



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LECHE CRUDA BOVINA
RECOLECTADA EN TRES CENTROS DE ACOPIO DE SIERRA, COSTA Y ORIENTE**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: JAZMÍN NICOLE OLIVO GUILLÍN

TUTOR: NANCY FABIOLA BONIFAZ GARCÍA

Quito - Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Jazmín Nicole Olivo Guillín con documento de identificación N° 1726498767 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 17 de noviembre del 2023

Atentamente,



Jazmín Nicole Olivo Guillín
1726498767

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Jazmín Nicole Olivo Guillín con documento de identificación No. 1726498767, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Evaluación de la calidad higiénica de leche cruda bovina recolectada en tres centros de acopio de Sierra, Costa y Oriente”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 17 de noviembre del 2023

Atentamente,



Jazmín Nicole Olivo Guillín
1726498767

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Nancy Fabiola Bonifaz García con documento de identificación N° 0602085110, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LECHE CRUDA BOVINA RECOLECTADA EN TRES CENTROS DE ACOPIO DE SIERRA, COSTA Y ORIENTE**, realizado por Jazmín Nicole Olivo Guillín con documento de identificación N° 1726498767, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 17 de noviembre del 2023

Atentamente,



Dra. Nancy Fabiola Bonifaz García, MSc.
0602085110

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

El siguiente Trabajo de Titulación lleva mis más sinceros agradecimientos a los que se han encontrado en mi caminar durante todos estos años de estudio, desde sus inicios hasta hoy.

En primer lugar agradezco a la vida por darme la dicha de existir, aquí y ahora para que esto sea posible, a mis amados y cariñosos padres Alison y Alberto, por brindarme la educación y que con su amor y enseñanzas me han llevado de su mano en cada paso para tomar las mejores decisiones mediante los valores que me han inculcado desde pequeña, no solo para convertirme en una gran profesional sino para ser la mujer que soy hoy, mi abuelita Martha y mi tío Esteban que me han ofrecido de su cálido afecto y apoyo en los momentos más requeridos a lo largo de mi carrera estudiantil, a toda mi querida familia que tanto en la cercanía como en la distancia han estado presentes de diversas maneras ofreciéndome confort y ánimos, a mis queridos profesores que con su ardua labor supieron impartirme sus conocimientos teóricos y prácticos, académicos y personales con los que seguiré mi camino como Biotecnóloga, a mi Tutora Dra. Nancy Bonifaz que ha estado conmigo en las aulas desde el inicio y que con su dedicación, profesionalismo y paciencia me ha ayudado en el logro del presente trabajo, a la Ing. Paola Simbaña Coordinadora del Laboratorio de Calidad de Leche de Cayambe UPS (LCL) que me ha guiado con sus conocimientos para la realización de mi Tesis y a todos los técnicos parte del LCL que han puesto de su tiempo y colaboración para llevar esto adelante con éxito, a mis preciados compañeros que han sido mis acompañantes en el estudio de la carrera, que juntos aprendimos y enfrentamos cada desafío que se nos presentó en todo este recorrido para ahora ser los profesionales que siempre quisimos ser, y por último a mi querida Universidad que me prestó de sus acogedoras instalaciones y servicios por todo este tiempo.

Agradezco a cada uno, por todo lo que son y lo que han sido conmigo, por cada aprendizaje mi más sincero GRACIAS.

A la memoria de quienes en vida fueron:

Salvador Lara (Mi abuelito)

Erika Vallejos (Mi amiga y compañera)

Gracias por ser quienes eran cuando estuvieron a mi lado, los llevaré conmigo siempre.

RESUMEN

Uno de los productos de mayor consumo a nivel nacional es la leche proveniente del ganado bovino en el Ecuador, por lo que la calidad higiénica y sanitaria es un parámetro indispensable para garantizar la inocuidad del producto brindando a los consumidores leche apta para el consumo. El análisis de bacterias mediante el conteo total (CBT) es la medida predilecta para comprobar la cantidad de microorganismos patógenos de una muestra de leche, en la que se aplican dos métodos, el método tradicional que permite el conteo de Unidades Formadoras de Colonias CFU/ml por medio de la siembra en placa y el método alternativo que lo realiza por la técnica de Citometría de flujo que expresa el contaje por Conteo Individual de Bacterias IBC/ml. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad higiénica de la leche cruda bovina de centros de acopio/empresas de la Sierra, Costa y Oriente ecuatoriano mediante la evaluación de los resultados obtenidos por ambos métodos empleados y el desarrollo de una curva de correlación que permita conocer cuál de ellos es el más eficiente, además de determinar los microorganismos patógenos en las muestras analizadas para el conocimiento de las causas de su presencia. Para este análisis se utilizaron 200 muestras de leche con valores de 30 a 3000 CBT's; los resultados se obtuvieron bajo la prueba de ambos métodos siguiendo los límites permisibles de la Norma ISO 16297 y la Norma ISO 4833-1:2013 y el reconocimiento de las bacterias por medio de pruebas bioquímicas específicas. Se pudo concluir que la correlación entre los dos métodos es lineal por lo que ambos son viables para el Conteo Total de Bacterias, además de que dos bacterias contaminantes fueron las predominantes en el estudio, de acuerdo con las pruebas realizadas.

Palabras clave: leche cruda, higiene, microorganismos, CBT.

ABSTRACT

One of the most consumed products at national level is milk from cattle in Ecuador, so the hygienic and sanitary quality is an essential parameter to ensure the safety of the product providing consumers with milk suitable for consumption. The analysis of bacteria by total bacterial count (TBC) is the preferred measure to check the amount of pathogenic microorganisms in a milk sample, in which two methods are applied, the traditional method that allows the counting of Colony Forming Units CFU/ml by sowing on a plate and the alternative method that performs it by the flow cytometry technique that expresses the count by Individual Bacterial Count IBC/ml. The objective of this study was to evaluate the hygienic quality of raw bovine milk from collection centers/companies of the Ecuadorian highlands, coast and east by evaluating the results obtained by both methods and developing a correlation curve to determine which method is the most efficient, as well as to determine the pathogenic microorganisms in the samples analyzed in order to determine the causes of their presence. For this analysis, 200 milk samples with values from 30 to 3000 CBT's were used; the results were obtained under the test of both methods following the permissible limits of ISO Standard 16297 and ISO Standard 4833-1:2013 and the recognition of bacteria by specific biochemical tests. It could be concluded that the correlation between the two methods is linear, so both are viable for the Total Bacterial Count, in addition to the fact that two contaminating bacteria were the predominant ones in the study, according to the tests performed.

Keywords: raw milk, hygiene, microorganisms, CBT.

INDICE CONTENIDOS

Contenido

1. Introducción	1
2. Fundamentación teórica	4
2.1. Normativas.....	4
2.1.1. Codex Alimentarius	4
2.1.2. Normas INEN	5
2.1.3. Normas ISO	6
2.2. Análisis de Trazabilidad	10
2.2.1. Trazabilidad metrológica	10
2.3. Análisis Microbiológico	12
2.3.1. Métodos de cuantificación de bacterias	12
2.3.2. Recuperación de muestras y Preservación de microorganismos	13
2.4. Pruebas Bioquímicas	14
2.4.1. Pruebas Bioquímicas.....	14
2.4.2. Tinción de Gram	14
2.4.4. Identificación de las bacterias de interés	15
3. Materiales y métodos	19

3.1.	Localización y descripción	19
3.2.	Fase de Campo.....	19
3.3.	Fase de Laboratorio	20
3.3.1.	Materiales utilizados	20
3.3.2.	Conteo Total de bacterias (CBT)	21
3.3.3.	Conteo tradicional por Unidades Formadoras de Colonia o CFU	23
3.3.4.	Pruebas bioquímicas	25
3.3.5.	Siembra para identificación de aerobios mesófilos	28
4.	Análisis estadístico.....	31
4.1.	Conteo total de bacterias en CFU/ml e IBC/ml	31
4.2.	Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas	32
4.3.	Curva de correlación entre Conteo Bacteriano Individual IBC/ml y Unidades Formadoras de Colonia CFU/ml	32
5.	Resultados esperados y discusión	34
5.1.	Conteo total de bacterias en CFU/ml e IBC/ml	34
5.2.	Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas	38
5.3.	Curva de correlación entre Conteo Bacteriano Individual IBC/ml y Unidades Formadoras de Colonia CFU/ml	40
6.	Conclusiones y recomendaciones	44

6.1. Conclusiones	44
6.2. Recomendaciones	46
7. Bibliografía	48
8. Anexos	53

INDICE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de dispersión para valores atípicos totales de razón microbiológica (CFU/ml vs. IBC/ml).....	35
Figura 2. Gráfica de dispersión: Eliminación de valores atípicos totales (log CFU/ml vs. log IBC/ml)	37
Figura 3. Curva de correlación entre los métodos estudiados (CFU/ml vs. IBC/ml)	41
Figura 4. Curva de correlación entre los métodos estudiados por distribución normal (log CFU/ml vs. log IBC/ml)	42

INDICE TABLAS

Tabla 1. Requisitos de la Leche Cruda Bovina	5
Tabla 2. Disolventes generales para la preparación de diluciones en análisis microbiológicos	9
Tabla 3. Tiempos para la preparación de suspensiones	10
Tabla 4. Locación de Centros de acopio (3 regiones)	19
Tabla 5. Materiales y Equipos utilizados en Fase de Laboratorio	21
Tabla 6. Pruebas Bioquímicas para microorganismos patógenos de interés higiénico.....	39

INDICE ANEXOS

Anexo 1. Ordeño para colecta de leche cruda en un centro de acopio.....	53
Anexo 2. Toma de muestra de leche cruda en caneca.....	53
Anexo 3. Toma de muestra de leche cruda en frascos plásticos de 50ml esterilizados membretados	53
Anexo 4. Instrumento FOSS BactoScanTM FC+ del LCL.....	54
Anexo 5. Autoclave Tuttnauer para esterilización de material del LCL.....	54
Anexo 6. Incubación de muestras leche en Petrifilm 3M	55
Anexo 7. Materiales utilizados en el proceso de Conteo tradicional de bacterias	55
Anexo 8. Tubos de ensayo con 9ml de agua peptonada tamponada estéril	56
Anexo 9. Micropipeta y puntas estériles para toma de muestras de leche y diluciones.....	56
Anexo 10. Agitador vortex para agitación de muestras de leche y diluciones.....	56
Anexo 11. Dispensor para muestras en Petrifilm 3M	56
Anexo 12. Láminas Petrifilm 3M para aerobios mesófilos.....	57
Anexo 13. Petrifilm 3M con los resultados de las diluciones realizadas por muestra	57
Anexo 14. Etiquetado de láminas Petrifilm 3M para incubación	57
Anexo 15. Toma de muestra de leche cruda bovina para dilución	57
Anexo 16. Colocación de 1ml de muestra diluida de manera perpendicular en la lámina de Petrifilm 3M membretada	58
Anexo 17. Dispersión con ayuda del dispensor 3M sobre la película superior del Petrifilm 3M de la muestra	58

Anexo 18. Proceso de dilución de muestras de leche cruda bovina de acuerdo a las CFU/ml correspondientes.....	58
Anexo 19. Agitación de diluciones con la ayuda del vortex	58
Anexo 20. Cepa ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus</i> para siembra bacteriana de Gram +	59
Anexo 21. Cepa ATCC 25923 <i>S. aureus</i> sembrada en medio TSA.....	59
Anexo 22. Cepa ATCC 8739 <i>Escherichia coli</i> para siembra bacteriana de Gram -	59
Anexo 23. Cepa ATCC 8739 <i>E. coli</i> sembrada en medio Agar estándar	59
Anexo 24. Bacteria divisada <i>Streptococcus uberis</i> mediante prueba microscópica.....	60
Anexo 25. Bacteria divisada <i>Streptococcus agalactiae</i> mediante prueba microscópica	60
Anexo 26. Bacteria divisada <i>Staphylococcus aureus</i> mediante prueba microscópica.....	60
Anexo 27. Realización de pruebas bioquímicas mediante Kit Microgen™ GN A y GN B para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	61
Anexo 28. Materiales del Kit Microgen™ GN A y GN B para realización de las pruebas bioquímicas	61
Anexo 29. Identificación de la bacteria mediante la toma de las muestras de leche analizadas	61
Anexo 30. Uso de la solución correspondiente para la identificación de la bacteria de interés	61
Anexo 31. Sistema Microgen GN-ID de 24 micropocillos en dos tiras para análisis de GN A+B para la identificación de las bacterias.....	62
Anexo 32. Colocación de los resultados obtenidos en el Sistema Microgen GN-ID en los formularios del Kit por reacción y resultado.....	63
Anexo 33. Tabla de colores del Sistema Microgen-ID para determinación de los resultados mediante las reacciones obtenidas.....	64

Anexo 34. Tabla de referencia de sustratos para descripción de las reacciones y resultados
obtenidos65

Anexo 35. Promedio de los resultados transformados a log10 del Método Tradicional (log
CFU/ml) y el Método Alternativo (log IBC/ml) para la obtención de la Curva de Correlación ...66

1. Introducción

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos INEC, en los datos obtenidos en el 2020, en el Ecuador se producen alrededor de 6.15 millones de litros de leche cruda, generando así una fuente de ingresos para un aproximado de 1.2 millones de personas en el país (Collaguazo, 2022).

La producción lechera representa el 4% del Producto Interno Bruto Agroalimentario del Ecuador, por lo que se puede constatar el impacto y potencial económico que esta representa, que según los datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería están alrededor de los 1400 millones de dólares al año (Ionita, 2022).

La calidad higiénica de los alimentos es un requisito primario a nivel mundial; ante ello la producción de leche ha sido considerada una de las prácticas con mayor importancia, por constituir una de las fuentes de alimento más grande entre los países desarrollados y en desarrollo debido a las propiedades nutritivas que posee para el consumo humano, así lo menciona Peña Rojas (2019). Aun así los riesgos a la que el producto está expuesto ponen en peligro su integridad física y composicional que comprometen la calidad higiénica y nutricional de la leche; ocasionada especialmente por diferentes razones de índole contaminante como la contaminación cruzada, por gérmenes patógenos y por sustancias químicas, lo que por consecuencia da paso a la proliferación considerable de microorganismos y a la alteración físico-química de los componentes de la misma, lo que repercute de forma negativa sobre el producto y por ende poniendo en conflicto la salud pública de cualquier país (De Los Reyes González et al., 2010).

