



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CALIDAD FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN SISTEMAS FAMILIARES DE LA MICROCUENCA ZAHUAPAN EN EL ESTADO DE TLAXCALA

PIEDAD MUNGUIA VILLEDA

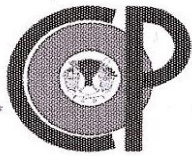
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2015



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR
Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Piedad Munguía Villeda**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Francisco Calderón Sánchez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche en sistemas familiares de la microcuenca Zahuapan en el estado de Tlaxcala**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 19 de noviembre del 2015

Piedad Munguía Villeda

Nombre completo y Firma

Dr. Francisco Calderón Sánchez

Vo. Bo. Profesor Consejero o Director de Tesis
Nombre completo y Firma


La presente tesis, titulada: **Calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche en sistemas familiares de la microcuenca Zahuapan en el estado de Tlaxcala**, realizada por la alumna: **Piedad Munguia Villeda**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. FRANCISCO CALDERÓN SÁNCHEZ

ASESOR:



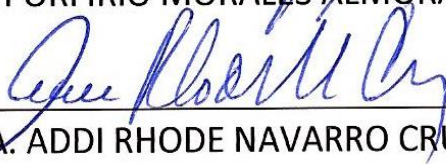
DR. JOSÉ SERGIO ESCOBEDO GARRIDO

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DRA. ADDI RHODE NAVARRO CRUZ

Puebla, Puebla, México, 19 de noviembre del 2015

CALIDAD FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE EN SISTEMAS FAMILIARES DE LA MICROCUENCA ZAHUAPAN EN EL ESTADO DE TLAXCALA

Piedad Munguía Villeda, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2015

Se determinó la calidad fisicoquímica y microbiológica de 52 muestras de leche cruda de tres sitios de muestreo, correspondiendo a los municipios de Tlaxco= S1, Atlangatepec= S2 y Tetlatlahuca= S3, localizados en la microcuenca del Río Zahuapan. El muestreo se realizó en dos fases; bajo el manejo tradicional (Fase 1), e incorporando una técnica de higienización en la ordeña (Fase 2). Se determinó contenido de grasa, proteína, lactosa, minerales y sólidos no grasos (SNG), densidad y el pH. Los criterios microbiológicos considerados fueron coliformes totales (CT), bacterias mesofílicas aerobias (BMA), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), mohos y levaduras, *Salmonella* spp y *Listeria* spp. Se encontró que el contenido de grasa fue mayor en el Sitio1 (3.83% VS 2.09% y 3.03%), los demás componentes fueron similares entre sitios, promediando para proteína, lactosa, minerales y SNG, 2.92%, 4.36%, 0.66% y 7.95%, respectivamente, para densidad se obtuvo 1.03 y pH 6.68. Con base a la norma vigente, el contenido de grasa, proteína y lactosa fue adecuado, no así en minerales, SNG y densidad, que resultaron ligeramente bajos. Microbiológicamente en la Fase 1, los conteos sobrepasan los límites permitidos por la norma- 243- SSA1-2010 en los parámetros estudiados; sin embargo, en la Fase 2 el conteo se redujo en un 83.7% CT, 33.9% BMA, 43.5% *Staphylococcus aureus*, 84.8% Mohos y levaduras y 77% *E. coli*. Todas las muestras excepción de *S. aureus* cubren la normatividad, adicionalmente el 4% y 12% de las muestras con sospechas de *Salmonella* spp y *Listeria* spp. Se concluyó que bajo el manejo tradicional se cubren las especificaciones fisicoquímicas, no las microbiológicas, por lo que es necesaria la implementación de buenas prácticas de higienización para obtener un producto que cubra los estándares de calidad.

Palabras clave: Bovinos, higienización, inocuidad, normas.

PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MILK IN FAMILY SYSTEMS IN THE MICROWATERSHED ZAHUAPAN TLAXCALA

Piedad Munguía Villeda, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2015

The physicochemical and microbiological quality of 52 samples of raw milk of three sampling sites corresponding to the municipalities of Tlaxco = S1, Tetlatlahuca =S2 and Atlangatepec = S3, located in the microwatershed of the Rio Zahuapan is determined. The sampling was conducted in two phases; under traditional management (Phase 1), and incorporating a technique for milking sanitation (Phase 2). Fat, protein, lactose, minerals and fat solids (SNG), density and pH were determined. The microbiological criteria considered were total coliforms (CT), aerobic mesophilic bacteria (BMA), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*), molds and yeasts, *Salmonella* spp and *Listeria* spp. It was found that the fat content was higher in the Site1 (3.83% vs. 2.09% and 3.03%), the other components were similar between sites, averaging for protein, lactose, minerals and SNG, 2.92%, 4.36%, 0.66% and 7.95%, respectively for density 1.03 and pH 6.68 were obtained. Based on the current regulation, the fat, protein and lactose it was adequate, but not in minerals, SNG and density, which were slightly lower. Microbiologically in Phase 1, the counts exceed the limits permitted by the normal 243- SSA1-2010 in the parameters studied; However, in Phase 2 the count were reduced to 83.7% for CT and 33.9% BMA, 43.5% *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), 84.8% Yeast and molds and 77% *E. coli*. All samples, except for *S. aureus*, cover the regulation, additionally 4% and 12% of samples suspected of *Salmonella* spp and *Listeria* spp. It was concluded that under the traditional management physicochemical specifications are met, no microbiological, so the implementation of good hygiene practices to obtain a product that meets quality standards is necessary.

Keywords: Cattles, sanitation, safety, standards

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir, por todas las cosas maravillosas que ha puesto a lo largo del camino, por tomarme entre sus brazos y mostrarme que siempre hay una luz al final del túnel, y que la carga es menos pesada cuando él nos acompaña.

A mi familia, mamita y hermanos Jesús y Marcos Daniel, por estar conmigo en este trayecto llamado vida y por darme su amor incondicional y comprensión en todo momento, los amo mi querida familia.

Al Colegio de Postgraduados por ser la institución que me formara en este peldaño más de mi vida profesional.

A CONACYT, por brindarme el apoyo económico y permitir el desarrollo profesional de estudiantes comprometidos con el país.

Al Dr. Francisco Calderón Sánchez, por su dirección en este trabajo, por entenderme y guiarme durante esta etapa profesional.

A la Dra. Addi Rhode Navarro, por toda su enseñanza, por el ejemplo de dedicación y tenacidad así como el apoyo brindado a la presente investigación.

A los Doctores José Sergio Escobedo Garrido y Porfirio Morales Almora, por el apoyo brindado al presente trabajo.

A los productores que participaron por su ayuda y atención en las actividades programadas para la realización de este proyecto.

A Ana Karen Juárez, por su amistad y ayuda, y por las veces que estuviste conmigo en el laboratorio criticando mi trabajo y al final dándome ánimo para que el tiempo se me hiciera corto.

A todos aquellos que de una u otra forma han formado parte de mi vida, compañeros y amigos, gracias.

DEDICATORIAS

A mi madre, por darme la vida y por ser parte esencial en ella, por mostrarme el camino y enseñarme a nunca rendirme.

A mis hermanos Jesús y Marcos Daniel, por acompañarme por ser los hermanos que más quiero y porque ante cualquier adversidad han permanecido conmigo.

A mí pasado por lo que me alentó a seguir, a mi presente porque me enseña que no hay obstáculo en la vida y a mi futuro que me permite visualizar un peldaño más, una meta y un sueño que perseguir.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN.....	1
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	2
2.1 Planteamiento del problema.....	2
2.2 Objetivo General.....	3
2.3 Objetivos Particulares.....	4
2.4 Hipótesis.....	4
III MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Contexto de la leche en México.....	5
3.2 Limitaciones económicas de la producción de leche.....	6
3.3 La ganadería lechera familiar.....	9
3.4 Calidad fisicoquímica de la leche.....	11
3.4.1 Características fisicoquímicas.....	11
3.4.2 Calidad fisicoquímica de la leche en base a la norma NMX- F-700-COFOCALEC-2012.....	12
3.4.3. Factores que afectan la calidad fisicoquímica.....	18
3.5 Calidad higiénico-sanitaria de leche.....	19
3.5.1 Criterios microbiológicos.....	19
3.5.2 Microorganismos indicadores.....	21
3.5.3 Microorganismos patógenos.....	28
3.5.4 Factores que afectan la calidad microbiológica de la leche.....	29
3.6 Efectos de la calidad higiénica de leche sobre la salud humana.....	31
3.7 Pago por calidad de la leche.....	33
3.8 Marco referencial de la producción de leche en la región de estudio.....	34

IV METODOLOGÍA.....	38
4.1 Sitios de muestreo.....	38
4.2 Obtención de las muestras.....	38
4.3 Análisis fisicoquímico de leche.....	39
4.4 Análisis microbiológico de leche.....	39
4.4.1 Preparación de diluciones.....	39
4.4.2 Determinación de bacterias coliformes totales.....	40
4.4.3 Determinación de Bacterias Mesofilicas Aerobias (BMA).....	42
4.4.4 Determinación de Mohos y Levaduras.....	43
4.4.5 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.4.6 Determinación de <i>E. coli</i>	45
4.4.7 Determinación de <i>Salmonella</i> spp.....	46
4.4.8 Determinación de <i>Listeria</i> spp.....	47
4.5 Análisis estadístico.....	48
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
5.1 Análisis de la calidad fisicoquímica de la leche.....	49
5.1.1 Composición fisicoquímica por sitios.....	51
5.2 Análisis de Calidad microbiológica.....	52
5.2.1 Microorganismos indicadores.....	52
5.2.2 Distribución gráfica de las cargas de microorganismos indicadores.....	56
5.2.3 Microorganismos patógenos.....	62
VI CONCLUSIONES.....	64

