

ESTUDIO COMPARADO DE TRES METODOS PARA CATALOGAR LA
CALIDAD MICROBIOLOGICA DE LA LECHE CRUDA EN ZONAS DE CLIMA
CALIDO.

(COMPARISON OF THREE METHODS FOR GRADING THE BACTERIOLOGICAL
QUALITY OF RAW MILK IN WARM COUNTRIE).

por

JOSE ESPEJO SERRANO*

I. *Introducción y revisión bibliográfica.*

Hoy día son muchos los investigadores que opinan, basándose precisamente en la influencia decisiva de las fuentes exógenas de contaminación, que el estudio de las bacterias viables representa uno de los más fieles índices del grado higiénico observado en la granja de producción (Auclair, 1957; Brazis y Black, 1962; Johns *et al.*, 1964. Morse *et al.*, 1968b; Lück y Clark, 1970; Fryer, 1972; entre otros).

Entre los diversos procedimientos existentes para estimar el número de bacterias totales presentes en la leche, el mejor, más común y utilizado como método de referencia, es el recuento estandar en placas con *Standard Methods Agar* (A.P.H.A., 1967).

En el control rutinario de múltiples muestras en las plantas industriales se usan pruebas indirectas más rápidas, simples y económicas, basadas en la reducción de colorantes, que están estrechamente relacionadas con el recuento normal en placa.

Así la prueba del azul de metileno que es una prueba rápida mediante la cual se puede evaluar de forma indirecta la densidad bacteriana de la leche, y que permite clasificarla en diferentes categorías según el tiempo empleado en la reducción del colorante.

Aunque el mecanismo del método es complicado y todavía no se conoce plenamente, se basa en la relación o paralelismo existente entre la densidad de la población microbiana y la cantidad de sustancias reductoras excretadas.

* Parte de estos datos pertenecen a la Tesis doctoral. El trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de la Facultad de veterinaria de Córdoba.

ESPEJO. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

Aunque la leche del interior de la ubre tiene cierta capacidad reductora, ésta se pierde al captar oxígeno en el momento del ordeño. Sin embargo al proliferar los microorganismos contaminantes disminuye la concentración de oxígeno disuelto y al mismo tiempo aumenta el nivel de reductasas extracelulares.

Esta prueba descrita por Barthel y Orla Jensen 1912 y adoptada oficialmente en Inglaterra en 1937 (Johns, 1939B), tal vez sea el *test* bacteriológico más simple y utilizado para el control de la calidad de la leche (Hartley *et al.*, 1969).

Desde el principio se supo que la prueba era una de las más seguras y rápidas (Ellenberger *et al.*, 1927, Thornton y Hasting, 1930).

Algunos autores han observado, sin embargo, que la seguridad aumenta con el grado de contaminación del producto, habiéndose comprobado que cuando el tiempo de reducción es del orden de 5,5 horas o mayor, disminuye la eficacia de la misma (Robetson y Frayer, 1930; Johns, 1930; Fryer, 1973; entre otros).

Wilson *et al.* (1935), tras exhaustivos estudios, llegaron a la conclusión de que cuando el tiempo de incubación se alargaba convenía invertir periódicamente los tubos (cada 30 minutos), con el fin de homogeneizar el contenido y aumentar la sensibilidad.

Por otra parte está demostrado que las bacterias psicrófilas, termófilas y termo-resistentes tienen escasa o nula capacidad reductora, mientras que otras como los estreptococos generadores de ácido láctico y los microorganismos del grupo coli-aerógenos poseen una intensa fuerza reductora (LaGrange y Nelson, 1965; Brazis y Black, 1966; Lück y Clark, 1969; Lück *et al.*, 1970; Naudts, 1970).

Por tales motivos dicha prueba, como cualquier otra de reducción de colorantes, será tanto más eficaz cuanto mayor sea la posibilidad de desviaciones de la flora "media o normal", como ocurre, por ejemplo, en la leche muy pobre de gérmenes, en la procedente de un solo establo y en las leches defectuosas.

Así mismo influye sobre el resultado final de la prueba el tratamiento a que se haya sometido la leche después del ordeño. Se ha visto que cuando la leche se almacena durante varias horas a una temperatura de 4,4 °C, el tiempo de incubación se alarga considerablemente, como consecuencia del letargo fisiológico que se produce en las bacterias a dicha temperatura (Frayer, 1930, 1932 y 1934; Malcolm *et al.*, 1966; Lück, 1970).

Para paliar el citado inconveniente y asegurar una mayor correspondencia entre la prueba de reducción del azul de metileno y el contenido microbiano se ha propuesto una pre-incubación a 12,8 °C durante 18 horas (Johns, 1930, 1938; VI Comisión de la Asociación Internacional Lechera, Varsovia, 1966).