En el Ecuador, la leche es uno de los productos de mayor consumo por lo que el aseguramiento de la calidad higiénica es esencial y para ello las entidades vinculadas a la Salud Pública en el

país han establecido normativas de seguridad alimentaria donde se determina el protocolo que debe seguirse en cada etapa del proceso de producción para ser considerado apta para el consumo (Bonifaz García & Requelme, 2011). Sin embargo, el interés de abarcar una cantidad de volumen específica por los intermediarios para realizar ventas en cantidades financieras mayores, deja de lado la calidad y se convierte en un problema que compromete la salud de los consumidores (Guevara-Freire et al., 2019).

El 39% de la leche cruda bovina está destinada al consumo directo en fresco, mientras que el 61% restante pasa a procesos industriales y de elaboración de los derivados lácteos, así lo menciona Pico Arguello (2015) en su investigación, lo que enfatiza la necesidad de mantener prácticas higiénicas de la leche y un control preventivo para posibles problemas de mastitis en los rebaños (Gaona & Olivera, 2011).

Como lo describe Contero et al. (2019), en su estudio de CBT por citometría de flujo, la calidad higiénica de la leche cruda bovina preserva toda actividad que verifique y demuestre la inocuidad del producto, por lo que con el paso de los años se han ido implementando métodos de conteo bacteriano que permitan determinar la cantidad de microorganismos presentes en la leche y conocer si es apta o no para el consumo de acuerdo con las normativas implementadas.

El método tradicional se basa en el conteo de la siembra en placa por Unidades Formadoras de Colonia (CFU/ml) de forma manual, no obstante, el avance de la tecnología ha reconocido el método alternativo por citometría de flujo para el Conteo Individual de Bacterias (IBC/ml) por su eficacia en el proceso, viabilidad, rapidez y confiabilidad en los resultados. Ambos métodos de importancia sanitaria en la búsqueda de la integridad de la leche, donde la composición estructural y funcional de la misma es crucial (Contero et al., 2019).

El análisis del conteo total de bacterias (CBT) es el parámetro utilizado para la vigilancia de la inocuidad de la leche cruda determinando la calidad higiénica como método de confiabilidad para el uso posterior en diferentes productos lácteos (Contero et al., 2019).

La calidad bacteriológica de la leche cruda de ganado bovino tiene como indicadores a las bacterias aerobias mesófilas, que son microorganismos patógenos que alteran la entereza del producto debido a la resistencia que presentan a los diferentes tratamientos aplicados y por lo que Comité del Codex Alimentarius para la Higiene de los alimentos ha establecido medidas como directrices para el control de STEC en específico a buenas prácticas de higiene y el uso de pruebas bioquímicas y moleculares como indicadoras higiénicas durante las etapas de procesamiento y posprocesamiento (FAO, 2022).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la calidad higiénica de muestras de leche cruda bovina de diferentes centros de acopio dentro de las regiones Sierra, Costa y Oriente Ecuatoriano, mediante el conteo total de bacterias en valores de CFU/ml e IBC/ml para el desarrollo de una curva de correlación entre dichos valores que permita determinar cuál de los métodos empleados es mayormente eficaz y la posterior identificación de microorganismos patógenos de interés, mediante el uso de pruebas bioquímicas específicas, para conocer el manejo higiénico y sanitario realizado por los sistemas de producción lechera en el Ecuador.

2. Fundamentación teórica

2.1. Normativas

2.1.1. Codex Alimentarius

Según el Codex Alimentarius (2011) para Leche y Productos Lácteos – Segunda Edición, la leche cruda bovina es aquella que no ha sido calentada a una temperatura mayor de 40°C sin tratamientos previos. De acuerdo al Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos (CAC/RCP 57-2004), en la producción primaria debe reducirse al mínimo la contaminación de la leche cruda, entendiéndose como contaminante cualquier agente biológico, químico o con materias extrañas que comprometa la inocuidad del producto; este código establece que la carga microbiana debe estar por valores bajos haciendo uso de las Buenas Prácticas de Producción de Leche en el proceso inicial con el fin de aplicar las medidas de control microbiológico de menor rigor (Alimentarius, 2011).

La manipulación, almacenamiento y transporte de la leche, el equipo de ordeño y almacenamiento, los procedimientos y equipos utilizados deben llevarse de forma en que evite cualquier tipo de contaminación y reduzca al mínimo el aumento de la carga microbiana (Alimentarius, 2011).

De acuerdo con el Codex (2011), los sistemas de control de la higiene para la leche cruda bovina inician con el control del tiempo y la temperatura como medidas fundamentales para el control microbiológico, puesto que la leche que está destinada a utilizarse en la fabricación de productos específicos deben mantener las condiciones higiénicas adecuadas, ya que se habla de la salud pública de los consumidores.

En la producción primaria de la leche, se debe tener en cuenta los cuidados de: higiene del medio, zona de concentración del ganado, zona de ordeño e instalaciones, salud animal, alimentación animal, control de plagas, medicamentos veterinarios, ordeño higiénico desde las condiciones del animal, el equipo de ordeño y los ordeñadores, equipo de recolección, almacenamiento y transporte, documentación y registros (Alimentarius, 2011), ya que todos estos procedimientos pueden influir significativamente en la calidad higiénica de la leche cruda.

2.1.2. Normas INEN

En concordancia al Documento abalado por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (2012) respecto a la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012 – Primera edición, para Leche Cruda Bovina, se debe cumplir con cinco requisitos, según se visualiza la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Requisitos de la Leche Cruda Bovina

Requisitos			
Específicos	Organolépticos	Color	Blanco o ligeramente amarillento
		Olor	Suave, lácteo
		Aspecto	Homogéneo
	Físico-Químicos	Presencia de conservantes	Negativo
	Microbiológicos (LM)	Aerobios mesófilos	$1,5 \times 10^6$ CFU/cm ³
Complementarios	Para almacenamiento, envasado y transporte de leche cruda	Se realizará de acuerdo con lo establecido en el Reglamento de leche y productos lácteos del Ministerio de Salud Pública.	

Fuente: (INEN, 2012)

Elaborado por: (La autora, 2023)

Los métodos de análisis para leche bovina han sido utilizados a lo largo del tiempo para determinar el conteo microbiano de las muestras de leche bovina cruda con el objetivo de conocer si los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites permisibles establecidos en la Norma Ecuatoriana NTE INEN 9:2012, donde se dictamina que la leche no es apta para consumo humano si excede el valor máximo permitido de 1.5×10^6 en recuento de microorganismos mesófilos REP CFU/cm³ por método tradicional (INEN, 2012).

2.1.3. Normas ISO

- Norma ISO 11133:2014

Los ensayos de rendimiento deben asegurar que los criterios de aceptación satisfagan los requisitos internos como lo especifica la norma ISO 11133:2014.

La aplicación de la norma ISO 11133 para medios de cultivos empleados por Laboratorios de Microbiología en Alimentos, tiene como objetivo en el campo de aplicación el garantizar la calidad de los medios de cultivo, especificar los requisitos para la preparación de medios de cultivo y describir métodos para ensayar el rendimiento de los medios de cultivo, para lo cual procede con el muestreo, el método analítico (preparación de medios de cultivo) y la interpretación de resultados (Comité Europeo de Normalización, 2014).

Todo medio de cultivo a utilizar deberá tener la documentación adecuada y deberá seguir los requisitos para la aceptación del mismo, entre ellos el reparto del medio de acuerdo a la cantidad conveniente y necesaria y la esterilización en autoclave a 121 ± 3 °C durante 45 minutos (Comité Europeo de Normalización, 2014).

Para lo mencionado anteriormente es necesario la verificación de la impresión del volumen tras la esterilización la cual no debe ser mayor al $\pm 2\%$, según lo establece la norma ISO 11133, esto con el fin de conocer el valor del volumen perdido después de la esterilización (Comité Europeo de Normalización, 2014).

Como lo establece esta norma, todo medio preparado en el laboratorio deberá mantenerse a una refrigeración de 5 ± 3 °C, para placas Petri el tiempo de uso será de 4 semanas y para tubos o botellas selladas de 3 a 6 meses (Comité Europeo de Normalización, 2014).

a. Métodos de ensayo del rendimiento según la ISO 11133

Para medios sólidos se inicia con la preparación de la cantidad adecuada del inóculo, se procede a inocular el medio de ensayo y en medio de referencia, y ambos se incuban en las condiciones de tiempo y temperatura correspondientes a la norma, se continúa con el conteo de las colonias que hayan crecido en ambos medios calculando el valor de relación de productividad y el valor del factor de selectividad según corresponda (Comité Europeo de Normalización, 2014).

Para medios líquidos selectivos y no selectivos, se inicia con el cultivo de trabajo en fase estacionaria, y se procede a inocular el caldo de ensayo con un microlitro de cultivo, una vez listo se procede a incubar en las condiciones de tiempo y de temperatura correspondientes a la norma y se evalúa visualmente la turbidez del medio de cultivo líquido; si el medio es turbio por naturaleza es necesario realizar un subcultivo en medio sólido y examinar la presencia de crecimiento (Comité Europeo de Normalización, 2014).

b. Medición de los rendimientos según la ISO 11133

De acuerdo con la norma ISO 11133 es necesario medir el rendimiento de todos los ensayos microbiológicos que se realice, por lo que el rendimiento de los medios sólidos se deberá calcular la Productividad y Selectividad del método de ensayo (3M Petrifilm) respecto al método de referencia (Medio TSA) (Comité Europeo de Normalización, 2014).

La productividad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%P_R = \frac{N_s}{N_o} \times 100$$

Donde:

Ns: Recuento total de colonias obtenido en el medio de cultivo de ensayo.

No: recuento total de colonias obtenido en el medio de cultivo de referencia.

Lo que indica que la productividad debe alcanzar el límite mínimo documentado de acuerdo con las especificaciones del producto y/o fichas.

Mientras que la Selectividad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$S_F = D_o - D_s$$

Donde:

Do: más alta de dilución que muestra crecimiento comparable sobre el medio a evaluar (medio de cultivo de ensayo).

Ds: más alta de dilución que muestra crecimiento de por lo menos 10 colonias sobre el medio de referencia.

Lo que determina que la selectividad se mide haciendo uso de la dilución mayor que se haya realizado del inóculo (Comité Europeo de Normalización, 2014).

- **Norma ISO 6887-1**

La norma NTE INEN-ISO 6887-1, establece aquellas reglas generales para la preparación de suspensiones iniciales y diluciones decimales para exámenes microbiológicos (Asociación Española de Normalización, 2017). Esta norma pretende mejorar la reproducibilidad de los preparados, por lo que el agua destilada es uno de sus principales disolventes debiendo cumplir la norma INEN 1105, que establece los criterios generales para la utilización del agua en análisis microbiológico; con dicho requisito cumplido, la norma ISO 6887-1 determina para uso general los disolventes mencionados en la Tabla 2:

Tabla 2. Disolventes generales para la preparación de diluciones en análisis microbiológicos

Disolvente	pH – T
Disolución de peptona al 0.1%	pH 7.0 ± 0.2 a 25 °C
Disolución salina de peptona	
Disolución tamponada de peptona	

Fuente: (Asociación Española de Normalización, 2017)
Elaborado por: (La autora, 2023)

La porción de ensayo y suspensión inicial debe tener una precisión de la medida, ya sea de masa o volumen que cumpla con el ± 5%. Una vez obtenida la suspensión o muestra inicial líquida o sólida, se procederá a realizar las diluciones decimales sucesivas

correspondientes, en las que, de acuerdo con los ensayos microbiológicos, son realizadas en tubos de ensayo donde se realizarán las diluciones; de la muestra inicial se tomará 1 ml, y será trasvasado al primer tubo de ensayo que contendrá 9 ml del diluyente correspondiente y seguirá el proceso de trasvasado hasta obtener la dilución requerida (Asociación Española de Normalización, 2017).

En este procedimiento se deberá tener en cuenta que cualquier pipeta utilizada no deberá exceder el máximo de 1 cm dentro de la suspensión inicial y para el trasvasado será necesario agitar con énfasis en un tiempo de 5 a 10 s cada una de las diluciones haciendo uso de un agitador magnético (vortex) (Asociación Española de Normalización, 2017). Todo este proceso de preparación debe mantener tiempos designados, como se expresa en la Tabla 3:

Tabla 3. Tiempos para la preparación de suspensiones

Proceso	Tiempo
Preparación de suspensión inicial y contacto del inóculo con el medio de cultivo.	≤ 45 min
Preparación de suspensión y preparación de las diluciones decimales.	30 min

Fuente: (Asociación Española de Normalización, 2017)
Elaborado por: (La autora, 2023)

2.2. Análisis de Trazabilidad

2.2.1. Trazabilidad metrológica

De acuerdo a la Corporación para Sistemas de Mantenimiento, Calidad y Laboratorio en el Taller de Verificación y Validación/Evaluación de la Incertidumbre de Ensayos Microbiológicos y Criterios de Acreditación, las cepas con las que se desarrollan los

trabajos de investigación en el laboratorio microbiológico son las cepas de referencia, reserva y trabajo (Torres & Intriago, 2022).

Con respecto a la cepa de referencia, es aquella cepa que ha sido obtenida directamente de una colección nacional o internacional reconocida, la cual debe ser verificada y archivada con sus documentos correspondientes además de seguir siempre las indicaciones del proveedor. Una cepa de trabajo no puede ser subcultivada en sustitución de una cepa de reserva, todo aquello que sea de la cepa de referencia solo puede ser usado como cepa de trabajo. Únicamente la cepa de referencia es aquella que da paso a la obtención de cepas de reserva (Torres & Intriago, 2022).