VII LITERATURA CITADA.....	66
VIII ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Producción, importación y consumo de leche en México en los últimos diez años.....	6
Figura 2	Tendencia de precios de Insumos alimenticios del ganado y de la leche cruda en la región centro del país en el periodo 2010-2015.....	7
Figura 3	Tendencia de los precios de la leche cruda en la Región de Tlaxcala respecto a la leche pasteurizada (marca comercial) 2010-2015	8
Figura 4	Factores que interviene en la calidad microbiológica de la leche cruda.....	28
Figura 5	Diagrama General de trabajo.....	37
Figura 6	Ubicación de los sitios de estudio en la microcuenca del río Zahuapan.....	38
Figura 7	Análisis microbiológicos realizados.....	41
Figura 8	Crecimiento de Coliformes totales en Agar Rojo Violeta Bilis después del tiempo de incubación.....	42
Figura 9	Placa testigo Agar rojo Violeta bilis sin inóculo después del tiempo de incubación.....	42
Figura 10	Crecimiento de Bacterias Mesofílicas Aerobias en Agar Cuenta Estándar, después del tiempo de incubación.....	43
Figura 11	Placa testigo (Agar cuenta Estándar) sin inóculo, después del tiempo de incubación.....	43
Figura 12	Crecimiento de Mohos (colonias grandes, vellosas y Levaduras (colonias pequeñas) en Agar papa Dextrosa (PDA), después del tiempo de incubación	44
Figura 13	Placa testigo (PDA) sin inóculo, después del tiempo de Incubación.....	44
Figura 14	Colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> (negras con halo blanco), en agar Baird Parker después del tiempo de incubación.....	45
Figura 15	Placa testigo (agar Baird Parker) sin inóculo, después del tiempo de incubación.....	45

Figura 16	Siembra de tubos con Caldo Triptosa (Prueba presuntiva.....	46
Figura 17	Fluorescencia emitida por tubos con Caldo <i>E. coli</i> - MUG, después del tiempo de incubación.....	46
Figura 18	Colonias características de <i>Salmonella</i> spp. productoras de ácido sulfhídrico (color negro), en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato después del tiempo de incubación.....	47
Figura 19	Pruebas bioquímicas, después del tiempo de incubación. De izquierda a derecha: Agar de Hierro y Triple Azúcar, Agar Hierro Lisina, Medio MIO y Agar Citrato de Simmons.....	47
Figura 20	Placas con crecimiento de colonias sospechosas de <i>Listeria</i> spp. con hidrólisis de esculina (coloración negra)	48
Figura 21	Tinción de Gram de colonias sospechosas de <i>Listeria</i> spp. Presencia de bacilos Gram positivos (coloración violeta).....	48
Figura 22	Distribución del recuento de Coliformes Totales (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.....	57
Figura 23	Distribución del recuento de Bacterias Mesofílicas Aerobias (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.....	58
Figura 24	Distribución del recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.....	59
Figura 25	Distribución del recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.....	60
Figura 26	Distribución de la estimación de <i>Escherichia coli</i> (NMP/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Composición media de leche de distintas especies expresada en %.....	12
Cuadro 2	Especificaciones fisicoquímicas para leche cruda de vaca.....	13
Cuadro 3	Parámetros fisicoquímicos encontrados en leche cruda de vaca (%)......	14
Cuadro 4	Criterios microbiológicos para leche cruda establecidos en diferentes países.....	21
Cuadro 5	Niveles de conteos de Organismos Coliformes (Log UFC/mL) en leche cruda de vaca.....	22
Cuadro 6	Clasificación de la leche cruda en base al conteo total de Bacterias Mesofílicas Aerobias.....	23
Cuadro 7	Niveles de Bacterias Mesofílicas Aerobias (Log UFC/mL) encontrados en leche cruda.....	24
Cuadro 8	Niveles de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) en leche cruda.....	25
Cuadro 9	Niveles de Mohos y Levaduras (UFC/mL) en leche cruda.....	27
Cuadro 10	Aislamientos de bacterias patógenas (%) en leche cruda.....	29
Cuadro 11	Enfermedades causadas por el consumo de leche cruda.....	32
Cuadro 12	Características de producción agrícola y pecuaria en los sitios de estudio.....	36
Cuadro 13	Composición fisicoquímica de la leche en explotaciones familiares de la microcuenca del Rio Zahuapan (Media± DE).....	51
Cuadro 14	Recuento de microorganismos indicadores (Log ₁₀ UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) y con un método de higienización (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.....	54

Cuadro 15	Recuento de microorganismos indicadores (Log UFC/mL) en leche por sitio de estudio en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan (Media±DE).....	55
Cuadro 16	Porcentaje de muestras positivas para microorganismos patógenos por fase.....	63

I. INTRODUCCIÓN

En México se producen 11.13 millones de litros de leche, que cubren 79% de la demanda nacional. La producción se genera a partir de cuatro sistemas, el especializado (51%), semi especializado (21%), doble propósito (18%) y sistemas de tipo familiar (10%) (Barrera y Sánchez, 2003). Este último, cuyo factor crítico ha sido su integración directa al mercado, involucra más de 75,000 unidades de producción (SAGARPA, 2010) ubicadas principalmente en el altiplano mexicano. Éstas se han caracterizado por su baja eficiencia productiva y económica (Abrego, 2011), además de no contar con instalaciones y condiciones apropiadas para el manejo adecuado e higiénico de la leche (Ortiz *et al.*, 2005).

Para los sistemas familiares, la calidad de la leche en términos de sus características físicas, composición química, carga bacteriana, contenido de adulterantes, ha sido poco valorada; sin embargo, existen normas nacionales como la NOM243-SSA1-2010 y la NMX-F-700-COFOCALEC-2012 e internacionales, que marcan parámetros estandarizados que debe cubrir para garantizar una leche ideal para su consumo o como materia prima para su transformación. Este requerimiento representa uno de los principales desafíos de estos sistemas familiares (Fuentes *et al.*, 2013) y posibilita una oportunidad para diferenciar el precio que recibe el productor, como lo han hecho en países desarrollados (Estados Unidos, Europa) y algunos en América Latina (Argentina y Colombia) (FAO, 2003).

En el estado de Tlaxcala el río Zahuapan cruza 14 municipios, beneficiando 5,853 has de riego, donde los principales cultivos son el maíz y forrajes de corte. Con ellos, se sostiene una microcuenca lechera de 4,959 unidades de producción que anualmente generan 34.12 millones de litros en explotaciones de tipo familiar (SIAP, 2011). La comercialización se realiza a través de intermediarios que acaparan la leche y la destinan básicamente a la elaboración de quesos frescos, mismos que se comercializan local y regionalmente. En esta microcuenca existen diferentes factores que influyen sobre la calidad de la leche, entre ellos, el uso de aguas residuales para la producción de forrajes y las deficientes prácticas de manejo en el proceso productivo, de ordeña y de transformación.

Considerando que son limitados los estudios que analizan la calidad de la leche producida en los sistemas familiares, surge el interés y la necesidad de conocer la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche que se produce en explotaciones familiares, ubicadas en esta microcuenca lechera. Con esa información, se pretende diseñar una estrategia participativa, para implementar acciones enfocadas a mejorar la eficiencia productiva y económica de esta ganadería, para lo cual se evalúa la leche producida bajo el manejo tradicional del productor y con un método de higienización en la ordeña.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Planteamiento del problema

La leche es uno de los alimentos nutricionalmente más completos y vital en las primeras etapas de vida de los mamíferos. En la nutrición humana es indispensable y recomendado por la FAO y la UNESCO para la nutrición, fundamentalmente de los infantes (Vásquez, 2010). Sus derivados, son considerados como parte de una dieta saludable y balanceada (Pereira, 2014). La calidad de la leche radica en el cumplimiento de requisitos que la hagan idónea para su uso en función de sus características físicas, químicas, sanitarias y nutricionales, relacionándose con la inocuidad, que condiciona a que carezca de adulterantes y que la contaminación física, química y biológica, se encuentre dentro de los parámetros establecidos por la legislación vigente (Ramírez, 1995).

En términos prácticos, una leche de calidad proviene del ordeño de vacas sanas y bien alimentadas; sin embargo, cuando no hay un manejo de producción y transformación apropiado, la leche se convierte en un excelente vehículo para la transmisión de enfermedades al hombre, tanto aquellas de carácter zoonótico como la brucelosis, tuberculosis, o las ocasionadas por microorganismos patógenos, entre ellos, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 (Reyes y Soltero, 2004; Claeys *et al.*, 2013); además de perder sus características tecnológicas de transformación, de homogeneidad y de conservación (Hurtaud, 2004).

Para los productores de la ganadería lechera familiar, la calidad es un aspecto de poco interés, en principio porque su objetivo es vender el mayor volumen posible cubriendo los parámetros mínimos que le exige el comprador (contenido de grasa y acidez); segundo, porque no recibe un pago adicional por este concepto y tercero, debido a que las normas establecidas no son obligatorias y no hay una regulación por parte de las autoridades competentes. Bajo este contexto, la presente investigación se plantea las siguientes preguntas de investigación:

- 1) ¿Cuáles son las características fisicoquímicas de la leche en las unidades de producción familiar de la microcuenca del río Zahuapan y su variación en diferentes sitios de muestreo?
- 2) ¿Cuál es la carga microbiológica de la leche bajo el manejo tradicional que realizan los productores e implementando una técnica de higienización en el proceso de ordeña y las diferencias entre distintos sitios de muestreo?
- 3) ¿Cuál es la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche en las unidades de producción con respecto a los indicadores que marcan las normas mexicanas?

2.2 Objetivo General

Determinar la calidad fisicoquímica y microbiológica de la leche de vaca en unidades de producción familiar, ubicadas en la microcuenca del río Zahuapan, bajo el manejo tradicional que realizan los productores e implantando una técnica de higienización.

