los tubos positivos de la prueba confirmativa –sembrar por estría– tomando una muestra con una asa de cada uno de los tubos en la superficie de una placa de agar EMB (Eosina azul de metileno).

## Anexo 14. Protocolo para la determinación de mesófilos aerobios

---

*Manual de protocolos de microbiología general*

---

- Incubar las cajas invertidas a 37 °C por 24 - 48 horas.

Pasado este tiempo se hace la lectura de las colonias típicas de *E coli*, aquella que presentan un brillo verde metálico.

### **Recuento de mesófilos**

La presencia de este tipo de microorganismos refleja las deficiencias en el proceso de elaboración del alimento.

- Se debe transferir por duplicado alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones  $10^1$  a  $10^5$  en cajas de Petri vacías estériles y previamente marcadas.
- Inmediatamente adicionar a las cajas el agar cuenta gérmenes fundidos.
- Inmediatamente mezclar el inoculo con el medio fundido, moviendo suavemente la caja hacia arriba, hacia abajo y en forma circular.
- Dejar solidificar el agar.
- Invertir e incubar las cajas de petri a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se deben contar las colonias que hayan crecido en cajas que contengan entre 30 y 300 colonias observables.

Los resultados deben expresarse con 2 dígitos y el resto en potencia de 10. Cuando el recuento se utiliza para determinar la aceptación de un alimento se compara con los valores límites establecidos según la normatividad del Ministerio de Salud, del Invima o las normas Icontec.

### **Recuento de enterobacterias totales**

Generalmente, la contaminación del alimento se adquiere por un proceso de manipulación inadecuado y posterior a la preparación misma del producto.

- Transferir por duplicado alícuotas de una de cada uno de las diluciones ( $10^1$  a  $10^5$ ) en cajas de Petri estériles y previamente marcadas.
- Adicionar el agar cristal violeta rojo neutro bilis glucosa.
- Mezclar las diluciones con el medio. Agregar 5 ml del agar mencionado anteriormente.
- Incubar durante 24 horas.
- Seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias violeta, rodeadas de un precipitado rojo violeta.
- Confirmar estas colonias con la prueba de oxidasa.

---

48

---

Fuente: (Protocolo microbiología general Manual, 2016)