Como se menciona en la norma ISO 11133, la conservación y mantenimiento de los microorganismos es prioridad en cuanto a la cepa de referencia se refiere, ya que una vez obtenida se debe aislar en un medio sólido adecuado (por lo general medio TSA), y con ello verificar la pureza y la morfología de la cepa en este caso utilizando las pruebas bioquímicas correspondientes; una vez que se cumpla este proceso se prepara una suspensión en medio adecuado y se procede a realizar crioconservación, obteniendo así un lote de reserva de cepa (Comité Europeo de Normalización, 2014).

Para hacer uso de este lote de reserva existen dos opciones, la primera inicia con el descongelamiento del lote donde se procede a realizar un cultivo de trabajo en el que se verifica la pureza y la morfología y una vez cumplido el proceso se prepara el inóculo para el ensayo, mientras que la segunda opción procede igual que la opción uno, sin embargo, después de cumplirse la verificación de pureza y morfología se procede a inocular en un medio adecuado o se puede congelar en una suspensión del cultivo de reserva, se continúa con el aislamiento obteniendo así el cultivo de trabajo, nuevamente

se verifica la pureza y si cumple con el criterio se prepara el inóculo para el ensayo (Torres & Intriago, 2022).

2.3. Análisis Microbiológico

2.3.1. Métodos de cuantificación de bacterias

a. Método tradicional

El método tradicional o técnica de siembra en placa Petrifilm 3M para el Recuento de Aerobios Mesófilos AC, es un medio de cultivo con Agar estándar como agente gelificante y con el indicador de tinte color rojo que permite el recuento de las colonias, estas placas permiten el conteo de la población total existente de bacterias aerobias mesófilas del producto de interés (Food Safety, 2017).

b. Método alternativo

El método alternativo o técnica de siembra mediante el uso del Equipo BactoScan con tecnología probada de FOSS como método rápido, permite el recuento bacteriano individual de leche cruda por bacteria viva y no viva (Contero et al., 2019).

c. Escala McFarland

De acuerdo al estudio de Fiallos (2017), la escala McFarland son patrones de turbidez estandarizados realizados generalmente en tubos de ensayo, donde la suspensión se obtiene mediante la mezcla de dos soluciones específicas:

Cloruro de Bario (BaCl_2) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4); de acuerdo con las cantidades de reactivo mezcladas se obtienen los diferentes estándares de la escala cada uno con diferente turbidez, y son comparadas visualmente con las suspensiones bacterianas de interés para la determinación del número de células respecto a cada estándar.

2.3.2. Recuperación de muestras y Preservación de microorganismos

a. Recuperación de muestras ATCC

Recuperar una muestra de bacteria ATCC liofilizada, se obtiene realizando una siembra en agar BHI y se incuba a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h dos veces. Es necesario sembrar en agar selectivo después del tiempo recorrido para cada microorganismo (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002).

Mientras que, para recuperar un subcultivo, es necesario que el microorganismo se siembre en su medio adecuado y se conserve a una temperatura de $4\text{ }^\circ\text{C}$. En este caso, la utilización de este subcultivo tiene un tiempo máximo de un mes, ya que cada transferencia para resembrado puede generar mutaciones que produzcan la pérdida de las características del microorganismo (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002).

b. Preservación de microorganismos

La preservación de microorganismos o también conocida como crioconservación es un proceso de almacenamiento de un microorganismo vivo a una temperatura baja que tiene el fin de preservar la funcionabilidad celular

del cultivo y su viabilidad, para ser utilizada en próximos ensayos (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002).

2.4. Pruebas Bioquímicas

2.4.1. Pruebas Bioquímicas

La caracterización microbiológica de los microorganismos patógenos en muestras de leche cruda bovina es realizada mediante el uso de pruebas bioquímicas específicas para la determinación de bacterias gram positivas y gram negativas existentes, con el fin de diferenciar las especies bacterianas presentes mediante sus características metabólicas o su sensibilidad a sustancias específicas (Fernández et al., 2010). De acuerdo con Romero et al. (2018), los estudios bioquímicos son complementarios a los bacteriológicos, debido a que todos los microorganismos realizan procesos metabólicos generando reacciones fisiológicas y químicas visibles cuando los inóculos son sembrados en medios de cultivos enriquecidos con indicadores de pH o que permiten la observación del cambio de color del medio cuando el microorganismo cumple su función.

Toda reacción bioquímica es específica para cada microorganismo de acuerdo a sus características metabólicas y por la actividad definida de algunas enzimas (Romero et al., 2018).

2.4.2. Tinción de Gram

Es una tinción diferencial utilizada para las pruebas microbiológicas dónde se hace uso de dos colorantes distintos para clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias gram positivas y gram negativas (López-Jácome et al., 2014). De acuerdo con lo

mencionado por López et al. (2014) el principio principal de la Tinción Gram está basado en las características determinantes de las bacterias, dónde la pared celular es la que confiere las propiedades únicas de cada microorganismo; las bacterias gram positivas poseen pared celular constituida por peptidoglicano, pero no tienen membrana celular externa, mientras que las gram negativas poseen pared celular con peptidoglicano y a su vez membrana celular externa, lo que produce las características tintoriales.

2.4.3. Kit Microgen™ GN-ID

El Kit de Microgen™ para GN A y GN B, es un sistema de prueba de sustratos bioquímicos estandarizados que permiten la identificación de bacterias gram positivas y gram negativas (Cortez-Pazmiño, 2012).

El Kit cuenta con 12 pocillos para GN A y 12 pocillos para GN B; cada pocillo con un sustrato deshidratado dónde si son metabolizados por el microorganismo se podrá observar el cambio de color después de la adición de los reactivos específicos (Cortez-Pazmiño, 2012).

2.4.4. Identificación de las bacterias de interés

Con ello claro, mediante la técnica de Tinción de Gram y pruebas microscópicas, descritas en el presente trabajo, se reconocieron los microorganismos patógenos (aerobios mesófilos) formadores de colonias, encontrados en las muestras analizadas, entre ellas: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

a. ***Escherichia coli***

Bacteria anaerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae*, encontrada en bovinos con principal reservorio en el intestino del ganado, por lo que su transmisión se ve incrementada en la toma de muestras de leche cruda. Es identificada mediante pruebas bioquímicas como: Indol (+), citrato, rojo de metilo, TSI, LIA, MIO, urea (Rodríguez-Angeles, 2002).

E. coli es causante de la enfermedad Colibacilosis en becerros, destacando síndromes asociados como: colisepticemia, enterotoxemia y colibacilosis entérica (López-Álvarez, 2005). La colisepticemia es frecuente en becerros que han sido privados de calostro, con presencia de fiebre, debilidad, elevación de la frecuencia cardíaca y respiratoria; cuando la infección es rápida el becerro muere por bacterimia, cuando es de prolongada afección produce daños en articulaciones y meninges causando poliartritis y meningitis por septicemia. La enterotoxemia ocasiona la muerte prematura en el becerro producto de la toxemia. La colibacilosis entérica es la principal causa del síndrome diarreico, la muerte depende de los síntomas fisiológicos presentados (López-Álvarez, 2005).

Escherichia coli, productora de la toxina Shiga, suele presentar resistencia a antibióticos, lo que origina enfermedades en el bovino que son transmitidas por contaminación cruzada de la leche al ser consumida por el humano, causando infecciones en los consumidores con cuadros de diarreas y colitis hemorrágica (Mercado, 2006).

b. Staphylococcus aureus

Bacteria anaerobia facultativa perteneciente a las bacterias gram positivas, productora de mastitis en ganado bovino, posee la capacidad de coagular el plasma, resiste el calor, la desecación y tiene facilidad de crecimiento en medios con altas cantidades de NaCl (Cervantes-García et al., 2014).

Según Cervantes-García et al. (2014), entre las pruebas bioquímicas para identificación están: catalasa, fermentación de glucosa, coagulasa y fermentación de manitol.

S. aureus es transmitida de una vaca infectada a una no infectada en su mayoría por la práctica de ordeño mal ejecutada donde las pezoneras, manos no sanitizadas de los ordeñadores y materiales contaminados utilizados para de forma grupal son la principal causa de la transmisión de la bacteria; incluso se ha observado que insectos voladores dípteros como las moscas se han visto implicadas en la transferencia del patógeno de un bovino a otro (Mellenberger & Kirk, 2016).

Staphylococcus aureus es causante de mastitis en bovinos por su producción de sustancias tóxicas que puede llegar a provocar la muerte del animal. Si la glándula mamaria es alcanzada por esta bacteria se produce la infección ocasionando microabscesos en las ubres lo que puede restringir la producción de leche (Mellenberger & Kirk, 2016).

En el ser humano, *S. aureus* ocasiona todo tipo de complicaciones en el momento en que la persona tiene contacto con el animal infectado, con equipos contaminados e incluso cuando ha tenido contacto con otra persona que sea

portadora del patógeno; así se destacan enfermedades que van desde infecciones menores de la piel hasta infecciones consideradas serias e invasivas como bacteriemia, problemas del tracto respiratorio y urinario, osteomielitis, mastitis, entre otras complicaciones graves de salud (Cervantes-García et al., 2014).

c. Streptococcus uberis

Coco grampositivo, catalasa negativa y esculina positiva caracterizado por ésta última, es uno de los patógenos más importantes implicado en la mastitis bovina (Echeverria, 2021).

Como lo menciona Fessia et al. (2018) en su estudio de identificación de *Streptococcus uberis*, entre las pruebas bioquímicas para este microorganismo están: hidrólisis de hipurato, hidrólisis de esculina, crecimiento en cloruro de sodio 6.5% y en bilis.

d. Streptococcus agalactiae

Estreptococo β -hemolítico, coco grampositivo y anaerobio facultativo, considerado uno de los agentes etiológicos productor de mastitis clínica y subclínica en ganado bovino (Díaz et al., 2019). Forma colonias lisas y rodeadas por un halo de β -hemólisis, aunque existen cepas no hemolíticas (Fraile De la Rosa & López De Cueto, 2003).

Como Fraile et al. (2003) lo determina en su estudio, *S. agalactiae* es identificada mediante pruebas bioquímicas entre ellas: catalasa, oxidasa, tinción de Gram, California Mastitis Test (CMT) e hidrólisis de hipurato.

3. Materiales y métodos

3.1. Localización y descripción

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Calidad de Leche de la Universidad Politécnica Salesiana con Extensión en Cayambe, donde se receptaron las muestras de los distintos centros de acopio y empresas de las tres regiones del Ecuador, como se mencionan en la Tabla 4:

Tabla 4. Locación de Centros de acopio (3 regiones)

Región	Provincia	Lugar	Centro de acopio/Empresa
Sierra	Pichincha	Cariacu	Ñukanchic Allpa y El Cóndor
		Cangahua	Centro de Acopio “Larcachaca”
		Cayambe	Centro de Acopio “El Ordeño”
		Ayora	La Concepción
		Puembo	La Holandesa
Costa	Santo Domingo	Alluriquín	Selva Alegre
Oriente	Napo	Chaco	Sardinas

Elaborado por: (La autora, 2023)

3.2. Fase de Campo

Las muestras de leche bovina cruda para el presente estudio fueron recolectadas por el Estudiante de la Carrera de Agropecuaria Cristian Arias, quién colectó las muestras de los diferentes centros de acopio alrededor del país (Ver Anexos 1 y 2).

Cada muestra fue tomada en un frasco plástico estéril de 50 ml de tapa roja (para identificación) (Ver Anexo 3) con número de muestra y datos del proveedor, de acuerdo al protocolo LCL 001 del Laboratorio de Calidad de Leche (LCL) de la Universidad Politécnica Salesiana, con un total de 200 muestras entre Sierra, Costa y Oriente para el recuento e identificación bioquímica de bacterias.

3.3. Fase de Laboratorio

Las muestras fueron receptadas semanalmente de cada uno de los centros de acopio anteriormente mencionados, en el Laboratorio de Calidad de Leche (LCL), se clasificaron y colocaron en gradillas metálicas color azul con numeración romana con un total de 60 unidades; se estimó un total de 25 a 50 muestras de cada lote para el posterior análisis bacteriano CBT, debido a que la totalidad de muestras receptadas no cumplían con el criterio de aceptación otorgado para el análisis microbiológico donde se especifica que únicamente se hará uso de las muestras que analizadas tengan valores de 30 a 3000 CBT's.

Las variables consideradas en el presente estudio se determinaron como:

- Variable dependiente: Número total de bacterias;
- Variable independiente: Métodos (CFU/ml e IBC/ml).

3.3.1. Materiales utilizados

En la Tabla 5 se describen los materiales y equipos utilizados para la realización de cada etapa del proceso en la Fase de Laboratorio:

Tabla 5. Materiales y Equipos utilizados en Fase de Laboratorio

Etapa	Equipos, Reactivos y Medios de cultivo
CBT (IBC/ml)	Agua del portador
	Agua destilada estéril
	Bromuro de etidio
Esterilización	Autoclave
Incubación	Incubadora
Conteo tradicional (CFU/ml)	Gradilla de agua peptonada tamponada
	Micropipeta
	Puntas de micropipeta
	Frasco de descarte
	Muestra de leche
	3M Petrifilm AC
	Rotulador
	Papel continuo
	Dispensor
Siembra ATCC (Grupo A/ Gram +)	Kit KWIK-STIK™ Plus
Siembra ATCC (Grupo B/ Gram -)	Agua Peptonada Tamponada
	0.5 McFarland
	Infusión BHI (Brain Heart Infusion)
Tinción de Gram	Microscopio
	Cristal-Violeta
	Lugol
	Alcohol-Acetona
	Safranina
Pruebas Bioquímicas	Kit Microgen™

Fuente: (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002)

Elaborado por: (La autora, 2023)

3.3.2. Conteo Total de bacterias (CBT)

El análisis bacteriano CBT determina la calidad higiénica de la leche, de acuerdo al Método ISO 16297, IDF 161 para Cuantificación de bacterias por métodos alternativos fluoro-opto-electrónicos.