2.3 Objetivos Particulares

- Determinar las características fisicoquímicas de la leche en términos de contenido de grasa, proteína, lactosa, minerales, sólidos no grasos y de su densidad, pH y adición de agua.
- Cuantificar la carga microbiológica de la leche bajo el manejo tradicional de los productores e implantando una técnica de higienización en la ordeña, determinando microorganismos indicadores de calidad en términos de coliformes totales, bacterias mesofílicas aerobias, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras y *E. coli*, y patógenos como *Salmonella* spp y *Listeria* spp.
- Comparar las características fisicoquímicas y microbiológicas de la leche producida en la microcuenca del río Zahuapan, con respecto a la normatividad vigente para leche cruda.

2.4 Hipótesis

- La calidad fisicoquímica de la leche producida en las unidades familiares de la microcuenca del río Zahuapan es homogénea y está dentro de los parámetros normales que expresa la normatividad vigente.
- La calidad microbiológica de la leche producida tradicionalmente en las unidades familiares en la microcuenca del río Zahuapan no cubre los parámetros establecidos por las normas vigentes.
- Implementando una técnica de higienización en el proceso de ordeño se reduce significativamente la carga microbiológica de la leche, logrando los límites permitidos por la norma.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Contexto de la leche en México

México es el 15vo productor de leche a nivel mundial, la cifra reportada por el SIAP para el 2014 fue de 11,130 millones de litros, que representa el 2% de la producción mundial. Esta actividad en el sector pecuario nacional, representa en términos monetarios el 18.98% de los \$356.2 millones que corresponden al sector pecuario y es considerada la tercera actividad de importancia económica, sólo después de la producción de carne bovina (25.53%) y de ave (25.05%) (SIAP, 2014); sin embargo, la producción es insuficiente para cubrir las demandas de la población, por lo que hace necesario la importación principalmente de leche descremada en polvo. El volumen importado en 2014 fue de 207,000 toneladas con un valor de 837 millones de dólares, que representó 9.8% de las importaciones globales a nivel mundial y clasifica al país como el primer importador de este producto (FAOSTAT, 2014).

En la Figura 1, se muestran las tendencias de la producción, consumo e importación de leche en el periodo 2005-2014 (SIAP, 2015). Se puede observar poca variabilidad en la producción, que registró un tasa de crecimiento promedio de 1.34% anual. El consumo tuvo una variabilidad más marcada y asociada a la importación, que para el periodo indicado estas variables tuvieron una tasa de crecimiento promedio de 0.98% y 4.04%, respectivamente. Un dato de interés obtenido con los datos graficados, es que la producción representó en promedio el 69.5% del consumo y el restante 30.5% fue importado, cuyo origen principal fue de Estados Unidos.

El consumo nacional per cápita de leche es del orden de 97 kg anuales, dato que resulta importante, puesto que se encuentra por debajo de la ingesta recomendada por la FAO, que es de 188 kg anuales y respecto al promedio de consumo en países desarrollados como Holanda, Estados Unidos de América y Nueva Zelanda, que oscila alrededor de 200 kg anuales (Secretaría de Economía, 2012).

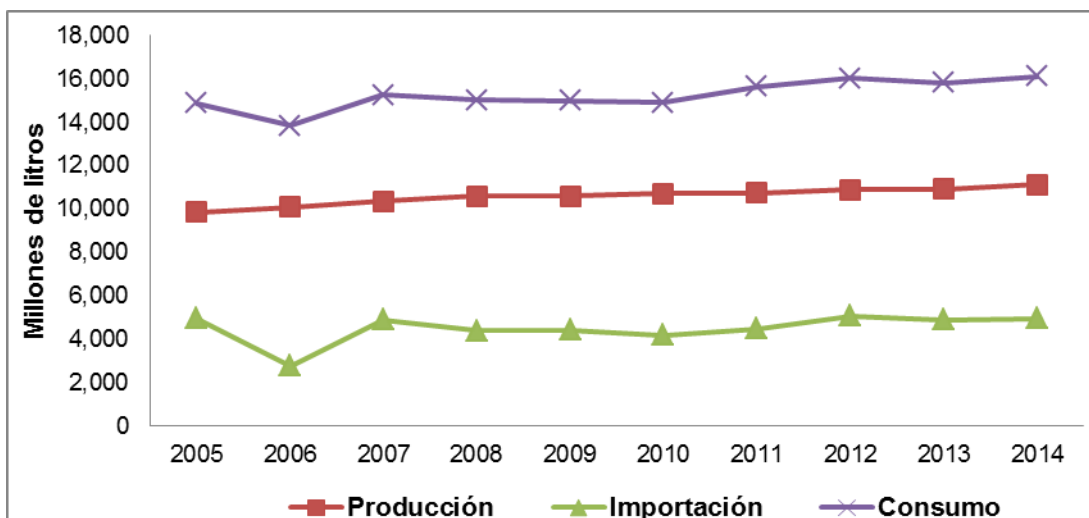


Figura 1. Producción, importación* y consumo de leche en México en los últimos diez años. * Conversión de millones de toneladas a millones de litros

Fuente: SIAP, SAGARPA, Administración General de Aduanas

Según la Coordinación General de Ganadería, la deficiencia en el autoabasto nacional de leche se debe en parte a la baja producción, problemática que surge como consecuencia de la inestabilidad de los precios de dicho fluido a nivel nacional e internacional, o aunado al incremento de los costos de insumos pecuarios, la falta de agua y efectos climáticos como la sequía, lo cual califica a dicha actividad como poco rentable (Citado por FIRA, 2015)

3.2. Limitaciones económicas de la producción de leche

En términos de tecnificación, los sistemas de producción de leche en México son muy heterogéneos. Coexisten aquellos altamente tecnificados (genética, biotecnología, computarizados) y un amplio desarrollo del mercado, con unidades de producción familiar caracterizadas por un desarrollo tecnológico desigual y con limitado acceso al mercado. Esta situación provoca que un amplio segmento del sector productivo, se enfrente a problemas de calidad de la leche y consecuentemente, a limitantes de comercialización y rentabilidad. Por otro lado, por ser un país importador de leche e insumos, la producción nacional sufre estragos de las variaciones de los precios internacionales, afectando de manera directa el precio que recibe el productor.

Una de las situaciones que desmotiva y limita el mejoramiento de la producción de leche en el país, es la disparidad en que se han incrementado el precio de los insumos con respecto al de la leche (SAGARPA, 2010). En la Figura 2, se muestra la tendencia de los precios de los insumos básicos destinados a la alimentación del ganado y el de la leche cruda en los últimos 5 años en la región centro del país (SIAP 2015). Se observa que la soya y canola, que representan las fuentes proteicas, han tenido un aumento más notorio en el precio, logrando una tasa de crecimiento promedio anual en el periodo indicado, de 1.8% y 3.3%, respectivamente; mientras que las fuentes energéticas como el maíz amarillo, salvado de trigo y sorgo molido, registraron una tasa de crecimiento más moderada, que porcentualmente fue de 1.3%, 2.1% y 0.9%. Con el precio especificado para la leche, la tasa de crecimiento promedio del periodo fue de 1.1%, que se sitúa significativamente por abajo de la tasa de crecimiento de las fuentes proteicas, manteniendo una relación más equiparable con la tasa de las fuentes energéticas, que aumentan en promedio 1.4%.

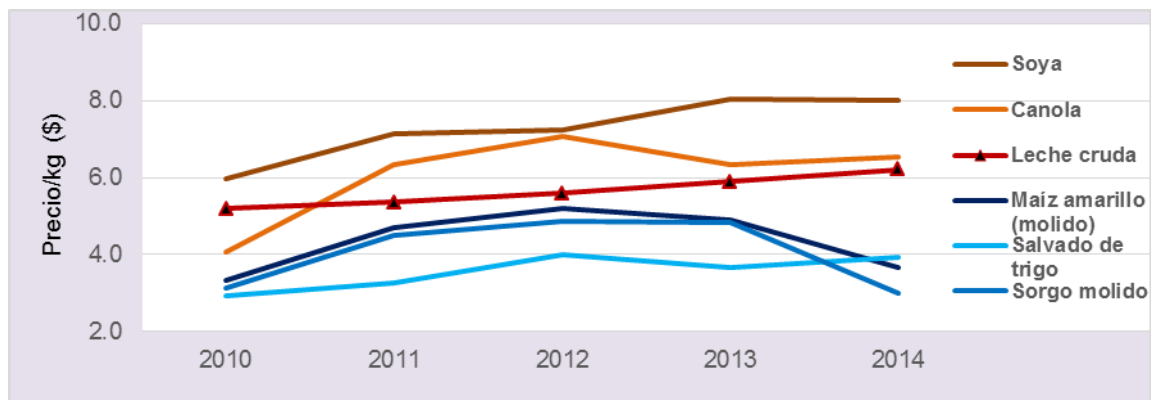


Figura 2. Tendencia de precios de Insumos alimenticios del ganado y de la leche cruda en la región centro del país en el periodo 2010-2015 (Elaboración propia con datos del SIAP, 2015)

Cuevas y colaboradores en el 2007, mencionan que existen seis eslabones que están íntimamente relacionados dentro de la actividad lechera, destacando principalmente los proveedores de insumos agropecuarios, los sistemas productivos, los centros de acopio, la industria de procesamiento (quesos y pasteurización), los distribuidores de los productos y finalmente el consumidor; sin embargo, a diferencia de los sistemas especializados que se caracterizan por estar integrados verticalmente, permitiéndoles

aprovechar el valor agregado que se genera por el acopio, transformación y comercialización de la leche y sus derivados (SAGARPA, 2010), la ganadería familiar se limita a la producción de leche “cruda o bronca”, que mayoritariamente es recolectada por acopiadores, para la elaboración de quesos destinados a mercados locales.