ESPEJO: CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

La prueba de resazurina fue introducida en Alemania en 1928 (Perch y Simmert, 1929), en Estados Unidos en 1936 por Ramsdell *et al.*, y adoptada en Inglaterra en 1943 (McKenzie, 1962) como procedimiento rápido y sencillo para clasificar la leche por su contenido bacteriano. Está basada, igual que la de azul de metileno, en la capacidad reductora de los microorganismos que proliferan en la leche.

En el curso de la prueba, la resazurina cambia de color azul original a incoloro, pasando por unos tonos lila y rosa más o menos intensos. En un principio la apreciación de los cambios de coloración se hacía de forma subjetiva o usando papeles de colores apropiados, procedimiento que no ofrecía muchas garantías para dar a la prueba un verdadero valor científico.

Diversos investigadores, pero esencialmente Thomas (1936, 1940) y Davis (1943), resuelven el problema al estudiar y diseñar el comparador de Lovibond, cuyo disco de colores determinados simplifican y objetivizan la situación.

Esta prueba ha reemplazado en muchos laboratorios a la de azul de metileno debido a que se requiere menor tiempo de incubación (Hartley *et al.*, 1969) y según algunos autores es también más sensible (Little, 1940; McKenzie, 1962; LaGrange y Nelson, 1965; Gordin *et al.*, 1970).

Además el *test* tiene la ventaja de poder detectar leches fisiológicamente anormales (Frayser, 1938; Thomas y Probert, 1940; Thomas y Davies, 1940; Boyd *et al.*, 1948; McBride y Golding, 1951; Nelson y Baker, 1954; Johns y Berzins, 1959; Taylor, 1967). Así se ha comprobado que la leche muy cargada de células reduce rápidamente la resazurina, teniendo escaso o nulo efecto sobre el azul de metileno (Thornton *et al.*, 1934; Strynadka y Thornton, 1938; Thomas y Probert, 1940; Thomas y Davies, 1940).

Si bien la acción de los leucocitos sobre la resazurina aún no está claramente definida, existen indicaciones de que la capacidad de la resazurina para detectar leches mamíticas se basa, no en la presencia de leucocitos sino de otros agentes presentes en el suero (Campbell y Phelps, 1960).

En líneas generales, la mayoría de los autores está de acuerdo en que las pruebas de reducción de la resazurina y del azul de metileno son igualmente efectivas para detectar leches de elevado contenido bacteriano (Collins *et al.*, 1939; Davies, *et al.*, 1939; Johns, 1939a; Little, 1940; Hartley *et al.*, 1969).

De otra parte, al igual que ocurre con la prueba del azul de metileno, la resazurina apenas se reduce por la presencia de microorganismos psicrófilos y termorresistentes. Por esta causa y dado el incremento en algunos países el empleo de refrigeración mecánica se ha planteado la necesidad de reevaluar esta prueba (Thomas y Davies, 1940; Morris, 1943; Fabian, 1946; Thomas y Jones-Evans, 1946; Johns,

ESPEJO: CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

1953, Atherton, 1958; LaGrange y Nelson, 1965; Orr *et al.*, 1965; Thomas *et al.*, 1966).

En este caso también se ha comprobado que cuando las muestras proceden de leche refrigerada, si se hace una pre-incubación a 12,8° C durante 18 horas los resultados finales suelen concordar con los recuentos en placa (Chalmers, 1956; Johns y Berzins, 1959; Johns, 1960; McKenzie, 1962).

En las zonas donde aún no está extendida la refrigeración mecánica, tanto esta prueba como la del azul de metileno, siguen siendo de elección dado su corto tiempo de realización y el escaso costo comparado con cualquier otra (Johns, 1966).

Aunque ambas pruebas están normalizadas (A. P. H. A., 1967) en el caso de la resazurina se pueden seguir, en líneas generales, dos métodos:

- a) Medir el color alcanzado tras un tiempo determinado de incubación.
- B) Medir el tiempo invertido en alcanzar un determinado color o en producirse la reducción total (Borrell, 1949).

II. *Material y métodos.*

Las muestras de leche objeto de análisis se obtuvieron de los depósitos de almacenamiento de leche cruda de una central lechera de Andalucía.

La recogida de muestras se efectuó, a intervalos periódicos de 10 días aproximadamente, durante el transcurso de un año completo (de marzo de 1973 a marzo de 1974).

Cada una de las muestras analizadas es representativa de 24.000 a 36.000 litros de la mezcla de la leche entregada por la mañana por los productores (Espejo, 1975).