El proceso de cuantificación automatizada basado en las tecnologías probadas de FOSS como método rápido para el recuento bacteriano de leche cruda se realiza

mediante el Equipo BactoScanTM FC+ (Ver Anexo 4), que mide la calidad higiénica de la misma (Bohórquez, 2015).

El Equipo BactoScan funciona con 3 principales soluciones: Agua del portador, Agua destilada estéril (Conductividad: $< 5 \mu\text{s}/\text{cm}$, Turbidez: 0.5) y el reactivo Bromuro de etidio. El Equipo BactoScan está unido a un sistema de alta calidad “Conveyor” con una banda corrediza que consta con un lector de código de barras donde se colocan 10 muestras por rack (Gradilla para lotes de muestras de control) para analizar, éstas son leídas y comienza el proceso de análisis (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002).

El proceso inició con una homogenización en un tiempo de 9 s, procede a filtración, lavado por medio de un sistema de flujo, continúa con una segunda homogenización, se da paso por un micro-filtro y comienza la lectura del contador electrónico mediante un láser invisible fluorescente complementado con el bromuro de etidio y la enzima 50, el láser traspasa el ARN de las bacterias en una longitud que está entre los 700-800 nm (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002).

El conteo total bacteriano abarca el análisis de conteo de ARN de las bacterias presentes, tanto vivo como muerto especificado en valores por millón donde se estima el Conteo Individual de bacterias o IBC y el Conteo Total de Bacterias o CBT (Torres & Intriago, 2022).

Para el presente trabajo se tomaron las muestras analizadas por el Equipo BactoScan con valores menores a 3000 IBC.

3.3.3. Cuento tradicional por Unidades Formadoras de Colonia o CFU

Para verificar el conteo total de bacterias, se utilizó paulatinamente el método tradicional que se realiza manualmente mediante el conteo de colonias formadas por las bacterias.

El proceso inició con la preparación del medio de cultivo agua peptonada tamponada, utilizado como diluyente y para el crecimiento de microorganismos. Se disolvió la cantidad apropiada del medio sólido en polvo directamente proporcional a la cantidad de ml de agua destilada necesarios, de acuerdo con lo establecido por la ficha técnica del proveedor (25.5 g por litro) (Torres & Intriago, 2022).

Una vez que comenzó la ebullición (100 °C) se esperó un minuto y se procedió a retirar la solución del calentador, continuando con la dispensación de 9 ml (solvente) en tubos de ensayo para la posterior esterilización (Torres & Intriago, 2022).

La esterilización se realizó en una autoclave a 121 °C durante 45 min (Ver Anexo 5). Listo los medios se dejan a temperatura ambiente para ser utilizados en las respectivas diluciones (Torres & Intriago, 2022).

Para el proceso de siembra se procedió a utilizar una cámara de flujo laminar, levantado el vidrio protector se limpió la zona de trabajo completamente con alcohol y/o cloro, se encendió el mechero correspondiente y el flujo de aire integrado (Velocidad: Nivel 1), se introdujeron todos los materiales necesarios (Ver Anexo 7): micropipeta y puntas de micropipeta previamente estériles (Ver

Anexo 9), frasco para puntas de descarte, gradilla con tubos de ensayo con agua peptonada (Ver Anexo 8), muestras de leche seleccionadas, 3M Petrifilm AC (Placas de medio liofilizado para aerobios totales) (Ver Anexo 12), rotulador, vortex (Ver Anexo 10), papel continuo y dispersor (Ver Anexo 11), y se colocó nuevamente el vidrio protector a la altura necesaria con la que se fácil la movilidad (Torres & Intriago, 2022).

Con todos los materiales listos, se inició la siembra utilizando la regla de dilución donde se menciona que por cada 9 ml de solvente (Agua peptonada tamponada) se añadió 1 ml de soluto (Muestra de leche cruda bovina) con la ayuda de una pipeta con punta estéril y se realizaron las diluciones correspondientes a cada muestra con su respectiva agitación (Ver Anexos 15, 16 y 17). Una vez obtenidas las diluciones necesarias, se tomó 1 ml de la solución, se levantó la lámina protectora de la placa Petrifilm con el etiquetado correspondiente (Ver Anexo 14), se dispensó al centro de la misma en forma perpendicular (Ver Anexo 18), se bajó la lámina y se colocó un dispersor sobre la película superior para distribuir la muestra por el área circular (Ver Anexo 19) (Torres & Intriago, 2022).

Para terminar con el proceso, se dejó reposar un minuto para que se solidifique y se inició el periodo de incubación.

La incubación de placas Petrifilm para aerobios totales fue de $48 \text{ h} \pm 3$ a $31.7 \text{ }^\circ\text{C}$ (Ver Anexo 6), pasado las 48 h se continuó con el conteo de las colonias (Ver Anexo 13) (Food Safety, 2017).

Con el conteo total de las colonias formadas se conoció el valor dependiendo de cada dilución y se realizó un estimado de los datos en relación a los obtenidos por el Equipo BactoScan.

3.3.4. Pruebas bioquímicas

a. Tinción de Gram y Pruebas microscópicas

Para el análisis de las pruebas bioquímicas, se aislaron las cepas mediante la técnica de estriado simple en medio de cultivo TSA en placa Petri y se realizó Tinción Gram como prueba de detección de bacterias, donde las bacterias grampositivas se tiñeron de color azul-violeta y las bacterias gramnegativas de color rojizo (López-Jácome et al., 2014).

Para este proceso se inició con la toma de la muestra en un portaobjetos y se colocó una gota de reactivo Cristal-Violeta, seguidamente se colocó una gota de reactivo Lugol y se continuó con la inserción de una gota de Alcohol-Acetona, para finalizar se colocó una gota de safranina; cada colocación se dejó actuar por 1 min para continuar con la siguiente respectivamente (López-Jácome et al., 2014).

Una vez aisladas, con la prueba de Tinción Gram, se observó mediante microscopía y se identificó las bacterias que se encontraron en las muestras analizadas.

b. Escala McFarland

Para la identificación de las suspensiones bacterianas realizadas, se elaboró una muestra de 0.5 escala McFarland haciendo uso de las siguientes fórmulas:

- Solutos: (10%)

$BaCl_2(1\%) \rightarrow 10ml$ Agua destilada + 1g $BaCl_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$10\% \times V_1 = 1\% \times 10ml$$

$$V_1 = \frac{10ml}{10}$$

$$V_1 = 1 ml \text{ soluto}$$

- Solvente: (97%)

$H_2SO_4(1\%) \rightarrow 250ml$ Agua destilada

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$97\% \times V_1 = 1\% \times 250ml$$

$$V_1 = \frac{250ml}{97}$$

$$V_1 = 2.6 ml H_2SO_4 \text{ concentrado}$$

Una vez obtenido los valores correspondientes para formar la suspensión de $BaCl_2$ y H_2SO_4 , se continuó con el procedimiento de la Escala McFarland de interés.

$$0.5 MKF = 1.5 \times 10^8 = 150.000.000 \frac{CFU}{ml}$$

Para la elaboración de la suspensión de Escala McFarland es necesario realizar las diluciones oportunas para obtener un número de CFU/ml contable; por lo cual se realizó una dilución de 10^{-2} logrando así un valor de:

$$1.5 \times 10^{-7} a 1.5 \times 10^{-2} = 150 \frac{CFU}{ml}$$

Con este valor obtenido, se procedió a realizar la suspensión:

0.5 MKF → Suspensión al 1%

$$H_2SO_4 (1\%) = 9.95g$$

$$BaCl_2 (1\%) = 0.05g$$

Y con la suspensión lograda, para cada dilución se utilizó 9 ml de la solución, y sabiendo que el límite mínimo de crecimiento establecido para CFU/ml es de 30 CFU/ml, se siguió la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$150 \frac{CFU}{ml} \times V_1 = 30 \frac{CFU}{ml} \times 9ml$$

$$V_1 = 2 \text{ ml de } 1.5 \times 10^{-2}$$

Finalizando con la obtención de la suspensión 0.5 MKF para la comparación con la suspensión bacteriana de interés.

c. ***Crioconservación***

El proceso de crioconservación se inició con la preparación de una solución 50/50 de glicerol y agua destilada y se procedió a esterilización; esta fue realizada en una autoclave a 121 °C por 45 min. Se esterilizaron también 30 tubos Eppendorf vacíos y 10 tubos de ensayo con 10 ml de caldo infusión cerebro-corazón (medio BHI) (Torres & Intriago, 2022).

Se tomó el inóculo de la muestra ATCC de interés y se sembró en los tubos con el caldo BHI, a continuación, se incubó a 37 °C entre 18 a 24 h. Una vez listo, se realizó la verificación por escala McFarland de acuerdo al grado de turbidez necesaria (0.5 MKF) y se distribuyó en cada tubo Eppendorf 0.5 ml de caldo con

cultivo y 0.5 ml de agente crioprotector (solución de glicerol) (Torres & Intriago, 2022).

Todos los tubos se pasaron por el vortex y se sellaron con Parafilm y su correspondiente etiqueta.

Para finalizar el proceso se realizó tinción Gram de cada muestra de ATCC, y una vez observada el inóculo se preservó en congelación a -20 °C.

d. Kit Microgen™

Las tiras GN A y GN B presentan funciones diferentes; las tiras GN A identificaron a las bacterias fermentadoras de glucosa, oxidasa negativos, nitrato positivas, las tiras GN A y GN B en conjunto, permitieron la identificación de bacilos gram negativos no exigentes (oxidasa positivo o negativo) y las tiras GN B solo pudieron ser utilizadas conjuntamente con las GN A y no individualmente debido a que así se podrían identificar las bacterias correspondientes a bacilos gram negativos no-exigentes y todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Cortez-Pazmiño, 2012).

3.3.5. Siembra para identificación de aerobios mesófilos

Siembra de ATCC (Grupo A y B)

a. Grupo A (Gram +)

ATCC 25923: Staphylococcus aureus

Para la siembra del ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* se realizó de acuerdo con las instrucciones de uso del Kit KWIK-STIK™ Plus de la marca Microbiologics *Staphylococcus aureus* subsp. aureus derived from ATCC® 25923™*(MSSA

Live Culture Positive Control) (Ver Anexo 20) (Microbiologics, 2021). Ésta se inició con colocar el kit a temperatura ambiente antes de abrirlo, una vez que se adaptó a la temperatura, se quitó la unidad de KWIK-STIK y la etiqueta fue colocada como registro de la siembra sin desarmar el dispositivo durante la hidratación, se continuó agrietando la ampolla de la parte superior para liberar el líquido hidratante y manteniéndolo verticalmente se golpeó suavemente sobre una superficie dura hasta que el líquido llegue a la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo de la cepa, luego de ello se apretó la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta homogenizar, inmediatamente se saturó el hisopo abundantemente con el material hidratado y se transfirió al medio TSA, se inoculó la placa del cultivo principal realizando una siembra simple y con la ayuda de una asa esterilizada se finalizó estriando para facilitar el aislamiento de la colonia. Posterior al proceso realizado, se incubó la placa a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo (Ver Anexo 21) (Microbiologics, 2021).

b. Grupo B (Gram -)

ATCC 8739: Escherichia coli

Para la siembra del ATCC 8739 *Escherichia coli* (Ver Anexo 22), se inició con la preparación del medio estándar (Método Estándar APHA, Agar) utilizado para el recuento microbiano en alimentos, se realizó Escala McFarland de 0.5 como referencia de turbidez, 1 tubo de ensayo con Infusión BHI, 6 tubos de ensayo con agua peptonada tamponada y 8 cajas Petri estériles con el medio estándar previamente preparado, se procedió en la cámara de flujo laminar a tomar parte del

inóculo con un asa de siembra estéril y se sembró por inmersión en el tubo con Infusión BHI, se mezcló durante un minuto y se observó que alcance una turbidez similar a la 0.5 McFarland, una vez obtenido se continuó con las diluciones correspondientes hasta alcanzar el valor de CFU/ml deseado y se sembró en las cajas Petri (Ver Anexo 23) (Allaert-Vandevenne & Escolà-Ribes, 2002).

4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de este trabajo de titulación, se realizó los cálculos correspondientes mediante el formato de Software Excel de FOSS para la obtención de los valores resultados del Análisis Bacteriológico de las muestras analizadas.

4.1. Conteo total de bacterias en CFU/ml e IBC/ml

En el conteo total de bacterias se fue siguiendo un procedimiento que contempla una serie de pasos que permiten la obtención de los valores resultantes del análisis de las muestras tanto para el método alternativo (BactoScan) como el método tradicional (Petrifilm 3M):

a. Adición de resultados

Valores obtenidos para ambos métodos (CFU/ml e IBC/ml) por dos repeticiones por método.

b. Cambio de unidades

Los valores de CFU/ml e IBC/ml se multiplica por mil

c. Transformación de resultados

Los valores son transformados a valores de log₁₀.

d. Promedio de resultados

Se promedian las repeticiones para ambos métodos con base de log₁₀

e. Desviación estándar (Solo para el método alternativo)

Cálculo de la medida de dispersión de los valores respecto a la media (promedio de resultados).

f. Diferencia absoluta (Solo para el método tradicional)

Devuelve el valor absoluto de un número.

g. *Repetibilidad de valores atípicos*

Para el método alternativo, los valores atípicos son estimados si sobrepasan el 0.09 según la norma ISO 16297; mientras que para el método tradicional son estimados si sobrepasan el 0.25 según la norma ISO 4833-1:2013.

4.2. Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas

La identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas no necesitó de un análisis estadístico, únicamente fueron determinadas mediante el análisis microbiológico con las pruebas bioquímicas correspondientes.

4.3. Curva de correlación entre Conteo Bacteriano Individual IBC/ml y Unidades Formadoras de Colonia CFU/ml

Con el Software Excel de FOSS la Curva de correlación fue resultado de los valores de dispersión logarítmica obtenidos en el conteo total bacteriano de los métodos analizados, donde el cálculo del Modelo de Regresión Lineal compone matemáticamente la variable dependiente (Número total de bacterias) y la variable independiente (Métodos: CFU/ml e IBC/ml) como una ecuación lineal. La identificación de los valores atípicos permitió la eliminación de los mismos, lo que derivó en la curva de correlación con los valores absolutos comparando la eficacia de los métodos ante el conteo bacteriano.