Al margen del proceso antes mencionado, el precio de la leche cruda es muy inferior y existe un amplio margen con respecto al de la leche pasteurizada (Figura 3). Aunque la tasa de crecimiento anual en la leche cruda en este periodo ha sido del 0.9% mayor que la tasa de crecimiento anual de la leche pasteurizada (0.69%) (SIAP, 2015), el valor de esta última es más del doble del precio de la leche cruda; por lo que las empresas dedicadas a la producción de leche pasteurizada, pudieran tener una mayor margen de beneficio con respecto a la producción obtenida por los distintos sistemas de producción, entre ellos la lechería familiar.

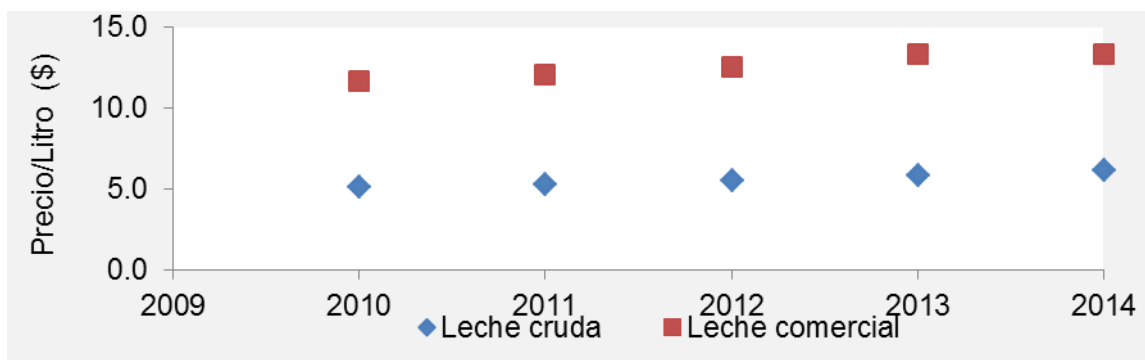


Figura 3. Tendencia de los precios de la leche cruda en la Región de Tlaxcala respecto a la leche pasteurizada (marca comercial) 2010-2015 (Elaboración propia con datos de SIAP, 2015).

Otro fenómeno que ocurre con el precio de la leche que se le paga al productor, es su alta variabilidad en las diferentes épocas del año y en las diferentes regiones; de modo que para el estado de Tlaxcala, el precio máximo pagado al productor fue de \$5.60 y disminuyó considerablemente en los meses de julio y agosto, cuando la producción se incrementa, encontrando que en el presente año estuvo pagándose hasta \$4.80 (Observación directa en campo).

3.3. La ganadería lechera familiar

La producción de leche en México se genera básicamente en cuatro tipos de sistemas: el especializado que aporta el 51%, el semiespecializado el 21%, de doble propósito con el 18% y el de tipo familiar o de pequeña escala, cuya participación es con el 10%. En términos de aportes por entidad, los estados que mayormente figuran dentro de la producción láctea son Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Guanajuato, Veracruz, Estado de México, Puebla e Hidalgo, que generan el 74.8% de la producción de leche (SIAP, 2013).

Los sistemas más frecuentes en los estados con mayor producción, son el especializado, semiespecializado y de doble propósito, en los que predominan ganado de razas Holstein, Jersey y Pardo Suizo (Osorio, 2010). Mientras que en las entidades de baja producción (con aporte del 25.2%), sobresalen los sistemas semiespecializado, de doble propósito y el sistema familiar o de traspatio, siendo éste último de gran importancia debido a que en él, se produce leche cruda que sirve como materia prima para la elaboración de productos lácteos en pequeñas industrias o en el hogar (INEGI, 2007). Además, la lechería familiar es considerada de gran influencia nacional por el número de explotaciones y porque son el sustento de una gran número de familias en el país, teniendo como objetivo, además de asegurar la alimentación básica, crear fondos económicos que permitan generar ingresos a las familias (Caicedo *et al.*, 2011).

Esta ganadería se encuentra asociada a una agricultura campesina de productores con limitados recursos y se ha caracterizado por su baja eficiencia productiva y económica. A partir de resultados encontrados en un trabajo de investigación realizado en explotaciones lecheras en el municipio de Nopalucan, Puebla, Abrego (2011) encontró que los hatos se componen en promedio de 7.9 cabezas, principalmente de la raza Holstein, de las cuales 2.5 fueron vacas en lactación con una producción promedio de 11.3 litros/día/vaca; por su parte Vargas *et al.* (2010) en el municipio de Tetlatlahuca, Tlaxcala, reportaron que el promedio de vacas en producción fue de 3.9 por explotación, con una producción promedio de 7.3 litros/vaca/día.

En términos económicos, Abrego (2011) encontró que con la venta de 19.8 litros de leche/día, de becerros y animales de desecho, existe una relación beneficio/costo

negativa; sin embargo, cuando se consideraron los ingresos extrafinca y los beneficios secundarios de la actividad (leche para autoconsumo, fuente de empleo, aprovechamiento de esquilmos), se explica la permanencia de la actividad a pesar de no ser rentable. La producción se destina a los mercados locales y regionales, conformando la base de queserías artesanales y pasteurizadoras; además, son sistemas poco susceptibles a las variaciones de los precios, lo que hace que la actividad sea más sostenible y funcionar como sistema amortiguador en épocas de crecimiento en el sector (Ortiz *et al.*, 2005).

Este sistema utiliza la mano de obra familiar, lo que constituye una importante fuente de empleo. Por otra parte, las actividades se llevan a cabo en pequeñas áreas de terreno, ubicadas cerca de la vivienda donde además se explotan otras especies pecuarias como los ovinos, caprinos, porcinos y aves de corral. El ganado bovino es conformado principalmente por la raza Holstein alimentado con forrajes de corte, esquilmos agrícolas, ensilados, y algunos concentrados, además de pastoreos en zonas aledañas (Osorio, 2010). El ordeño se realiza de forma manual y en algunos casos mecanizada con máquinas de una o dos plazas; sin embargo, no se cuenta con instalaciones y condiciones apropiadas para el manejo adecuado de la leche (Ortiz *et al.*, 2005).

3.4. Calidad fisicoquímica de la leche

3.4.1. Características fisicoquímicas

La leche es un sistema acuoso en el cual se encuentran disueltos nutrientes. La FAO alude que los de mayor importancia son las proteínas, lípidos o grasas y vitaminas, además de minerales (cenizas), propiedades que lo convierten en un producto de alto valor biológico que desempeña un papel fundamental en la alimentación humana (García *et al.*, 2005). Se entiende por calidad de leche aquel producto proveniente del ordeño de vacas sanas, bien alimentadas, con características sensoriales aceptables y que no posee sedimentos o sustancias extrañas. La calidad se divide en calidad fisicoquímica y calidad higiénico-sanitaria (Caravaca, 2003).

Físicamente la leche se describe como un líquido ligeramente dulce y de color opalescente a blanco. Los constituyentes químicos disueltos o en suspensión le

confieren ciertas propiedades como su densidad, viscosidad, tensión superficial, índice de refracción y el punto crioscópico, por su parte, los iones o electrones determinan otras propiedades como el pH y la conductividad (Maza y Legorreta, 2011).

En términos de su composición química, Pereira (2014) en su revisión bibliográfica menciona que la leche de vaca está compuesta en un 87% de agua, 4 a 5% de lactosa, 3% de proteína, 3 a 4% de grasa, 0.8% de minerales y 0.1% de vitaminas, cuyas concentraciones medias van a depender en gran medida de factores propios del animal como su raza, edad, etapa de lactación, salud, y de factores externos en los que destacan la dieta ofrecida y factores ambientales, (Rodríguez y Magro, 2008).

En la leche de vaca los valores nutricionales son menores en relación a las otras especies; sin embargo, las características sensoriales así como su disponibilidad permite que sea utilizada como alimento en cualquier etapa de desarrollo humano y materia prima para la elaboración de diversos productos alimenticios (Moza y Legarreta, 2008). En el Cuadro 1, se realiza una comparación entre los componentes de la leche de algunos mamíferos y se observa que el contenido de proteína y lactosa es mayor en la humana, mientras que leche de oveja tiene un mayor porcentaje de grasa y cenizas.

Cuadro 1. Composición media de leche de distintas especies expresada en %.

<u>Especie</u>	<u>Proteína</u>	<u>Grasa</u>	<u>Lactosa</u>	<u>Cenizas</u>
Humana	1.0	3.8	7.0	0.2
Vaca	3.4	3.7	4.8	0.7
Cabra	2.9	4.5	4.1	0.8
Oveja	5.3	7.4	4.8	1.0

Adaptación de Hernández, 2010

En la cadena productiva existen elementos que son puntos clave para garantizar la calidad de la leche, resaltando el sistema productivo, que engloba aquellos elementos que están ligados al ganado y su manejo tales como los factores genéticos, fisiológicos, alimenticios, y factores relativos al ambiente (LICONSA, 2004); por otra parte, el control sanitario y tecnificación (relacionado al manejo durante el proceso de pre ordeño,

ordeño y post ordeño). Además existen factores críticos a controlar en los centros de acopio y de distribución del producto, donde en función del manejo y las condiciones de almacenamiento, puede mermar o conservar la calidad final.

3.4.2. Calidad fisicoquímica de la leche en base a la norma NMX- F-700-COFOCALEC-2012

En el Cuadro 2 se reportan las especificaciones fisicoquímicas que debe contener una leche cruda de calidad, de acuerdo a la norma NMX-F-700-COFOCALEC-2012. En él se especifican clasificaciones propuestas en función del contenido de grasa y de proteína; por otra parte, la misma norma hace otras especificaciones de tipo sanitario para la leche cruda, donde define ciertos parámetros físicos, químicos y microbiológicos; algunos de ellos permiten darle una clasificación dependiendo del contenido tanto de grasa como de proteína.