Todos los ingredientes empleados para los medios de cultivo son de la marca DIFCO. Para las pruebas de reducción de colorantes se han utilizado tabletas de azul de metileno y de resazurina, (B. D. H.), para análisis microbiológico de leche.

Para las lecturas en la prueba de la resazurina se usó el comparador de Lovibond 1.000.

El *Standard Method Agar* (S. M. A.) se preparó como describe la A. P. H. A. (1967).

En la toma de las muestras de leche de los depósitos de almacenamiento de la leche cruda y en la preparación de las diluciones se utilizaron frascos de cierre de rosca (marca SOVIREL) de 100 ml de capacidad; y para la preparación de la muestra analítica, así como para mezclar muestras de leche procedentes de diferentes depósitos, se usaron frascos de 1.000 ml de capacidad de la misma marca y tipo.

ESPEJO: CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

Para el transporte de las muestras de leche al laboratorio se utilizó una bolsa de mano llena de hielo picado.

III. Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos de los recuentos en placas de las bacterias viables totales de la leche cruda a lo largo de un año, así como los resultados de las pruebas reductasimétricas, azul de metileno y resazurina (a los 10 minutos y hasta alcanzar el valor 2,5 en el comparador de Lovibond 1.000), se expresan en la tabla I.

Entre el recuento normal en placa de bacterias viables y las pruebas indirectas de reducción del azul de metileno y de la resazurina, se ha observado que existe una correlación altamente significativa y del mismo grado para ambas ($r = -0,82$ y $r = -0,88$, respectivamente).

Respecto al azul de metileno al valor de r hallado por nosotros es del mismo grado de significación al encontrado por Thome *et al.*, (1955), Oberby (1964), Dabhad y Olsen (1965) y Poffé *et al.*, (1965).

Igualmente son muchos los investigadores que desde hace tiempo han encontrado correlación entre la prueba de la resazurina y el número de bacterias totales (Keenan *et al.*, 1937.; Frayer, 1938; Johns y Howson, 1940; Goldin y Jorgensen, 1945. Johns *et al.* 1964, etc.). Incluso con leche refrigerada existe tal correlación si la muestra se incubaba previamente a la prueba a 18° C durante 18 horas (Mourges y Auclair, 1965, Thomas *et al.*, 1966). Otros por el contrario (como Lück *et al.* 1970) opinan que la prueba de la resazurina no guarda la mencionada correlación si ha sido almacenada durante mucho tiempo a baja temperatura.

Si bien algunos investigadores como Keenan *et al.* (1973), Little (1940), La-Grange y Nelson (1966), han considerado a la prueba de la resazurina más sensible que la del azul de metileno, en nuestro caso no se han encontrado diferencias significativas entre las dos pruebas, si bien la prueba de la resazurina resulta más rápida y objetiva.

A este respecto hay que señalar que el valor de r obtenido al enfrentar las lecturas del comparador a los 10 minutos de incubación con el número de bacterias viables ($-0,88$), es del mismo grado de significación al r hallado al comparar el tiempo de reducción de la resazurina hasta el valor 2,5 con el recuento bacteriano ($-0,84$).

Igualmente Lück *et al.*, (1966) no encontraron diferencias significativas entre los valores de r obtenidos al efectuar la prueba de la resazurina incubando 1, 2 y 3 horas ($-0,73$; $-0,73$ y $-0,71$, respectivamente), y comparar los resultados con los recuentos en placas de bacterias totales.

ESPEJO. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

TABLA I. Recuentos de bacterias viables totales y resultados de las pruebas reductasimétricas.

Muestra	Número de colonias (x 10 ⁶) *	Azul de Metileno minutos	PRUEBA DE LA RESAZURINA	
			Incubando 10 minutos	Tiempo de reducción al valor 2,5 del comparador
1	12,0	75'	5,5	75'
2	50,0	30'	3,5	20'
3	44,0	30'	3,0	30'
4	30,0	45'	4,5	30'
5	30,0	30'	4,5	30'
6	18,0	80'	6,0	60'
7	43,0	10'	3,0	15'
8	33,0	30'	4,0	30'
9	29,0	20'	4,5	20'
10	35,0	30'	4,0	30'
11	101,0	10'	2,5	10'
12	56,0	15'	3,5	15'
13	54,0	10'	3,0	15'
14	33,0	30'	4,5	20'
15	44,0	20'	3,5	20'
16	32,0	70'	4,0	40'
17	56,0	20'	3,0	20'
18	18,0	100'	5,5	60'
19	34,0	40'	4,0	40'
20	24,0	60'	5,0	45'
21	18,0	60'	5,5	60'
22	57,0	20'	3,0	15'
23	19,0	50'	5,5	50'
24	19,0	50'	5,0	50'
25	21,0	50'	5,0	50'
26	10,0	80'	5,5	80'
27	12,0	60'	6,0	60'
28	20,0	50'	5,0	50'
29	17,0	55'	5,5	55'
30	46,0	25'	3,5	25'
31	20,0	45'	5,5	50'
32	12,0	80'	5,5	65'
33	15,0	60'	6,0	70'
34	20,0	50'	4,5	50'
35	13,0	60'	5,0	50'
36	11,0	65'	5,0	70'
37	28,0	30'	4,0	30'