Este proceso contó con los 7 pasos del conteo total de bacterias e incluyó los siguientes:

- a. *Dispersión de datos con valores atípicos de la razón microbiológica*
- b. *Desviación estándar residual*

Se estima el error típico de los valores en y(CFU/ml) para cada x(IBC/ml).

c. *Modelo de regresión lineal*

Se obtiene la pendiente de la línea de regresión lineal, correspondiente a la tasa de cambio a lo largo de la línea. Se calcula el punto de intersección entre ejes.

d. *Identificación de valores atípicos de la razón microbiológica*

Se calcula los valores de CFU estimado, haciendo uso del modelo de regresión lineal. Se revisa los valores absolutos.

e. *Eliminación de valores atípicos de la razón microbiológica*

Se elimina aquellos valores que después de la revisión de los valores absolutos no entran dentro de los establecidos.

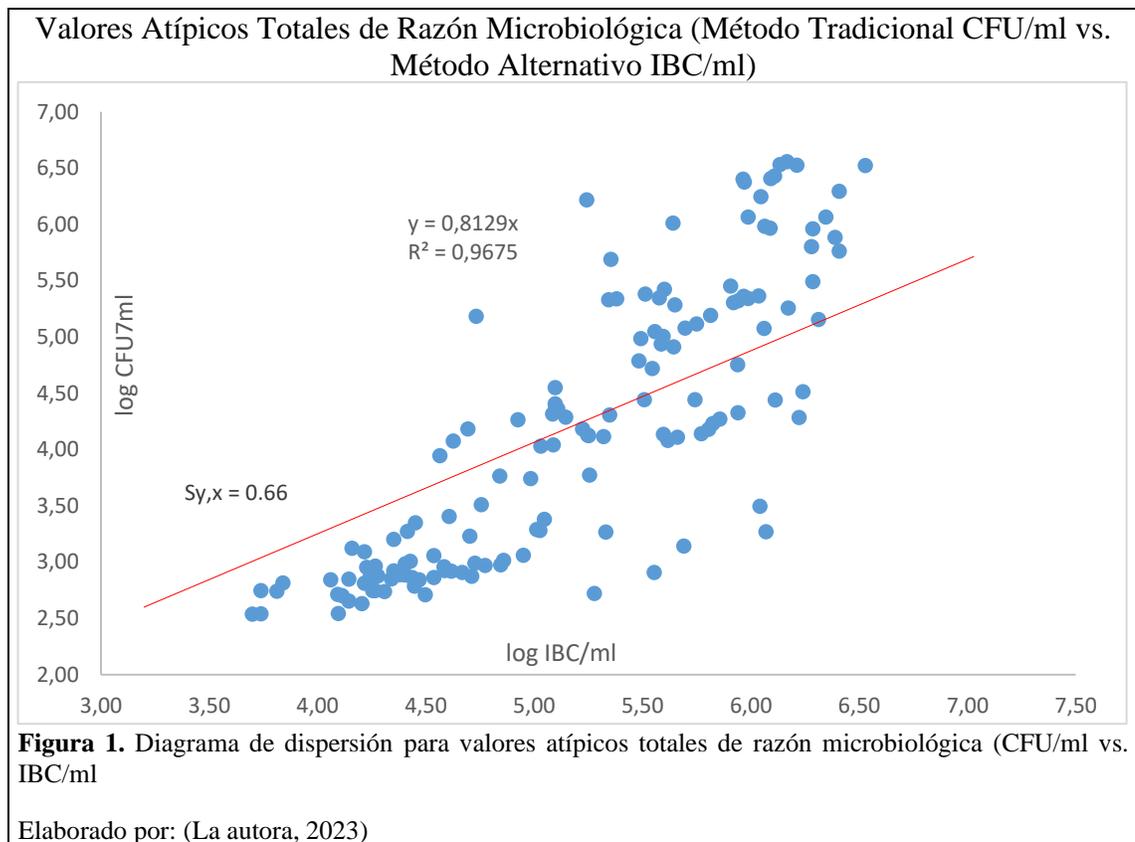
f. *Dispersión de datos con valores atípicos eliminados*

5. Resultados esperados y discusión

5.1. Conteo total de bacterias en CFU/ml e IBC/ml

Para el conteo total de bacterias en CFU/ml por el método tradicional e IBC/ml por el método alternativo, se identificó los valores atípicos de repetibilidad, determinados de acuerdo a la relación lineal en el rango de conteo relevante; si $S_{y,x} > 0.4$ hay una falta de linealidad.

La detección y descarte de los valores atípicos, se realiza si existe una relación microbiológica, es decir si algún valor está fuera de lo estimado. Un valor atípico se define como un par de datos que normalmente aparece de forma aleatoria en menos del 1% de todos los datos. Para estos pares de datos totales, la desviación absoluta difiere más del $2.58 \times S_{y,x}$, donde $S_{y,x}$ es la desviación típica residual de los puntos estimados por regresión.



Se calculó el $2.58 \times S_{y,x}$ y la diferencia absoluta entre el método de referencia (método tradicional) y el método alternativo para todos los datos. Se descartó todos los pares de datos donde la diferencia era mayor a $2.58 \times S_{y,x}$ como se observa en la Figura 1.

El límite de aceptabilidad de la desviación de la precisión $S_{y,x}$ es de máximo 0.40 unidades logarítmicas, por lo que el valor de desviación residual calculado por Error Típico XY debe ser menor a los 0.40 unidades logarítmicas, que en el presente estudio se obtuvo el valor resultante de 0.66, sobrepasando el límite aceptado. Dicho valor es multiplicado con la desviación típica residual (2.58), obteniendo un resultado de modelo de regresión lineal de 1.7154.

Con la transformación logarítmica de los valores obtenidos en el Equipo BactoScan (log IBC/ml) y los valores obtenidos en la muestra manual 3M Petrifilm (log CFU/ml), se obtuvo los valores atípicos de repetibilidad (Ver Figura 1), diferenciando así aquellos que se encuentran fuera de los límites establecidos de acuerdo a la Norma ISO 16297 y la Norma ISO 4833-1:2013 respectivamente.

Los límites de repetibilidad para el método alternativo (BactoScan) donde la técnica está basada en el conteo fluoro-opto-electrónico o citometría de flujo, se dictaminan en la Norma ISO 16297:2020/IDF 161:2020 que establece:

“Para el recuento total bacteriano en leche cruda, los límites aceptables para la desviación estándar de repetibilidad son de 0.09 unidades logarítmicas para el nivel de contaminación $2 \cdot 10^4$ UFC/ml” (ISO, 2020).

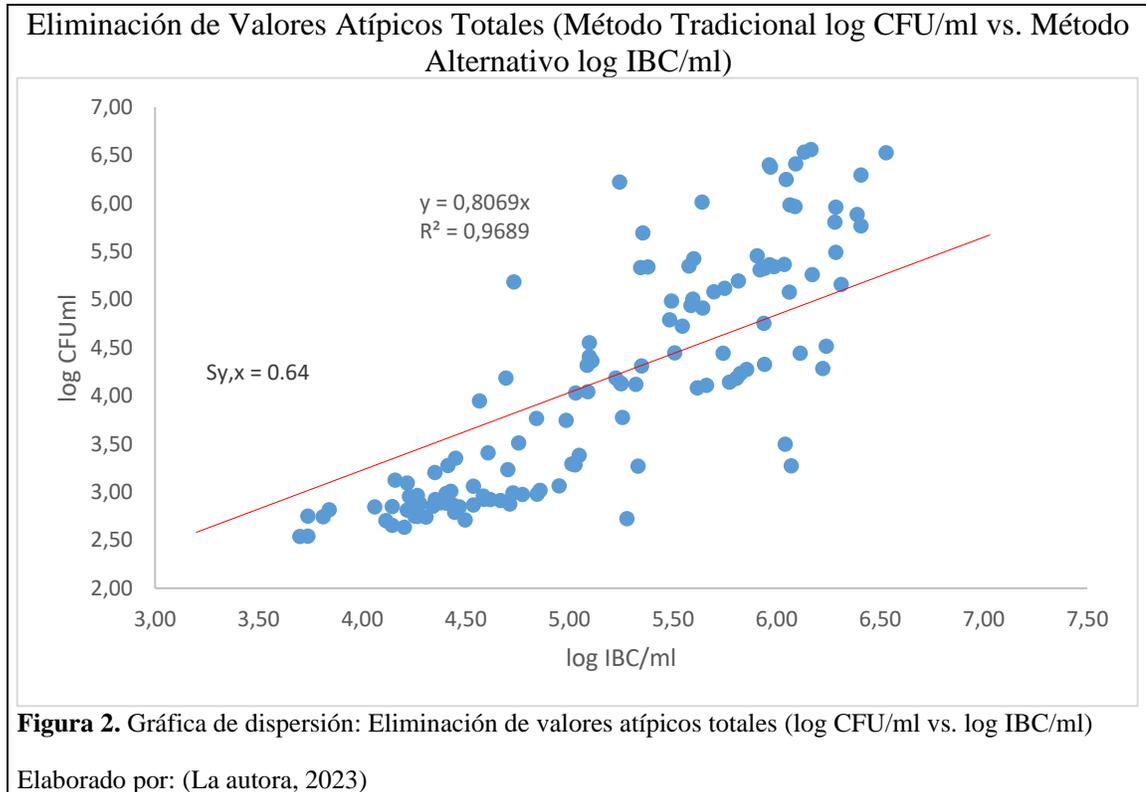
Mientras que los límites de repetibilidad para el método tradicional (3M Petrifilm), se dictaminan en la Norma ISO 4833-1:2013 que establece:

“La diferencia absoluta entre el primer y segundo resultado no debe ser superior a $t 0.25 \log_{10} N$ ” (ISO, 2013).

Por lo que es necesario la eliminación de los valores atípicos para la obtención de datos que cumplan con la linealidad.

Mediante la eliminación de los valores atípicos del total de pares de datos (Ver Figuras 2 y 35), se identificó que los resultados obtenidos no cumplen con la relación lineal esperada en el intervalo de recuento total bacteriano ya que la desviación típica residual $S_{y,x}$ con un valor de 0.64 excede el valor de referencia 0.40 establecido como máximo en IDF 100B e IDF 161A:1995, lo que determina que el conteo bacteriano, de los 200 datos

analizados por las tres regiones, mediante el método tradicional y el método alternativo presentan diferencias significativas.



De acuerdo al formato de Software de Excel de FOSS, se tomaron los valores de IBC/ μ l y se transformaron a IBC/ml (multiplicando el valor por 1000), mientras que los valores de CFU/ml se calcularon mediante la fórmula:

$$N = \frac{\sum C}{1.1 \times d}$$

Donde:

C: Repeticiones realizadas

N: Número de microorganismos por mililitro.

d: Valor de la primera dilución realizada.

Estableciendo la sumatoria de las repeticiones 1 y la sumatoria de las repeticiones 2 (R1 y R2) que fueron divididas para el valor estándar de 1.1 para diluciones multiplicadas por el valor de la primera dilución realizada para cada muestras, puesto que a cada muestra se estableció un número de dos diluciones (valores más cercanos a los obtenidos en el cálculo de las IBC conseguidos por el método alternativo) con dos repeticiones por cada dilución de acuerdo al criterio de repetibilidad de los datos.

Una vez realizado el cálculo se optó por la eliminación de los valores menores a 10 y mayores a 300 pertenecientes a CFU/ml para mantener la linealidad de los datos.

5.2. Identificación de bacterias por pruebas bioquímicas

a. Tinción de Gram y Pruebas microscópicas

En el estudio realizado se presentó la identificación de las bacterias encontradas en las muestras de leche analizadas aisladas, mediante la Prueba de Tinción de Gram, obteniendo como resultado el descubrimiento de cuatro bacterias características encontradas en leche cruda bovina: *Escherichia coli* (Gram -) y *Staphylococcus aureus* (Gram +) (Ver Anexo 26) siendo las de predominancia en la totalidad de las muestras, además de *Streptococcus uberis* (Ver Anexo 24) y *Streptococcus agalactiae* (Ver Anexo 25), las de menor presencia. Por esta razón, *E. coli* y *S. aureus* fueron procesadas mediante las pruebas bioquímicas respectivas para la verificación de su veracidad (Ver Anexo 27, 28, 29 y 30).

b. **Kit Microgen™ GN-ID**

En el presente estudio, para las pruebas bioquímicas, se inició con una prueba de Oxidasa y Catalasa para el reconocimiento de las bacterias de interés, para continuar con el Kit Microgen™, con el que se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6. Pruebas Bioquímicas para microorganismos patógenos de interés higiénico

Bacteria	Código	Pruebas																								
		Oxidasa	Catalasa	Lisina	Ornitina	H ₂ S	Glucosa	Manitol	Xilosa	ONPG	Indol	Ureasa	VP	Citrato	TDA	Gelatina	Malonato	Inositol	Sorbitol	Ramnosa	Sucrosa	Lactosa	Arabinosa	Adonitol	Rafinosa	Salicina
<i>Escherichia coli</i>	315452	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	315444	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+

Elaborado por: (La autora, 2023)

De acuerdo con la Tabla 6 en conjunto con la Tabla de Referencia (Ver Anexos 33 y 34) de los sustratos establecida para la lectura del Kit Microgen™ con la colorimetría, se verificó que las pruebas bioquímicas realizadas afirman la presencia de ambas bacterias de interés: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Ver Anexo 31 y 32).

Las pruebas de lisina, ornitina, glucosa, manitol, xilosa, β-galactosidasa, citrato, malonato, inositol, ramnosa, sucrosa, lactosa, arabinosa, salicina y arginina, para ambas bacterias *E. coli* y *S. aureus* resultaron positivas.

Las pruebas de indol, ureasa, triptófano desaminasa, gelatina y adonitol, para ambas bacterias *E. coli* y *S. aureus* resultaron negativas.