Cuadro 2. Especificaciones fisicoquímicas para leche cruda de vaca

Parámetro	Especificación	Clasificación
Densidad a15°C g/mL)	1.0295 Mín.	
Grasa butírica (%)	≥3.2	Clase A
	3.1 Mín.	Clase B
	3.0 Mín.	Clase C
Proteínas Totales (%)	≥ 3.1	Clase A
	3.0 a 3.09	Clase B
	2.8 a 2.99	Clase C
Lactosa	4.3 a 5.0	
Solidos no Grasos	8.3 Mín.	

Mín.=mínimo. Fuente. NMX- F-700-COFOCALEC

Existen investigaciones que se han realizado para determinar composición química de la leche, encontrándose distintos valores que permiten identificar que el contenido es variable (Cuadro 3); sin embargo, los valores de densidad son semejantes en México, a excepción de la cifra obtenida por *Álvarez et al.* (2012) que presenta un valor menor. En el contenido de grasa los valores son parecidos, así como de lactosa (*Álvarez et al.*,

2011; *Bernal et al.*, 2007). El porcentaje de proteína es diferente en los tres países en los que se determinó, siendo Colombia quien presentó el valor más alto (*Calderón et al.*, 2006), asociado principalmente con el tipo de dieta, ya que este así como los parámetros anteriores, dependen de manera importante en dicho factor (*Pérez*, 2011).

Cuadro 3. Parámetros fisicoquímicos encontrados en leche cruda de vaca (%)

Autor	País	N	Densidad (g/mL)	Grasa	Lactosa	Proteína	SNG	pH
<i>Álvarez et al.</i> , (2012)	México	30	1.029	3.57	4.73	3.3	8.52	6.54
<i>Briñez et al.</i> , (2008)	Venezuela	926	-	-	-	3.66	-	6.72
<i>Calderón et al.</i> , (2006)	Colombia	2250	1.031	3.55	5.5	3.12	8.59	-
<i>Mariscal et al.</i> , (2013)	Bolivia	14	-	-	-	-	-	6.53
<i>Bernal et al.</i> , (2007)	México	360	1.0307	-	4.55	-	-	6.63
<i>Cervantes et al.</i> , (2013)	México	194	-	3.52	-	-	8.9	-
<i>Fuentes et al.</i> , (2013)	México	n. d	1.032	-	-	-	-	6.69

N= Número de muestras. SNG= Sólidos no grasos. n. d= no disponible.

Grasa

La grasa se encuentra conformada por triglicéridos o ácidos grasos (98%) dentro de los cuales se destaca los saturados (62%) principalmente ácidos capríco y butírico, siendo este último el de mayor importancia debido a que le brinda el sabor característico a los derivados lácteos como la crema y mantequilla. En menor cantidad se encuentran los ácidos grasos no saturados (33%) como el oleico, linoleico, linolénico (*Alais y Lacasa* 1985; *Revilla*, 1982).

Dentro de las características de dicha propiedad se encuentra el color, que es blanco no obstante, al estar presente los carotenos dentro del fluido, le proporcionan el color amarillo característico (*Revilla*, 1982); cabe resaltar que dicha propiedad se ve afectada por factores como la época del año (siendo otoño e invierno épocas con mayores

contenidos), edad, alimentación (relación forraje-concentrado), el estado de salud (en mastitis disminuye), entre otros (Pérez, 2011). La grasa es uno de los componentes que impactan en los rendimientos de los derivados lácteos, por lo que suele ser importante dentro de la comercialización, siendo éste un valor asociado a la calidad (Aguhob y Axtell, 1998).

Proteínas

Según la Asociación Española de Pediatría (2009), la leche de vaca contiene más de 40 proteínas (32 g/L), dentro de ellas se encuentra la caseína con mayor proporción (70-80%), así como lactoalbúminas, entre otras, que tienen gran importancia ya que proveen de aminoácidos esenciales que influyen en funciones específicas del cuerpo humano (Hernández, 2010), además al encontrarse en mayor cantidad (80%), son importantes dentro de la industria alimentaria (Valero *et al.*, 2012). Existen diferentes aminoácidos que forman las estructuras proteicas dentro de los que encontramos al ácido glutámico (23.9%), prolina (11.3%), leucina (10%), lisina (7.9%), ácido aspártico (7.4%) y valina (7%) entre otros que son necesarias para diversas reacciones químicas dentro de las estructuras vivas (Revilla, 1982).

Lactosa

Es un carbohidrato común de la leche que representa el 5% de los sólidos, es el componente mayoritario de la materia seca y es el responsable de brindar el sabor dulce a dicho alimento (Hernández, 2010). La variabilidad del contenido de lactosa depende de distintos factores y va aumentando gradualmente en el transcurso de la lactación. La lactosa es una propiedad nutricional de la leche, considerada como una fuente importante de energía alimentaria (FAO, 2013); sin embargo, por el contenido alto en carbohidratos, convierte a dicho alimento en un excelente medio para el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias que influyen en su calidad higiénica.

Sólidos no grasos

La cantidad de los sólidos no grasos (SNG) está determinado por la cantidad de proteínas, carbohidratos y cenizas o minerales (Hernández *et al.*, 2003), son denominados también sólidos del suero de la leche (Revilla, 1982). Esta variable está íntimamente ligada a la densidad de la leche y es una propiedad utilizada como indicador de la adulteración de dicho fluido. Existe una variación del contenido de dicho componente en la leche que va desde 6.85% a 11.7%, siendo el valor promedio de 9.2% (Revilla, 1982). Está íntimamente ligado a los contenidos de proteína, y lactosa, que al tener una mayor concentración de ellos, también impacta al contenido de SNG ya que éste será mayor (Pérez, 2011).

Vitaminas

La leche es considerada como una importante fuente de vitaminas, tanto hidrosolubles como liposolubles (Hernández, 2010), dentro de las cuales encontramos a las vitaminas A, D, E y del grupo B, folatos, y vitamina C (Caravaca *et al.*, 2003); el contenido de estas y de la grasa depende de la alimentación y la salud animal, la raza, el estado de lactación entre otros (Villegas, 2003); en el caso de las vitaminas estas sustancias suelen ser sensibles a los tratamientos térmicos por lo que en ocasiones es necesario adicionarlas, una vez finalizado el proceso (Hernández, 2010).

Minerales

Las sales minerales están formadas por los metales que son ingeridos por el animal a través de la alimentación, y se encuentran distribuidas en el fluido en forma de suspensión coloidal o como sales solubles (Aranceta y Serra, 2005). Estos se agrupan en macroelementos y oligoelementos y esto va a depender de la cantidad en la que se encuentran presentes en la leche. En mayor proporción se encuentran el calcio, fósforo, magnesio, potasio, cloro, azufre, citratos, carbonatos y silicatos; y dentro de los microelementos se ubica al hierro, aluminio, cobre, zinc, manganeso, cobalto, yodo, níquel, boro, plomo, arsénico, cromo, selenio, molibdeno, flúor y bromo (Revilla, 1982).

El contenido aceptable de minerales en la leche es de 7 a 8.5 gramos por litro (Alais y Lacasa, 1985).

Densidad

La densidad de la leche es una propiedad física que está dada por factores relacionados con la concentración de elementos disueltos y en suspensión, y la cantidad de grasa contenida en ella (Alais y Lacasa, 1985). Esta propiedad se ve afectada por la temperatura, y es de gran utilidad para identificar algún tipo de adulteración, principalmente por la adición de agua, o bien para identificar el retiro de algún componente, específicamente la grasa (Aguhob y Axtell, 1998). Además, dicha característica guarda relación con ciertos componentes químicos (Villegas, 2003) por ejemplo:

- Si el porcentaje de los sólidos totales aumentan, la densidad también.
- Si la cantidad de grasa aumenta, la densidad disminuye, y
- A una temperatura menor la densidad se incrementa y viceversa.

pH

El pH representa la acidez actual, es una propiedad química dada por la concentración de H^+ libres, cuyo valor oscila alrededor de 6.5 - 6.8 en leche cruda, este valor se debe principalmente a la presencia de caseínas, aniones fosfóricos y cítricos, dicho factor depende en gran parte de la temperatura (20°C) (Alais y Lacasa, 1985). Dicha variable suele ser inestable en las distintas etapas de lactación; en el calostro (inicio de la lactancia) se concentran mayor contenido de proteínas por lo que es menor el pH (6.0), mientras que al final de la etapa de lactación se encuentra un valor de pH más alto (7.4) (Negri, 2005).

Acidez

La acidez también está determinada por la concentración de caseínas, aniones fosfórico y ácido cítrico. Incluye la acidez actual debido a la cantidad de H⁺ presentes, así como la acidez potencial, determinada mediante la acidez titulable (Negri, 2005). Esta última se clasifica en tres tipos (Villegas, 2003):

- La acidez natural como producto de las proteínas
- La acidez desarrollada, esta es la suma de los productos de las reacciones tales como el ácido láctico, producto metabólico de las bacterias ácido lácticas al fermentar la glucosa y,
- La acidez total cuyo valor es la suma de las dos anteriores.

Es importante considerar que la acidez titulable puede disminuir en la medida que el periodo de lactación de la vaca avanza, o por algún proceso inflamatorio como la mastitis (Negri, 2005). Villegas en el 2003 menciona que la medición de estas propiedades permite apreciar el comportamiento de la leche cuando es sometida al calentamiento, además es de utilidad para identificar el progreso en el proceso de elaboración de derivados lácteos como la cuajada en el queso y es una herramienta crucial para aceptar o rechazar la leche para la fabricación de algún producto lácteo (Alais y Lacasa, 1985).