* El número que se expresa corresponde a la media aritmética de los recuentos obtenidos en, por lo menos, cinco placas.

IV. *Resumen.*

Se ha realizado un estudio comparativo entre los grados de calidad bacteriológica obtenidos, a partir de las mismas muestras de leche cruda, por el recuento normal en placa (rnp), la prueba de reducción del azul de metileno (pram) y la de la resazurina (prr). En este último caso se hizo la prueba de los 10 minutos, así como el tiempo empleado en reducirse hasta alcanzar el valor 2,5 en el comparador de Lovibond "1.000".

Hemos podido comprobar que existe una correlación muy estrecha entre el rnp y la pram ($r = -0,82$) y entre el rnp y la prr ($r = -0,84$). No observándose diferencias significativas entre la pram y la prr si bien esta última resulta más rápida y objetiva.

V. *Summary.*

A comparison was made between the bacteriological quality grades, given to the same milk samples by the Standard Plate Count (SPC), the Methylene Blue Reduction Test (MBRT) and the Resazurine Reduction Test (RRT); both the 10 minutes test and the time taken to reach a 2,5 value at the Lovibond "1.000" were applied to the RRT.

A close relation was found between the SPS MBRT ($r = -0,82$); a similar relation was observed between the SPC and RRT ($r = -0,88$) and so between the SPC and the time to reach a 2,5 value at the comparator ($r = -0,84$). No relevant differences between the MBRT and the RRT, nevertheless we do recognise that the last (RRT) is more objective and takes less time than the MBRT.

V. *Bibliografía.*

- American Public Health Association, 1967.—Standard methods for the examination of dairy products, 12 th Edit. N. Y. 10019.
- Atherton, H. V. 1958.—Vermont Agr. Exp. Sta. Bull., 610: 24.
- Auclair, J. 1957.—Sup. Bull. Inst. Inter. Froid Extrait. 1957, 3.
- Borrell, S. 1949.—Anales de Bromatología, I, 57.
- Boyd, J. C. and H. C. Hansen, 1948.—Milk Dealer, 38: 200.
- Brazis, A. R. and L. A. Black, 1962.—J. Milk Food Techn., 25: 240.
- — — — — 1966.—J. Milk Food Techn., 29: 255.
- Collins, M. A.; L. M. White; W. H. Chilson; H. G. Turner and J. R. Rice, 1939.—J. Milk Techn. 2: 236.

ESPEJO. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

- Chalmers, C. H. 1956.—Dept. Health Scot. Bull., 14.
- Dabbah, R. and J. C. Olson, Jr. 1965.—J. Dairy Sci., 48: 770.
- Davies, J.; B. F. Thomas and S. B. Thomas, 1939.—Welsh, J. Agr., 15: 181.
- Davis, J. G. 1943.—Dairy Indust., 8, 167.
- Ellenberger, H. B.; M. C. Bond; A. H. Robertson and R. I. Moody, 1927.—Vermont Agr. Exp. Sta. Bull., 264, 32.
- Espejo, J. 1975.—Tesis doctoral, pp. 107-108.
- Fabian, F. W. 1946.—J. Milk Techn., 9: 273.
- Frayser, J. M. 1930.—Vermont Agr. Exp. Sta. Bull., 313: 34.
- 1932.—Vermont Agr. Exp. Sta. Bull., 343: 61.
- 1934.—Vermont Agr. Exp. Sta. Bull., 374: 28.
- 1938.—Vermont Agr. Exp. Sta. Bull., 435: 16.
- Fryer, T. F. 1973.—N. Z. J. Dairy Res. Inst. Public., 595.
- Golding, N. S. and S. I. Jorgensen, 1945.—J. Milk Food Techn., 8: 189.
- Gordin, S.; G. Ziv and O. Gamil, 1970.—Israel J. Agr. Res., 20: 113.
- Hartley, J. C.; E. R. Vedamuthu and G. W. Reimbold, 1969.—J. Milk Food Techn., 32: 4.
- Johns, C. K. 1930.—Sci. Agr., 11: 171.
- 1939a.—Sci. Agr. Res., 20: 113.
- 1939b.—Amer. J. Public. Health, 29: 239.
- 1953.—13 th Inter. Dairy Congr. (The Hague) Proc. 2: 241.
- 1960.—Dept. Agr. Can., Publ. 1084.
- Johns, C. K. and I. Berzins, 1959.—15 th Inter. Dairy Congr. (London) Proc. 3: 1293.
- Johns, C. K. and R. K. Hawson, 1940.—J. Milk Techn., 3: 320.
- Johns, C. K.; L. F. L. Clegg; A. G. Leggalt and J. M. Nesbit, 1964.—J. Milk Food Techn., 27: 326.
- Keenan, J. A.; W. D. Barret and H. Rutan, 1973.—J. Milk Food Techn., 12: 22.
- LaGrange, W. S. and F. E. Nelson, 1965.—J. Dairy Sci., 48: 1129.
- Little, L. 1940.—J. Milk Techn., 3: 274.
- Lück, H. and P. C. Clark, 1970.—Agroanimallia, 2: 35.
- Lück, H.; P. C. Clark and H. T. Groeneveld, 1970.—Agroanimallia, 2: 69.