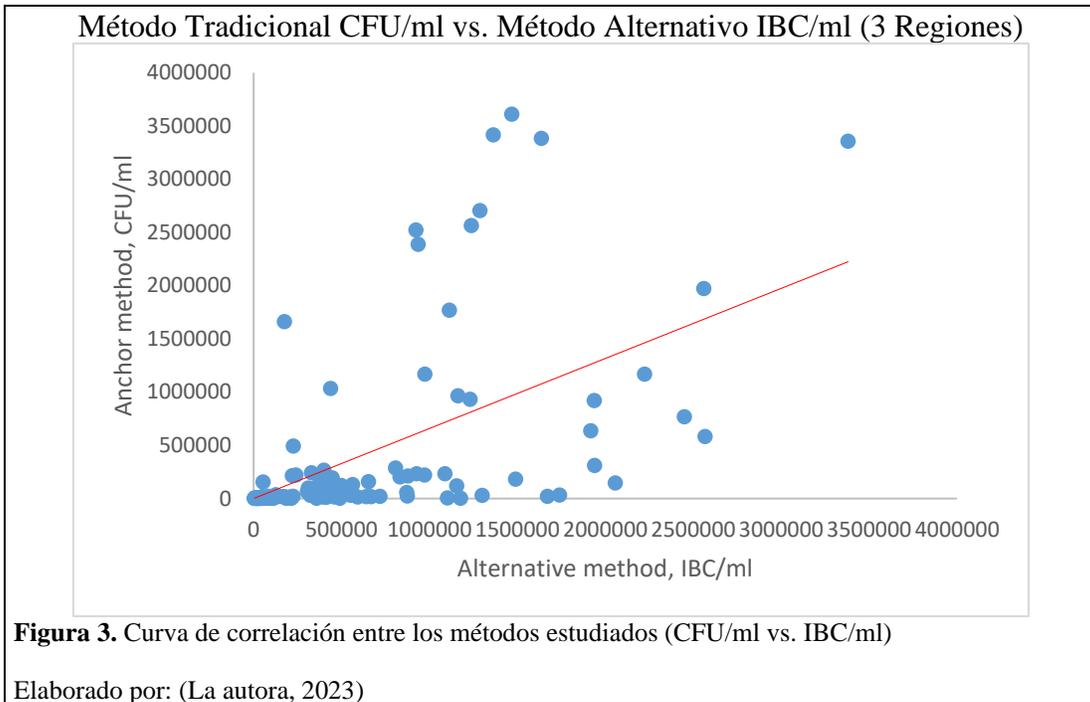
Para pruebas como el sulfuro de hidrógeno, sorbitol y rafinosa, *E. coli* tiene resultados positivos, mientras que para *S. aureus* reflejó resultados negativos.

Para pruebas como VP tuvo un resultado negativo para *E. coli* y positivo para *S. aureus*.

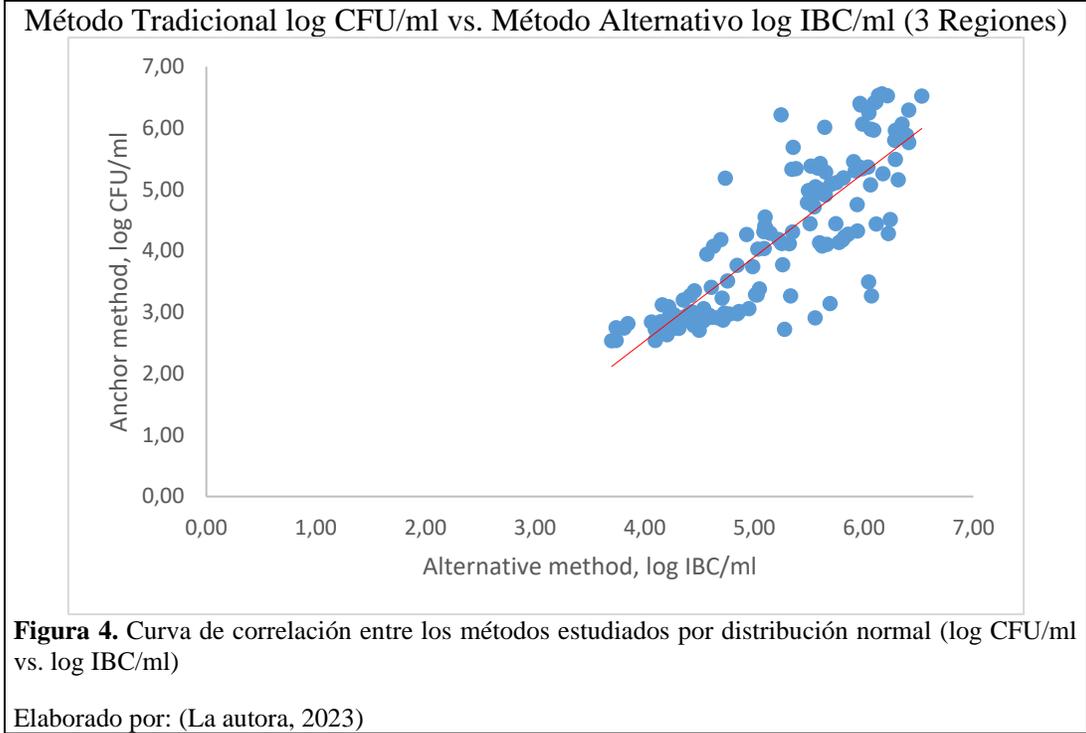
Con las pruebas anteriormente analizadas y de acuerdo con el reporte de Boyacá de Aguilera et al. (2014), en Colombia, se confirmó la presencia de las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en las muestras de leche cruda bovina debido a que no cumple con un correcto protocolo de manejo de leches crudas.

5.3. Curva de correlación entre Conteo Bacteriano Individual IBC/ml y Unidades Formadoras de Colonia CFU/ml

Para el conteo de CFU/ml vs IBC/ml, en la Figura 3 se observó la curva de correlación entre el método tradicional CFU/ml y el método alternativo IBC/ml con un crecimiento exponencial de los microorganismos por las muestras analizadas de las 3 Regiones ecuatorianas (Sierra, Costa y Oriente).



Por lo que se buscó una aproximación de la distribución normal de los valores, y para ello fue necesario convertir los valores brutos mediante una transformación logarítmica (log 10), como se visualiza en la Figura 4.



Al convertir los datos en bruto a escala logarítmica de base 10, se puede observar que la correlación entre los valores obtenidos en el método tradicional y el método alternativo desarrollan una linealidad, lo que determina que ambos métodos permiten conocer el crecimiento de los microorganismos, lo que conduce a una distribución guiada hacia la derecha (crecimiento exponencial).

La ecuación de correlación que permite la obtención de la curva, para la comparación entre los métodos estudiados es:

$$\frac{CFU}{ml} \text{ vs. } \frac{IBC}{ml} = \log_{10}[\text{Promedio}(M_1 + M_2) MT] \text{ vs. } \log_{10}[\text{Promedio}(M_1 + M_2) MA]$$

Donde:

M₁: Medición 1

M₂: Medición 2

MT: Método Tradicional (CFU/ml) eje y

MA: Método Alternativo (IBC/ml) eje x

Las mediciones 1 y 2 (Ver Anexo 35) son los valores de las 2 repeticiones tomadas para establecer la validación de los procedimientos, mediante el análisis de repetibilidad medida en términos de la dispersión de los resultados. Las mediciones tanto para el método tradicional como el método alternativo fueron tomadas en unidades por microlitro y transformadas a unidades por mililitro (es decir, multiplicadas por 1000).

Con la relación de los valores en el eje x (Método alternativo) y eje y (Método tradicional) se obtuvo la gráfica de la curva de correlación (Ver Figura 4).

Como lo determina Bohórquez (2015) en su trabajo “Estudio estadístico de los datos obtenidos en el análisis microbiológico de leche cruda entre unidades IBC y CFU para obtener el cálculo del factor de conversión”, la ecuación de correlación entre los métodos es de importancia debido a que permite obtener resultados evidenciados como comparables entre sí, demostrando similitud entre ellos, sin embargo, insiste en que el método alternativo por citometría de flujo brinda resultados con mayor rapidez por lo que sustituirlo por el método tradicional resulta efectivo, además de garantizar la calidad higiénica microbiológica de la leche (Bohórquez, 2015).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, para el conteo total de bacterias entre ambos métodos se observó diferencias significativas atribuidas a las muestras utilizadas donde la calidad higiénica se vio comprometida; para la Costa y Oriente ecuatoriano los valores obtenidos en el análisis resultaron más altos de lo esperado otorgados a la contaminación bacteriana presente en las muestras de ambas regiones, mientras que para la Sierra del país aunque mantiene valores más próximos a la relación lineal establecida, de igual forma mantiene la misma condición. Los valores arrojados por el método alternativo mediante el uso del Equipo BactoScan para recuento individual de bacterias (IBC/ml) en relación a los valores obtenidos por el método tradicional utilizando siembra en placa Petrifilm 3M para aerobios mesófilos (CFU/ml) muestran disimilitudes conforme a la situación descrita y la dispersión presente entre los datos.

Observando que los valores resultantes por cada una de las regiones analizadas fueron mayores al valor máximo establecido de 0.40 unidades logarítmicas para la desviación típica residual Sy, x , se determinó que la sensibilidad y especificidad es discordante entre los dos métodos, lo que dio resultados disímiles para el conteo total de bacterias.

Mediante las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de los microorganismos patógenos de interés, se pudo visualizar 4 especies de bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus agalactiae*, sin embargo, se resaltó que las bacterias causantes de contaminación de la

leche cruda fueron *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; *E. coli* por posible contaminación fecal en la toma de muestra y uso de equipos no sanitizados, y también *S. aureus* por ser un agente patógeno inductor de mastitis clínica.

En el desarrollo de la curva de correlación entre los valores de Conteo Bacteriano Individual IBC/ml y Unidades Formadoras de Colonia CFU/ml de las muestras de leche cruda bovina, se pudo determinar que tanto el método tradicional como el método alternativo permiten el Conteo Total de Bacterias y mantienen una linealidad a pesar de la dispersión observada en el análisis de las muestras; y evidenciado en su comparación, los resultados por citometría de flujo (IBC/ml) son más rápidos y de menor costo, no obstante, los resultados por recuento en placa (CFU/ml) permiten mediante un análisis de las muestras con pruebas bioquímicas determinar los patógenos presentes en la leche cruda que ocasionan su contaminación.

6.2. Recomendaciones

Las recomendaciones que se pueden establecer después de realizar el presente trabajo, están orientadas en primera instancia al Análisis de Trazabilidad de cada una de las etapas que intervienen en el proceso de recolección de muestras de leche bovina cruda, es decir, la calidad higiénica de las muestras de leche inicia desde que son recolectadas en finca, trasladado al centro de acopio hasta la distribución de las muestras al laboratorio para el análisis microbiológico respectivo, puesto que en cualquier parte del proceso puede prestarse a que una actividad de alguna de las etapas requeridas sea la causante de la contaminación del producto, por lo que se recomienda proceder con la normativa vigente específica que asegure la inocuidad del producto y la implementación rigurosa de un buen plan de manejo integrado de ganado vacuno y buenas prácticas pecuarias.

Las correctas prácticas de ordeño en el sector pecuario, de cada uno de los centros de acopio, es fundamental al momento de concretar la toma de muestras para análisis microbiológicos, ya que garantiza que la leche tenga una cantidad bacteriana baja que al ser analizada cumpla con los parámetros específicos de los valores límites de contaminación microbiológica y por lo tanto se verifique la inocuidad en todos los procedimientos incluidos en la trazabilidad del producto.

Es importante señalar que la calidad higiénica de la leche cruda bovina contempla el nivel de higiene y la ausencia de cualquier sustancia, patógeno o característica organoléptica que ponga en riesgo las cualidades asépticas de la misma, además del tiempo de análisis que debe mantenerse dentro de las primeras horas de recepción de las muestras tomadas ya que pueden constituir una razón de importancia en el crecimiento

bacteriano, por lo que es necesario mantener un óptimo estado sanitario del ganado bovino como el adecuado manejo de los hatos lecheros por parte de los ganaderos y el rápido análisis de las muestras.

7. Bibliografía

- Aguilera-Becerra, A. M., Urbano-Cáceres, E. X., & Jaimes-Bernal, C. P. (2014). *Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria*. 11, 83–93.
- Alimentarius, C. (2011). Leche y Productos Lácteos. In *CODEX Alimentarius* (Issue Lima 27).
- Allaert-Vandevenne, C., & Escolà-Ribes, M. (2002). *Métodos de Análisis Microbiológicos de los Alimentos* (Ediciones Díaz). Ediciones Díaz de Santos.
- Asociación Española de Normalización. (2017). *ISO 6887-1:2017 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales*.
- Bohórquez, P. (2015). *Estudio estadístico de los datos obtenidos en el análisis microbiológico de leche cruda entre unidades IBC y UFC para obtener el cálculo del factor de conversión* [Tesis]. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Bonifaz García, N., & Requelme, N. D. J. (2011). Good milking practices and the hygienic quality of milk in Ecuador. *La Granja*, 14(2), 45–57.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica Med Lab*, 61(1), 28–40. <https://doi.org/10.1108/eb020168>
- Collaguazo, M. (2022). *Efectos de la aplicación del Acuerdo Comercial Multipartes con la Unión Europea sobre el sector lácteo en el Ecuador* [Maestría Profesional en Relaciones Internacionales]. Universidad Andina Simón Bolívar.