3.4.3. Factores que afectan la calidad fisicoquímica

Para obtener una leche que cubra los parámetros de calidad, se requiere un manejo adecuado en el ganado, ya que existe una diversidad de factores que influyen en el contenido fisicoquímico de la leche, que afectan su variabilidad, alterabilidad y complejidad. Son características propias de la leche que dependen de una serie de factores y cuando estas tres características se mantienen se puede considerar un fluido en equilibrio (Reyes, Molina y Coca, 2010). Existen diferentes factores que pueden influir directamente en la calidad fisicoquímica de la leche (CANILEC, 2011); en El Libro Blanco de la Leche se citan los siguientes (Maza y Legorreta, 2011):

La genética es un factor importante que influye en los componentes. La raza Jersey tiene un mayor contenido tanto de grasa como proteína (4.64% y 3.73% respectivamente) en comparación con las otras razas. El nivel de producción es otro elemento importante, los animales de la raza Holstein tienen una mayor producción a diferencia de otras estirpes; la etapa de lactancia y la edad también tienen gran impacto, ya que se ha comprobado que algunos componentes como la grasa y la proteína son mayores en el inicio (calostro) y disminuyen en la etapa final.

El estado de salud del animal es otra de las causas por las que se afectan los contenidos; animales que cursan con mastitis tienden a presentar una disminución en el contenido de grasa, esto se debe a la permeabilidad.

La alimentación y la época del año son factores que de igual manera están relacionadas con los contenidos, en otoño e invierno suelen ser los periodos en los que los contenidos aumentan y esto se debe al tipo de alimento disponible y la alimentación del ganado; la relación forraje concentrado (40:60), se obtienen mayores contenidos de grasa y proteína.

3.5 Calidad higiénico-sanitaria de leche

3.5.1. Criterios microbiológicos

La leche es una solución neutra rica en glúcidos, prótidos, lípidos y sales, además de un alto contenido de factores de crecimiento (vitaminas) (NOM 700- COFOCALEC-2012), lo que constituye un medio para el crecimiento bacteriano. Esta característica se rige por distintos elementos que posee la leche, entre ellos destaca la disponibilidad de los nutrientes que sirven como alimento para favorecer el crecimiento de microorganismos, influyendo de esa forma en la calidad de la leche (Alais y Lacasa, 1985).

La calidad higiénica en la leche es una herramienta que permite conocer el grado de contaminación por la presencia de agentes extraños a su naturaleza (Mamani, 2010); se clasifica en química, física y microbiológica; la calidad higiénica física se debe a

materia extraña como residuos de madera, materia fecal, entre otros (Codex Alimentarius, 2004). En la calidad higiénica química se incluye a todos aquellos compuestos químicos (antibióticos, hormonas, detergentes) cuya existencia se debe a la exposición de los animales a estos agentes y la calidad higiénica microbiológica se refiere a los microorganismos presentes dentro de este líquido, cuyo origen pudo ser de forma directa (del animal hacia el fluido) o indirecto (por contacto con superficies o manipuladores contaminados durante el proceso de ordeño) (Rodríguez y Magro, 2008); esta última es evaluada mediante la determinación de la carga de microorganismos presentes en el producto, dentro de las que destaca el grupo de los microorganismos indicadores como las Bacterias Mesofílicas Aerobias (BMA), Organismos coliformes totales (OCT), Mohos y Levaduras, así como la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*) (Bravo, 2004), cuya presencia pudiera significar un riesgo potencial, por la producción de algunos metabolitos (toxinas) (Olivas y Alarcón, 2012). Otro grupo importante es el de los microorganismos patógenos, estos pudieran estar relacionados con la salud del animal, aunque su llegada a la leche también se puede deber a factores de manejo y/o exposición. Ambos grupos son de importancia mundial, especificaciones microbiológicas consideradas para la aceptación o rechazo de un producto.

En el Cuadro 4 se enlistan algunas de estas especificaciones y los valores permitidos en cada país, se observa que los valores varían considerablemente en algunos criterios, como en el conteo de OCT, BMA y *Staphylococcus aureus*, en algunos otros no existe un valor establecido debido a que no implican mayor problema, tal es el caso de los mohos, levaduras y *E. coli*. Sin embargo, la presencia de bacterias patógenas como *Salmonella* spp y *Listeria* spp deben estar totalmente controladas ya que no debe existir la presencia de éstas en la leche, por lo que los tres países coinciden en tal rango de aceptación, esto es debido a que la presencia puede significar un alto riesgo para la población convirtiéndose en causantes de brotes, lo que representa grandes retos para instancias de salud pública de las naciones no solo para diagnósticos, sino para el control y tratamiento de dichas enfermedades, que se traduce en un importante gasto de salud pública (15.6 mil millones de dólares) (WHO, 2014).

Cuadro 4. Criterios microbiológicos para leche cruda establecidos en diferentes países

Criterio microbiológico	México*	Estados Unidos**	Unión Europea***
Organismos Coliformes Totales UFC/mL	≤ 20 (1.3) ¹	<10 (1) ¹	<100 (2) ¹
Bacterias Mesofílicas Aerobias UFC/mL	<100,000 (5) ¹	30,000 (4.47) ₁	<20,000 (4.3) ₁
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/mL	≤ 10 (1) ¹	NR	<500 (2.6) ¹
Mohos y Levaduras UFC/mL	≤ 500 (2.6) ¹	NR	NR
<i>Escherichia coli</i> NMP/mL	≤ 3	NR	NR
<i>Salmonella</i> spp (Ausente en 25 mL)	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria</i> spp (Ausente en 25mL)	Ausente	Ausente	Ausente

¹(Log UFC) *NOM-243-SSA-2010; **FDA, 2009; ***NMC Annual Meeting Proceedings, 2004.

NR= No reporta. UFC= Unidades formadoras de Colonias. NMP= Número Más Probable.

3.5.2. Microorganismos indicadores

a) Organismos Coliformes Totales

Los organismos coliformes totales son un grupo de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, cuyo hábitat es el ambiente y cuyo tropismo es principalmente el intestino de especies de sangre caliente. Las condiciones necesarias para que se desarrollen son una fuente de carbono, en el caso de la leche la lactosa. Crecen en presencia de oxígeno y producen gas, la temperatura óptima de crecimiento fluctúa entre los $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Bravo, 2004). La presencia de estas bacterias en los alimentos indica deficientes o nulas prácticas de limpieza, en el caso de la leche es indicador de las deficiencias en los procesos de obtención de la leche, específicamente en el ordeño y/o el almacenaje. Su importancia en los alimentos es que dentro de este grupo, se incluyen algunas bacterias patógenas que pueden generar algún tipo de daño al consumidor.

Algunos estudios realizados en distintos países (Cuadro 5) han encontrado valores que sobrepasan los límites establecidos ($<2 \text{ Log}_{10}$ UFC/mL), tanto por las normas nacionales como las internacionales. Se observa que en Canadá y Bolivia se encontraron rangos que cumplen con los límites, sin embargo el resto de los autores reportan cifras que superan dicho valor. Esto es debido a que por una parte, las

condiciones en las que se obtuvo la leche no fue la adecuada (limpieza tanto en el ordeño como en instrumentos) y por otro lado, el control del almacenaje del fluido no fue el apropiado. En México se encontró el valor más alto en este parámetro (8.17 Log₁₀ UFC/mL) de muestras provenientes de tanques de almacenamiento (Fuentes *et al.*, 2013) en donde la leche, a pesar de haber sido obtenida bajo condiciones que aseguraran su aceptabilidad higiénica, la limpieza de los tanques así como el ambiente en el que se almacena resultó ser un factor fundamental en la preservación de la calidad, reduciendo de esta forma la vida de anaquel como materia prima.

Cuadro 5. Niveles de conteos de Organismos Coliformes (Log UFC/mL) en leche cruda de vaca

Autor	País	N	Media
Elmoslemany <i>et al.</i> (2009)	Canadá	235	1.32
Mariscal <i>et al.</i> (2013)	Bolivia	14	1.89
Fulya (2011)	Turquía	100	4.3
Godic y Golc (2008)	Eslovenia	203	2.1
Calderón <i>et al.</i> (2006)	Colombia	7067	3.6
Ibitasam <i>et al.</i> (2007)	Sudán	120	5.89
Asmahan (2010)	Sudán	8	4.73
Mhone <i>et al.</i> (2011)	Zimbabue	120	6.4
Fuentes <i>et al.</i> (2013)	México	7	8.17

UFC= Unidades Formadoras de Colonias; N= Tamaño de muestra.

b) Bacterias Mesofílicas Aerobias

Son microorganismos que crecen a temperaturas de entre 20 y 45°C y requieren de la presencia de oxígeno; dentro de este grupo de bacterias se encuentran diferentes formas y agrupaciones tales como: bacterias lipolíticas, proteolíticas, sacarolíticas y patógenas (Bravo, 2004). El conteo de BMA es un indicador de higiene y ha sido estudiado para evaluar la calidad microbiológica, su presencia en los alimentos indica:

- a) Posible contenido de microorganismos patógenos
- b) Baja vida en anaquel

c) Condiciones higiénicas deficientes

Este grupo se encuentra dentro de las especificaciones sanitarias para la leche cruda. El Cuadro 6 detalla los conteos establecidos en la NMX- F-700- COFOCALEC- 2012 y la clasificación que realiza de acuerdo a éste parámetro. En el caso de México es un criterio que los productores deben cumplir con las acopiadoras de leche (LICONSA) para evitar ser penalizados; sin embargo en algunos países de América Latina como Argentina y Colombia, es un parámetro que permite establecer los pagos por calidad de leche establecidos por los Ministerios de Agricultura y Desarrollo Rural, de ambos países.