ESPEJO: CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN CLIMAS CALIDOS.

- Lück, H.; M. N. Herman and S. A. Fellingham, 1966.—*S. Afr. J. Agr. Sci.*, 2: 661.
- Malcom, J. F. and R. H. Leetch, 1936.—*Scot. J. Agr.*, 19: 321.
- Nobride, C. A. and N. S. Golding, 1951.—*J. Milk Food Techn.*, 14: 27.
- MacKenzie, D. A. 1962.—*J. Soc. Dairy Techn.*, 15: 207.
- Morris, C. S. 1943.—*Soc. Agr. Bacteriol.*, 6: 28.
- Morse, P. M.; H. Jackson; C. H. Macnaughton; A. G. Leggat; G. B. Landerkin and C. K. Johns, 1968b.—*J. Dairy Sci.*, 51: 1182.
- Morse, P. M.; H. Jackson, C. H. Macnaughton; A. G. Leggat; G. B. Landerkin and C. K. Johns, 1968b.—*J. Dairy Sci.*, 51: 1188.
- Mourgues, R. et J. Auclair, 1965.—*Ind. Lait.*, 220, Extr.
- Naudts, M. 1970.—*Rijkszuivestation-Melle*, 16 Februari, 1970.
- Nelson, F. E. and M. P. Baker, 1954.—*J. Milk Food Techn.*, 17: 95.
- Overbry, A. J. 1964.—*Royal Vet. Agr. Coll. Conpehagen, Yearbook*, 1: 33.
- Orr, M. J.; R. M. MacLarty, and S. Baines, 1965.—*Dairy Industries*, 30: 276.
- Pesch and Simmert. 1929.—*Millchw. Forsth.*, 8: 551.
- Poffe, R.; M. Weckx et P. Simonart, 1968.—*Le lait*, 31: 471.
- Ramsdell, G. A.; W. T. Johnson, Jr, and F. R. Evans, 1935.—*J. Dairy Sci.*, 18: 705.
- Robertson, A. H. and J. M. Frayer, 1930.—*Vermont Agr. Exp. Sta. Bull.*, 316: 55.
- Strynadka, N. J. and H. R. Thornton, 1938.—*J. Dairy Sci.*, 21: 561.
- Taylor, M. M. 1967.—*Dairy Industries*, Abril 1967, 278.
- Thomas, S. B. 1935.—*Welsh, J. Agr.*, 15: 151.
- Thomas, S. B. and M. Davies, 1940.—*Welsh J. Agr.*, 16: 231.
- Thomas, S. B.; R. G. Bruce; M. Davies and J. S. Bear, 1966.—*J. Soc. Dairy Techn.*, 19: 161.
- Thomas, S. B. and E. Jones Evans, 1946.—*Dairy Industries*, 11: 20.
- Thomas, S. B. and D. Provert, 1940.—*Soc. Agr. Bacteriol.*, 3: 34.
- Thome, K. E.; E. G. Samuelson and N. Mattson, 1955.—*Milchwissenschaft*, 10: 232.
- Thornton, H. R. and E. G. Hasting, 1930.—*J. Dairy Sci.*, 13: 21.
- Thornton, H. R.; N. J. Strynadka, F. W. Wood and C. Ellinger, 1934.—*Can. Public. Health J.*, 25: 284.