- Comité Europeo de Normalización. (2014). ISO 11133:2014 Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua - Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo. In AENOR (Ed.), *UNE-EN ISO 11133 - Norma Española*. AENOR. www.aenor.es
- Contero, R., Aquino, E. L., Simbaña, P. E., Gallardo, C., & Bueno, R. (2019). ESTUDIO EN EL ECUADOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTEO TOTAL DE BACTERIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LECHE CRUDA BOVINA. *La Granja*, 9(21), 97–104. <https://doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.08>
- Cortez-Pazmiño, M. E. (2012). *Microgen TM GN-ID Identificación Instrucciones de Uso MID-64 A Panel MID-65 B Panel*.
- De Los Reyes González, G., Molina Sánchez, B., & Coca Vázquez, R. (2010). *Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz 2010 CALIDAD DE LA LECHE CRUDA*.
- Díaz, D., Remón, D., Riverón, Y., Ribot, A., Ledesma, A., & Martínez, A. (2019). Identificación de *Streptococcus agalactiae* en leche de bovinos afectados por mastitis en el occidente de Cuba. *Revista de Salud Animal*, 41(3), 2224–4700. <http://opn.to/a/jEibC>
- Echeverría, J. M. (2021). *Streptococcus uberis*, la mastitis clínica frustrante. *Vaca Pinta*, 24, 92–98. www.proquideza.com
- FAO. (2022). *Control measures for Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) associated with meat and dairy products - Meeting report*. Microbiological Risk Assessment Series No. 39. <https://doi.org/10.4060/cc2402en>

- Fernández, A., García, C., Juan, S., & Ramos, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.; Vol. 37). SEIMC.
- Fessia, A. S., Dieser, S. A., & Odierno, L. M. (2018). Identificación de *Streptococcus uberis* aislados de muestras de leche bovina. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus*, 1(1), 82–87.
- Fiallos, J. (2017). *Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de Escherichia coli* [Trabajo de titulación]. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Food Safety. (2017). *3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios AC*. www.3M.com/
- Fraile De la Rosa, M., & López De Cueto, M. (2003). *Streptococcus agalactiae*. *Control Calidad SEIMC*.
- Gaona, Y., & Olivera, M. (2011). Caracterización de un proceso operativo de análisis de calidad higiénica y sanitaria de la leche bovina cruda, con equipos automatizados BactoScan FC 50 y CombiFoss FT + 200, en un laboratorio de calidad de leche - Characterization of the operative proc. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(4), 1–11.
- Guevara-Freire, D., Montero-Recalde, M., Rodríguez, A., Valle, L., & Avilés-Esquivel, D. (2019). Quality of milk collected in small farms of Cotopaxi, Ecuador. *Rev Inv Vet Perú*, 30(1), 247–255. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15679>
- INEN. (2012). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012 Leche Cruda. Requisitos. *Leche Cruda. Requisitos.*, 1–7. http://181.112.149.204/buzon/normas/nte_inen_9-5.pdf
- Ionita, E. (2022, June 13). *La producción de leche en Ecuador*.

ISO. (2013). *ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/Webwww.iso.orghttps://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/>

ISO. (2020). *ISO 16297:2020 Milk. Bacterial count. Protocol for the evaluation of alternative methods.*

López-Álvarez, M. S. J. (2005). *ESCHERICHIA COLI: MECANISMOS DE PATOGENICIDAD* [Tesis]. Universidad Nacional Autónoma de México.

López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidad*, 3(1), 10–18.
www.medigraphic.org.mx

Mellenberger, R., & Kirk, J. (2016). *VACAS LECHERAS INFECTADAS CON STAPHILOCOCCUS AUREUS* [Tesis, Michigan State University, University of California].
www.produccion-animal.com.ar

Mercado, E. (2006). *CONTROL DE ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRAGICO (EHEC) EN EL GANADO BOVINO* (66; 3).

Microbiologics. (2021). INSTRUCCIONES DE USO PREVISTO KWIK-STIK PLUS. *INSTRUCCIONES DE USO. KWIK-STIK PLUS.* www.microbiologics.com

Peña Rojas, F. E. (2019). *UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS “DISEÑO DE UN MANUAL DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA PARA CENTROS DE ACOPIO DE LECHE CRUDA” TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO (A)*. Universidad Técnica del Norte.

Pico Arguello, M. A. (2015). *La producción de leche y su incidencia en los ingresos económicos de las familias productoras pertenecientes al consorcio de lácteos de Tungurahua CONLAC-T, en el Cantón Quero en el año 2015*. Universidad Tecnológica Indoamérica.

Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464–475.
<https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>

Romero, E., Melendres, K. P., Ángel, L., & Polo, T. (2018). *Pruebas Bioquímicas*.

Torres, M., & Intriago, D. (2022). *Taller Folleto Laboratorio*.

8. Anexos

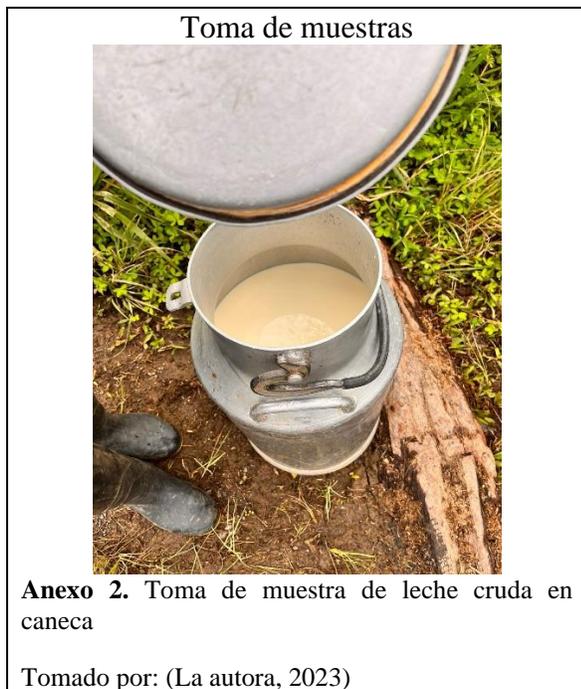
Fotografías

Etapas:

- Sitios de colecta



- Toma de muestras



- CBT (IBC/ml)



- Esterilización



Tubos de ensayo con agua peptonada tamponada



Anexo 8. Tubos de ensayo con 9ml de agua peptonada tamponada estéril

Tomado por: (La autora, 2023)

Micropipeta/Puntas micropipeta estériles



Anexo 9. Micropipeta y puntas estériles para toma de muestras de leche y diluciones

Tomado por: (La autora, 2023)

Vortex



Anexo 10. Agitador vortex para agitación de muestras de leche y diluciones

Tomado por: (La autora, 2023)

Dispensor 3M



Anexo 11. Dispensor para muestras en Petrifilm 3M

Tomado por: (La autora, 2023)

Petrifilm 3M



Anexo 12. Láminas Petrifilm 3M para aerobios mesófilos

Tomado por: (La autora, 2023)

Petrifilm 3M Diluciones Muestras



Anexo 13. Petrifilm 3M con los resultados de las diluciones realizadas por muestra

Tomado por: (La autora, 2023)

- **Conteo tradicional (CFU/ml): Siembra**

Etiquetado de Petrifilm 3M (Código, N° dilución máx., Iniciales responsable)



Anexo 14. Etiquetado de láminas Petrifilm 3M para incubación

Tomado por: (La autora, 2023)

Toma de muestra para dilución



Anexo 15. Toma de muestra de leche cruda bovina para dilución

Tomado por: (La autora, 2023)

Dilución de muestra



Anexo 18. Proceso de dilución de muestras de leche cruda bovina de acuerdo a las CFU/ml correspondientes

Tomado por: (La autora, 2023)

Agitación de diluciones



Anexo 19. Agitación de diluciones con la ayuda del vortex

Tomado por: (La autora, 2023)

Colocación de muestra perpendicularmente en Petrifilm 3M



Anexo 16. Colocación de 1ml de muestra diluida de manera perpendicular en la lámina de Petrifilm 3M membretada

Tomado por: (La autora, 2023)

Dispersión sobre película superior de la muestra



Anexo 17. Dispersión con ayuda del dispersor 3M sobre la película superior del Petrifilm 3M de la muestra

Tomado por: (La autora, 2023)

- Siembra ATCC (Grupo A/ Gram +)

Cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*



Anexo 20. Cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* para siembra bacteriana de Gram +

Tomado por: (La autora, 2023)

Cepa ATCC 25923 *S. aureus*



Anexo 21. Cepa ATCC 25923 *S. aureus* sembrada en medio TSA

Tomado por: (La autora, 2023)

- Siembra ATCC (Grupo B/ Gram -)

Cepa ATCC 8739 *Escherichia coli*



Anexo 22. Cepa ATCC 8739 *Escherichia coli* para siembra bacteriana de Gram -

Tomado por: (La autora, 2023)

Cepa ATCC 8739 *Escherichia coli* 0.5 MKF

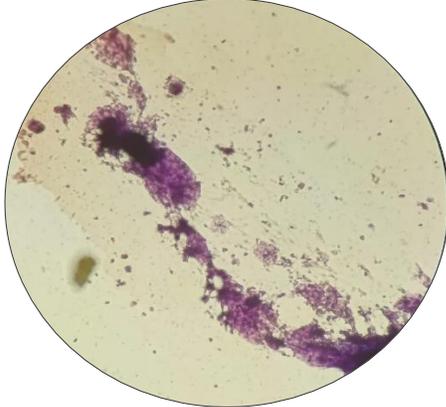


Anexo 23. Cepa ATCC 8739 *E. coli* sembrada en medio Agar estándar

Tomado por: (La autora, 2023)

- Tinción de Gram y Pruebas Microscópicas

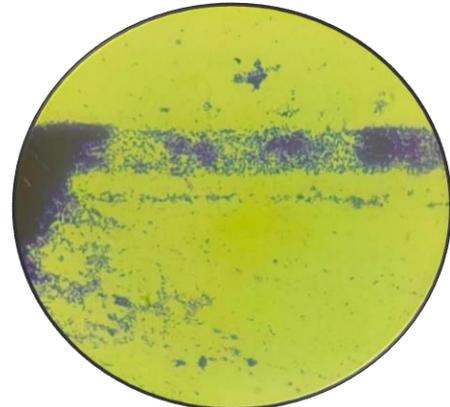
Microscopio: *Streptococcus uberis*



Anexo 24. Bacteria divisada *Streptococcus uberis* mediante prueba microscópica

Tomado por: (La autora, 2023)

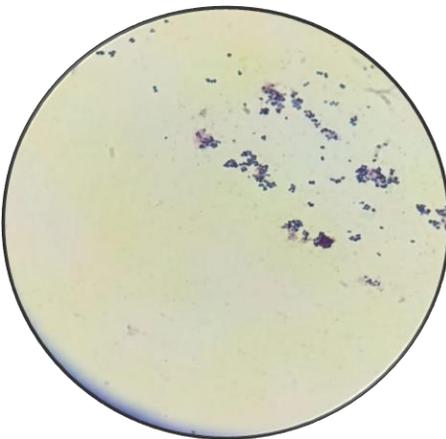
Microscopio: *Streptococcus agalactiae*



Anexo 25. Bacteria divisada *Streptococcus agalactiae* mediante prueba microscópica

Tomado por: (La autora, 2023)

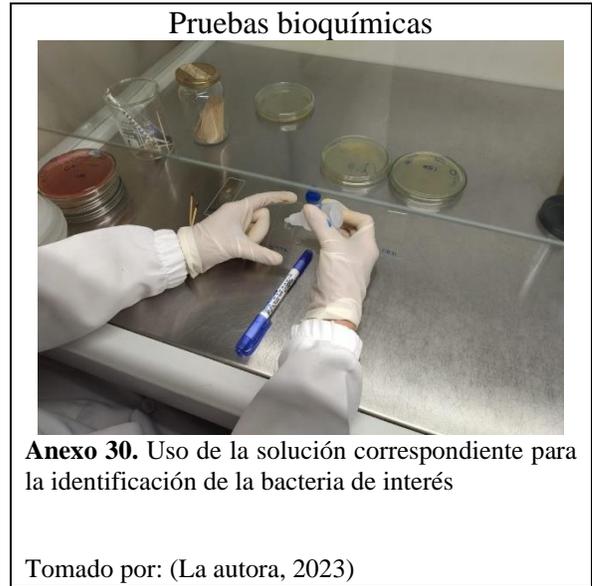
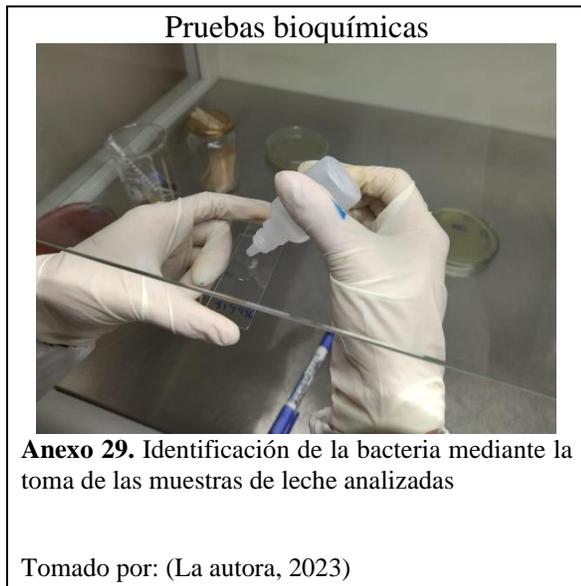
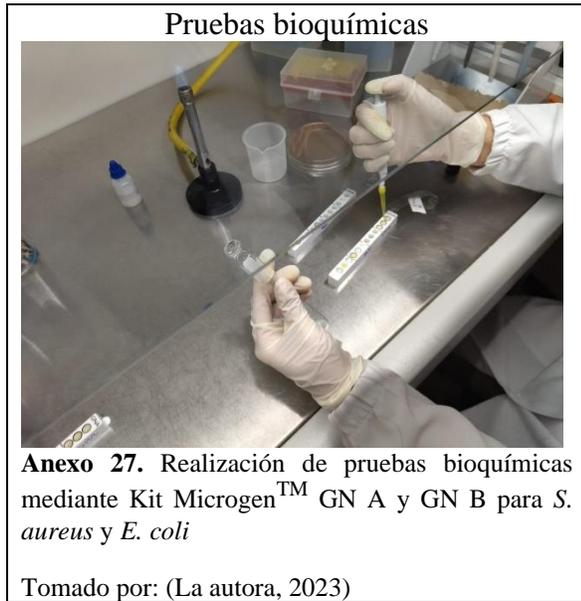
Microscopio: *Staphylococcus aureus*



Anexo 26. Bacteria divisada *Staphylococcus aureus* mediante prueba microscópica

Tomado por: (La autora, 2023)

- Pruebas Bioquímicas



Pruebas bioquímicas



Anexo 31. Sistema Microgen GN-ID de 24 micropocillos en dos tiras para análisis de GN A+B para la identificación de las bacterias

Tomado por: (La autora, 2023)

Tabla de colores: Microgen™ GN A y B ID

Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs

Microgen™ GN A ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7	
Reaction	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate	
Negative														
Positive														

Microgen™ GN B ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs	
Negative														
Positive														

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to laminate discolouration and paper ageing, the colours on this chart will change.