Cuadro 6. Clasificación de la leche cruda en base al conteo total de Bacterias Mesofílicas Aerobias

Especificación	Cuenta Total de Bacterias Mesofílicas Aerobias (UFC/mL)
Clase 1	$\leq 100,000$
Clase 2	101.000 a 300.000
Clase 3	301.000 a 599.000
Clase 4	600.000 a 1.200.000

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

Fuente: NMX-700-F-COFOCALEC-2012

En el Cuadro 7 se enlistan algunos autores que realizaron estudios en leche cruda, se aprecia que algunos de ellos superan conteos de 1,000,000 UFC/mL ($6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$) encontrándose los valores más altos en Zimbabue, Turquía, Sudán, México y Polonia, cifras que van desde $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ a $8.13 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$; dicha carga bacteriana se debe a factores ambientales, de manejo y almacenaje, dichos factores en todo el proceso pre, ordeño y post ordeño así como deficientes hábitos de higiene en los operarios; por lo que es importante considerar las condiciones de temperatura que impidan la multiplicación de microorganismos (Fuentes *et al.*, 2013).

Cuadro 7. Niveles de Bacterias Mesofílicas Aerobias (Log UFC/mL) encontrados en leche cruda

Autor	País	N	Media
Godic y Golc (2008)	Eslovenia	203	4.5
Mhone <i>et al.</i> (2011)	Zimbabue	120	6.4
Kalmus <i>et al.</i> (2015)	Estonia	14	4.4
Fulya (2011)	Turquía	100	6.5
Álvarez <i>et al.</i> (2012)	México	30	4.1
Asmahan (2010)	Sudan	8	6.9
Calderón <i>et al.</i> (2006)	Colombia	7067	6.0
Mariscal <i>et al.</i> (2013)	Bolivia	14	5.0
Stulova <i>et al.</i> (2010)	Estonia	970	4.4
Tremonte <i>et al.</i> (2014)	Italia	30	4.1
Millogo <i>et al.</i> (2010)	África	27	4.52
Elmosleman <i>et al.</i> (2009)	Canadá	235	4.1
Fuentes <i>et al.</i> (2013)	México	7	8.13
Pys Lukasik, <i>et al.</i> (2015)	Polonia	50	6.51
Ibtisam <i>et al.</i> (2007)	Sudán	120	7.87

UFC=Unidades Formadoras de Colonias; N=Tamaño de muestra.

c) *Staphylococcus aureus*

Es un microorganismo anaerobio facultativo en forma de coco Gram positivo que se agrupa en forma de racimo de uvas; es no esporulado, las diferencias con las otras especies es la presencia de enzimas como coagulasa y desoxirribonucleasa, su temperatura de crecimiento es entre 4 a 48°C, siendo la óptima 37°C (Hernández, 2010). Su presencia en la leche tiene dos significados, por un lado demuestra el estado de salud en el que se encuentra el animal y de manera específica la ubre, por lo que es un indicador de mastitis y es una prueba asociada a conteo de células somáticas; por otro lado, también puede ser indicador de contaminación durante el proceso de ordeño. Tanto en la Unión Europea como en México se establecen límites máximos permitidos (Cuadro 4), siendo el límite más bajo el de la normatividad mexicana (<10 UFC/mL o <1 Log₁₀ UFC/mL). En México no se ha estudiado ampliamente la presencia de este microorganismo, no obstante en otros países se han hecho investigaciones cuyos valores son reportados en el Cuadro 8. Las cifras superan los límites establecidos tanto

para la Unión Europea como para México en el caso de hacer un comparativo (Asmahan, 2010; Pys Lukasik *et al.*, 2015; Ibtisam *et al.*, 2007 y Mhone *et al.*, 2011), sin embargo los valores no representan signo de alerta, por la cantidad en las que fue encontrado; la importancia de ésta bacteria radica en la capacidad de provocar toxiinfecciones en humanos, esto se debe a la producción de cinco toxinas altamente resistentes a tratamientos térmicos, por lo que al tener una cantidad por encima de 10^5 - 10^7 UFC ($>5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$) estos metabolitos se producen, convirtiéndose en un riesgo potencial para el consumidor (Salas, 2008).

Cuadro 8. Niveles de *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) en leche cruda

Autor	País	N	Media
Fulya (2011)	Turquía	100	2
Asmahan (2010)	Sudán	8	6.07
Godic y Golc (2008)	Eslovenia	203	1.9
Pys Lukasik, <i>et al.</i> (2015)	Polonia	50	4.03
Ibtisam <i>et al.</i> (2007)	Sudán	120	5.2
Mhone <i>et al.</i> (2011)	Zimbabue	120	5.4

UFC=Unidades Formadoras de Colonias; N=Tamaño de muestra

d) Mohos y Levaduras

Estos microorganismos representan un riesgo menor que las bacterias, pero generan problemas en la leche modificando sus características organolépticas (Orberá, 2004). Las levaduras son células voluminosas, esféricas u ovaladas principalmente del género *Candida*; éstos organismos producen gas y son los responsables de generar leche espumosa, fermentación de la lactosa y producción de alcohol (Alis y Lacasa, 1985p. 332). Los mohos por el contrario, son organismos filamentosos cuyo fin generalmente es de utilidad para la producción de derivados lácteos; sin embargo, la presencia inicial de estos microorganismos aunado a la carga bacteriana tiene influencia en el deterioro del alimento (Orberá 2004). No obstante en una leche cruda puede también indicar un riesgo debido a la producción de toxinas, principalmente por hongos del género *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Salas, 2008). Aunque las esporas presentes no son termorresistentes a la pasteurización, no someterla a ningún tratamiento térmico para su consumo o bien para la producción de derivados lácteos, convierte dicho alimento en

inseguro. Es necesario destacar que dentro de las especificaciones internacionales no existen límites permitidos, sin embargo en México se establece que el límite permisible es de <500 UFC/ mL (<2.6 Log₁₀ UFC/mL). En el Cuadro 9 se enlistan algunos autores que han estudiado la calidad de leche cruda, encontrando la presencia de mohos y levaduras, las cantidades más altas fueron encontradas por Asmahan, 2010 en Sudán (n=8) y Tremonte *et al.*, 2014 en Italia (n=30), en muestras principalmente de tanques de almacenamiento, donde factores como pH y temperaturas desempeñan un papel trascendente.

Cuadro 9. Niveles de Mohos y Levaduras (UFC/mL) en leche cruda

Autor	País	N	Media
Fulya (2011)	Turquía	100	3.94
Asmahan (2010)	Sudan	8	5.98
Godic y Golc (2008)	Eslovenia	203	2.3
Bille <i>et al.</i> (2009)	África	7	2
Tremonte <i>et al.</i> (2014)	Italia	30	6.5
Torkar y Vengust (2008)	Estonia	60	1.7

UFC=Unidades Formadoras de Colonias; N=Tamaño de muestra

e) *Escherichia coli*

Es una de las bacterias ampliamente distribuida en el ambiente que forma parte de la flora normal de los animales de sangre caliente, en los que se encuentra incluido el humano y cuyo hábitat es el intestino. Es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, aerobio facultativo (Romero, 2007). Esta bacteria puede llegar a la leche por malas prácticas de higiene y su presencia indica contaminación fecal. El microorganismo algunas veces se limita a colonizar mucosas intestinales, provocando algún tipo de infección de tipo urinario o simplemente enfermedades diarreicas. Sin embargo, su importancia radica en que existen distintas cepas patogénicas: las enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enteropatogénico (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC) (Hernández *et al.*, 2011); siendo estas últimas en su variedad O157 H7, la más importante debido a la producción de una verotóxina que conduce a la muerte celular, provocando daño renal denominado Síndrome Urémico

Hemolítico cuyo desenlace es la muerte. La dosis infectiva de dicho patógeno es de 10-100 UFC (Salas, 2008).

En un estudio realizado en Arabia Saudita, 33 de 40 muestras, resultaron positivas para éste microorganismo (Altahi y Hassan, 2009), siendo negativo para la variedad O157 H7 y mostrándose de esa forma que es muy común encontrarlo debido a deficientes prácticas de limpieza en el ordeño.

3.5.3. Microorganismos patógenos

Son microorganismos causantes de infecciones e intoxicaciones (Mataix, 2013). En este grupo encontramos a *Listeria* (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes*), *Salmonella* (*S. enteritidis* y *S. typhi*) entre otros (Lejeune y Rajala, 2009). Estos microorganismos indican un riesgo actual para el consumidor, por lo tanto no deben estar presentes en ningún alimento, debido a la patogenicidad de estos.

Listeria es un bacilo gram positivo no esporulado que tiene un efecto patogénico. Es considerado como zoonótico cuyos reservorios son los rumiantes y los seres humanos (Albarracín *et al.*, 2008). La capacidad infectiva de *Listeria* va a depender de factores como el tipo de alimento, la virulencia de la cepa y la vulnerabilidad del consumidor (FAO/OMS, 2004), causando la enfermedad de Listeriosis. Algunos casos son asociados principalmente a *Listeria monocytogenes*, por tal motivo la han considerado como una enfermedad de alto impacto debido a que implica altos costos en los tratamientos para erradicarla; dicho padecimiento es caracterizado por la presencia de cuadros de meningitis, encefalitis y septicemias, cuyo índice de mortalidad es del 20% de los casos (Churchill *et al.*, 2006). La presencia de este microorganismo en la leche puede ser debido a la contaminación durante la ordeña o bien pudo ser agente causal de enfermedad en el animal y poder ser excretado en la leche.

Salmonella spp pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, bacilos gram negativos, no poseen capsula, tiene flagelos fimbrias y pilis características que permiten la adherencia; pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, sobreviven en condiciones adversas como la refrigeración, congelación y tratamientos térmicos. El hábitat de este género es el ambiente por lo tanto, es muy fácil que llegue a alimentos si no se

consideran medidas pertinentes durante su obtención. Las especies de éste género tienen preferencia por el tracto digestivo; sin embargo algunas de ellas se diseminan hacia el torrente sanguíneo (Romero, 2007). Dentro de las principales especies patógenas se encuentra *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* que son las responsables de infecciones en los humanos debidas al consumo de alimentos contaminados como la leche entre otros. Algunas enfermedades producidas por éste género son de gran importancia de salud pública (Lejeune y Rajala, 2009). Algunas veces tienden a manifestarse como brotes en lugares de confinación, lo que despierta expectativas de mantener un control sanitario de todo aquello que se ingiere (Hernández *et al.*, 2011).