These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:

- Appropriate reagents to be added prior to reading.
- Overlaid with sterile mineral oil.
- Not overlaid with oil for oxidase positive organism.



Microgen Bioproducts Limited, 1 Admiralty Way, Camberley Surrey GU15 3DT UK



Edition: 2004 - 12

Anexo 33. Tabla de colores del Sistema Microgen-ID para determinación de los resultados mediante las reacciones obtenidas

Fuente: (Cortez-Pazmiño, 2012)

Tomado por: (La autora, 2023)

Tabla de colores: Microgen™ GN A y B ID (Descripción de reacciones)

TABLA DE REFERENCIA DE SUSTRATOS

Pocillo	Reacción	Descripción	Positivo	Negativo
1	Lisina	Decarboxilasa de lisina - el azul de bromotimol vira al verde/azul indicando la producción de la amina cadaverina.	Verde / Azul	Amarillo
2	Ornitina	Decarboxilasa de ornitina - el azul de bromotimol vira al azul indicando la producción de la amina putrescina.	Azul	Amarillo / verde
3	H ₂ S	Producción de H ₂ S - el tiosulfato es reducido a H ₂ S el cual reacciona con sales férricas produciendo un precipitado negro.	Marrón / negro	Pajizo
4	Glucosa	Fermentación - el azul de bromotimol vira del azul al amarillo por causa del ácido producido por la fermentación del carbohidrato.	Amarillo	Azul / verde
5	Manitol			
6	Xilosa			
7	ONPG	Hidrólisis - la hidrólisis de ONPG por la B-galactosidasa tiene como resultado la producción ortonitrofenol amarillo.	Amarillo	Incoloro
7a	NITRATO (para organismos oxidasa positivos)	La reducción de nitrato a nitrito es indicada por la formación de color rojo cuando se agregan reactivos de nitrato A y B.	Rojo	Incoloro / amarillo
7b	NITRATO (para organismos oxidasa positivos)	Si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno, 7a seguirá siendo incoloro/amarillo; agregando cinc en polvo se confirmará la reducción completa.	Incoloro/ amarillo	Rojo
8	Indol	El indol se produce a partir del triptofano, y da un complejo rosa/rojo cuando se añade reactivo de Kovac.	Rosa / rojo	Incoloro
9	Ureasa	La hidrólisis de la urea hace que se forme amoníaco, aumentando el pH con lo cual el fenol rojo vira del amarillo al rosa / rojo.	V. Rosa fuerte	Color pajizo a rosa salmón pálido
10	VP	La producción de acetoina a partir de la glucosa se detecta por la formación de un complejo rosa / rojo tras añadir alfa naftol y creatina en presencia de KOH.	Rosa fuerte / rojo	Incoloro a rosa pálido
11	Citrato	Se utiliza citrato (única fuente de carbono) que hace aumentar el pH, virando el azul de bromotimol del verde al azul.	Azul	Amarillo/ verde pálido
12	TDA	Se produce ácido indolpirúvico a partir de triptofano a través de la triptofano deaminasa, dando un color rojo cereza cuando se añaden iones férricos. Los aislados indol positivos pueden dar un color marrón; se trata de un resultado negativo.	Rojo cereza	Color pajizo
13	Gelatina	Las enzimas proteolíticas licúan la gelatina, obteniéndose partículas negras dispersadas en todo el pocillo.	Negro	Incoloro
14	Malonato	La inhibición de la conversión del ácido succínico a ácido fumárico se produce cuando el malonato de sodio es la única fuente de carbono. Un aislado incapaz de utilizar este sustrato causa la acumulación de ácido succínico, dejando el organismo de desarrollarse. Una reacción positiva es el resultado del uso de malonato de sodio al mismo tiempo que el sulfato de amonio sirve como fuente de nitrógeno, dando hidróxido de sodio, el cual incrementa la alcalinidad dando un color azul.	Azul	Amarillo
15	Inositol	Fermentación - el azul de bromotimol vira del azul al amarillo por causa del ácido producido por la fermentación del carbohidrato.	Amarillo	Azul
16	Sorbitol			
17	Ramnosa			
18	Sucrosa			
19	Lactosa			
20	Arabinosa			
21	Adonitol			
22	Rafinosa			
23	Salicina			
24	Arginina	La arginina es convertida en ornitina, amoníaco y CO ₂ por la dihidrolasa de arginina; por lo tanto, se incrementa el pH y el azul de bromotimol vira del verde al azul. A las 48 horas una reacción que da verde es negativa.	Verde / Azul Azul	Amarillo Amarillo / verde

Anexo 34. Tabla de referencia de sustratos para descripción de las reacciones y resultados obtenidos

Fuente: (Cortez-Pazmiño, 2012)

Tomado por: (La autora, 2023)

Promedio de los valores resultantes para el Método Tradicional y el Método Alternativo transformados a log10 para la Curva de Correlación

Alternative method - BactoScan				Anchor method - Petri dishes/film			
IBC/ml		log IBC/ml		CFU/ml		log CFU/ml	
Measur. 1	Measur. 2	Average		Measur. 1	Measur. 2	Average	
393000	398000	395500	5.80	13727	13636	13682	4.14
210000	219000	214500	5.33	1782	1918	1850	3.27
186000	193000	189500	5.28	464	600	532	2.73
65000	74000	69500	4.84	5636	6000	5818	3.76
27000	25000	26000	4.41	1864	1891	1877	3.27
337000	309000	323000	5.51	26818	28909	27864	4.45
25000	32000	28500	4.45	2264	2218	2241	3.35
55000	59000	57000	4.76	3245	3245	3245	3.51
1691000	1788000	1739500	6.24	31818	33636	32727	4.51
19000	19000	19000	4.28	727	782	755	2.88
1010000	1140000	1075000	5.03	11000	10455	10727	4.03
17000	16000	16500	4.22	1200	1273	1236	3.09
16000	13000	14500	4.16	1291	1364	1327	3.12
445000	449000	447000	5.65	189091	197273	193182	5.29
1487000	1493000	1490000	6.17	170000	192727	181364	5.26
2501000	2397000	2449000	6.39	709091	827273	768182	5.89
1677000	1664000	1670500	6.22	18364	20182	19273	4.28
929000	917000	923000	5.97	2381818	2663636	2522727	6.40
2110000	2004000	2057000	6.31	127273	161818	144545	5.16
312000	298000	305000	5.48	60909	61818	61364	4.79
2231000	2217000	2224000	6.35	1127273	1209091	1168182	6.07
804000	809000	806500	5.91	279091	290000	284545	5.45
51000	48000	49500	4.69	14455	16182	15318	4.19
41000	40000	40500	4.61	2482	2618	2550	3.41
98000	95000	96500	4.98	5364	5727	5545	3.74
183000	171000	177000	5.25	13455	13545	13500	4.13
212000	235000	223500	5.35	18545	22364	20455	4.31
198000	221000	209500	5.32	11727	14636	13182	4.12
352000	406000	379000	5.58	238182	209091	223636	5.35
290000	367000	328500	5.52	240909	242727	241818	5.38
504000	384000	444000	5.65	80909	82727	81818	4.91
388000	410000	399000	5.80	264545	266364	265455	5.42
1181000	1142000	1161500	6.07	1011818	916364	964091	5.98
1074000	1102000	1088000	6.04	220000	244545	232273	5.37
1211000	1251000	1231000	6.09	854545	1009091	931818	5.97
887000	853000	870000	5.94	56364	57273	56818	4.75
1155000	1153000	1154000	6.06	116364	122727	119545	5.08
2043000	1830000	1936500	6.29	827273	1009091	918182	5.96
3456000	3305000	3380500	6.53	3109091	3600000	3354545	6.53
2514000	2608000	2561000	6.41	1936364	2009091	1972727	6.30
2076000	1757000	1916500	6.28	663636	609091	636364	5.80
948000	1000000	974000	5.99	1109091	1227273	1168182	6.07
2749000	2387000	2568000	6.41	563636	600000	581818	5.76
990000	955000	972500	5.99	206364	234545	220455	5.34
500000	497000	498500	5.70	114545	126364	120455	5.08
1836000	2042000	1939000	6.29	300000	320909	310455	5.49
166000	169000	167500	5.22	15091	15455	15273	4.18
217000	225000	221000	5.34	197273	231818	214545	5.33
239000	241000	240000	5.38	217273	220000	218636	5.34
177000	173000	175000	5.24	1609091	1709091	1659091	6.22
28000	23000	25500	4.41	955	973	964	2.98
44000	58000	51000	4.71	1764	1655	1709	3.23
15000	13000	14000	4.15	636	782	709	2.85
189000	168000	178500	5.25	13727	12909	13318	4.12
28000	23000	25500	4.41	736	800	768	2.89
359000	344000	351500	5.55	53636	51818	52727	4.72
1061000	1144000	1102500	6.04	3000	3273	3136	3.50
19000	16000	17500	4.24	673	782	727	2.88
115000	136000	125500	5.10	35636	35727	35882	4.55
19000	15000	17000	4.23	845	964	905	2.96
66000	79000	72500	4.86	1018	1055	1036	3.02
6000	8000	7000	3.85	618	691	655	2.82
13000	13000	13000	4.11	473	536	505	2.70
34000	35000	34500	4.54	1091	1209	1150	3.08
159000	205000	182000	5.26	5909	6000	5955	3.77
73000	97000	85000	4.93	19000	18000	18500	4.27
24000	21000	22500	4.35	1500	1691	1595	3.20
120000	130000	125000	5.10	26273	24727	25500	4.41
41000	33000	37000	4.57	8455	9182	8818	3.95
62000	47000	54500	4.74				
355000	368000	361500	5.56				
133000	113000	123000	5.09				
46000	39000	42500	4.63				
11000	14000	12500	4.10				
24000	30000	27000	4.43				
21000	23000	22000	4.34				
589000	518000	553500	5.74				
97000	82000	89500	4.95				
45000	59000	52000	4.72				
70000	70000	70000	4.85				
133000	147000	140000	5.15				
16000	16000	16000	4.20				
29000	34000	31500	4.50				
13000	12000	12500	4.10				
18000	23000	20500	4.31				
1670000	1602000	1636000	6.21				
96000	110000	103000	5.01				
34000	35000	34500	4.54				
18000	19000	18500	4.27				
17000	19000	18000	4.26				
28000	28000	28000	4.45				
55000	64000	59500	4.77				
44000	34000	39000	4.59				
36000	41000	38500	4.59				
41000	42000	41500	4.62				
6000	5000	5500	3.74				
7000	6000	6500	3.81				
25000	30000	27500	4.44				
34000	44000	39000	4.59				
5000	5000	5000	3.70				
125000	132000	128500	5.11				
31000	28000	29500	4.47				
13000	15000	14000	4.15				
110000	135000	122500	5.09				
115000	108000	111500	5.05				
22000	23000	22500	4.35				
11000	12000	11500	4.06				
50000	57000	53500	4.73				
103000	110000	106500	5.03				
16000	17000	16500	4.22				
47000	46000	46500	4.67				
138000	114000	126000	5.10				
18000	19000	18500	4.27				
6000	5000	5500	3.74				
308000	314000	311000	5.49				
23000	25000	24000	4.38				
356000	362000	359000	5.58				
489000	493000	491000	5.69				
1284000	1290000	1287000	6.11				
1113000	1115000	1114000	6.05				
391000	398000	394500	5.60				
652000	655000	653500	5.82				
874000	881000	877500	5.94				
831000	835000	833000	5.92				
384000	389000	386500	5.59				
457000	462000	459500	5.66				
716000	722000	719000	5.86				
923000	930000	926500	5.97				
1362000	1365000	1363500	6.13				
437000	439000	438000	5.64				
1174000	1181000	1177500	6.07				
933000	938000	935500	5.97				
561000	563000	562000	5.75				
639000	641000	640000	5.81				
872000	876000	874000	5.94				
1297000	1302000	1299500	6.11				
1236000	1242000	1239000	6.09				
1466000	1471000	1468500	6.17				
225000	227000	226000	5.35				
412000	418000	415000	5.62				
667000	670000	668500	5.83				
591000	593000	592000	5.77				
				150909	154545	152727	5.18
				107273	116364	111818	5.05
				10727	11273	11000	4.04
				11545	12273	11909	4.08
				409	655	532	2.73
				909	1136	1023	3.01
				818	618	718	2.86
				27636	27818	27727	4.44
				1127	1182	1155	3.06
				718	782	750	2.88
				982	918	950	2.98
				19545	19273	19409	4.29
				473	391	432	2.84
				509	518	514	2.71
				345	355	350	2.54
				573	527	550	2.74
				3163636	3600000	3381818	6.53
				1855	2055	1965	3.29
				782	682	732	2.86
				573	545	559	2.75
				564	555	559	2.75
				582	645	614	2.79
				873	1009	941	2.97
				845	836	841	2.92
				900	918	909	2.96
				827	836	832	2.92
				382	318	350	2.54
				527	582	555	2.74
				736	727	732	2.86
				864	882	873	2.

Nota: Los valores detallados en el presente anexo son el promedio de los datos del Conteo Total de Bacterias de ambos métodos analizados y los resultados transformados en unidades logarítmicas de base 10. Con estos valores se realizó la Figura 3 y 4 del Trabajo de Titulación. Los valores pertenecen a los datos que se encuentran dentro de los criterios establecidos por lo que de 200 muestras solo 142 fueron viables para el análisis estadístico.

Tomado por: (La autora, 2023)