A pesar de que estas bacterias no deben estar presentes en los alimentos, se han aislado de leche cruda tal como lo indica el Cuadro 10, debido a que estas bacterias son ampliamente encontradas en el ambiente. Jamali *et al.*, (2013) y Kalmus *et al.*, (2015), encontraron 54 (22.5%) y 4 (28.5%) muestras positivas para *Listeria* spp, mientras que Bianchi *et al.*, (2013), encontraron 2 (0.32%) muestras positivas para *Salmonella* spp, los datos anteriores demuestran que es muy común poder encontrar a dichas bacterias cuando no se consideran las condiciones necesarias para evitar ser contaminadas.

Cuadro 10. Aislamientos de bacterias patógenas (%) en leche cruda

Autor	País	N	<i>Salmonella</i> spp	<i>Listeria</i> spp
Amico y Donnelly. (2010)	E.U.A	12	Ausente	Ausente
Kalmus <i>et al.</i> (2015)	Estonia	14	Ausente	4 (28.5%)
Camacho <i>et al.</i> (2007)	Colombia	200		6(3%)
Hill <i>et al.</i> (2012)	Nueva Zelanda	297	Ausente	2(0.68%)
Jamali <i>et al.</i> (2013)	Irán	240		54(22.5%)
Pys Lukasik <i>et al.</i> (2015)	Polonia	50	Ausente	
Bianchi <i>et al.</i> (2013)	Italia	618	2(0.32%)	10(1.6%)

N=Tamaño de muestra

3.5.4. Factores que afectan la calidad microbiológica de la leche

Pinzón en el 2001, menciona que los microorganismos pueden alcanzar la leche por diferentes vías, la mamaria ascendente en donde las bacterias se adhieren a la piel de la ubre infectando y posterior al ordeño entran a través del esfínter del pezón (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, entre otros), y la vía descendente o hematológica en donde los microorganismos infectan al animal causando enfermedades sistémicas, estos generalmente tiene la propiedad de movilizarse por la sangre y a través de los capilares mamaros, ser excretados en la leche (*Salmonella spp*, *Brucella spp*, *Listeria monocytogenes*).

Otro medio por el cual se puede dar la contaminación es mediante el contacto con superficies o utensilios contaminados, así como el contacto directo con los factores ambientales (Figura 4). Por lo tanto, las condiciones de higiene y sanidad en las explotaciones lecheras, tienen un efecto importante en la calidad microbiológica de la leche, cuanto mayores sean los cuidados aplicados a la obtención de la leche y la salud de los animales productores, así como corrales libres de estiércol y lodo, salas de ordeño limpias, equipo de ordeño funcionando de manera adecuada y una rutina de ordeño correcta, menores serán los contenidos microbianos en la misma (Reyes y Soltero, 2004).

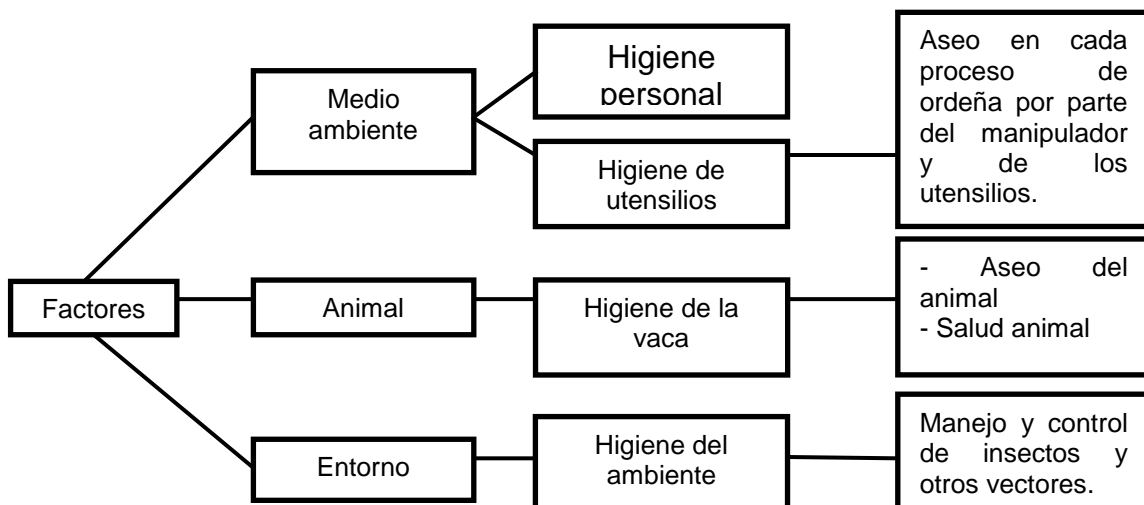


Figura 4. Factores que intervienen en la calidad microbiológica de la leche cruda
Fuente. Adaptación de Guifarro, 2005

3.6. Efectos de la calidad higiénica de leche sobre la salud humana

La presencia de bacterias patógenas en leche cruda, aun a niveles bajos, pone de relieve la necesidad de realizar procesos de higienización, como por ejemplo, seguir la correcta pasteurización u otra técnica destructiva equivalente, a ser practicada de forma rutinaria para asegurar la elaboración de productos lácteos confiables para el consumo, de lo contrario, sería un factor potencial causante de enfermedades en los consumidores (Hill *et al.*, 2012), denominadas Enfermedades Transmitidas por alimentos (ETA's). La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que las ETA's son un problema de salud pública a nivel mundial. La FDA (2014) define a esas enfermedades como afecciones a la salud, originada por el consumo de alimentos y agua contaminados, a su vez enlista algunas de las enfermedades que son causadas por el consumo específicamente de leche y derivados lácteos sin tratamiento térmico (Cuadro 11), dichos padecimientos van a depender de la dosis y de factores asociados al consumidor como el estado de salud, edad, entre otros. La OMS estimó que en el 2008 se presentaron al menos 192 millones de casos de ETAS con 1.8 millones de muertes (World Health Organization, 2008).

En el Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales registradas por la Secretaria de Salud (2012), estima que se producen dos mil millones de casos de diarrea en todo el mundo y es muy frecuente en países en desarrollo. En México, un estudio gubernamental realizado en 2003, reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales. Este tipo de infecciones son consideradas un problema de salud pública ya que afecta a personas de cualquier edad y condición social, sin embargo los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos. Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*) (Hernández, 2011). En Tlaxcala y Puebla las tasas de mortalidad por enfermedades diarreicas agudas son de 8.29 y 9.6% respectivamente en el 2008 (INEGI, 2008); dichas enfermedades son causadas principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados entre ellos la leche.

Cuadro 11. Enfermedades causadas por el consumo de leche cruda

Enfermedad	Agente etiológico	Dosis mínima Infecciosa*	Sintomatología**
Brucelosis	<i>Brucella melitensis</i> , <i>B. abortus</i> y <i>B. suis</i>	10- 100 células	Síntomas seudogripales leves, dolor abdominal, de espalda, escalofrío, sudoración excesiva, fatiga, fiebre, dolor de cabeza y articular, inapetencia, debilidad, pérdida de peso.
Carbunco	<i>Bacillus anthracis</i>	8000 esporas	Dolor abdominal, diarrea con o sin sangre, fiebre, úlceras bucales, náuseas y vómitos.
Shigelosis	<i>Shigella spp</i>	10-100 células	Dolor abdominal agudo (súbito) o calambres, fiebre aguda (súbita), sangre o moco en las heces, dolor rectal con cólico (tenesmo), vómitos y náuseas.
Fiebre Tifoidea y paratifoidea	<i>Salmonella typhi</i> y <i>Salmonella paratyphi</i>	15-20 células	Fiebre y dolor abdominal
Gastroenteritis enterotóxica estafilocócica	<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxina)	1.5 mg	Diarrea, dolor abdominal, vómitos, dolor de cabeza, fiebre y escalofríos
Gastroenteritis con evolución a SUH	<i>E. coli</i> O157 H7	2 células	Trastornos gastrointestinales
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	100 células	Fiebre y escalofríos, dolor de cabeza, malestar estomacal y vómitos. Abortos en mujeres embarazadas, cuadros que evolucionan y pueden causar meningitis.

Fuente: *Salas, 2008 y **MedlinePlus, 2011

3.7. Pago por calidad de la leche

Es un sistema de pago que contempla los principales atributos que determinan la calidad de la leche, en el cual se considera la composición química, la calidad sanitaria y la higiénica. La finalidad de éste sistema es mejorar la producción de leche así como los productos derivados de ésta, con el objetivo de brindar al consumidor productos lácteos inocuos. Sin duda uno de los temas que genera controversia es la obtención de leche cruda inocua. En América Latina los países que cuentan con éste tipo de bonificación son Argentina y Colombia, el Ministerio de agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo en Colombia establecen dicho pago en base al contenido y variación del conteo de Bacterias Mesofílicas Aerobias y células somáticas. En el caso de Colombia, se consideran rangos microbiológicos en donde existe el pago por la cantidad mínima de bacterias (0-25,000 UFC/mL), en este caso, el decremento en el valor depende del aumento en el contenido microbiano (Resolución 0017, 2012).

Para el caso de México LICONSA, una de las instituciones encargadas del acopio y tratamiento de la leche a nivel nacional, establece en su Manual de Procedimiento para la Adquisición, Recepción y Pago de leche Nacional en el 2010, los valores sobre los cuales se otorgan los llamados estímulos económicos, concedidos cuando se cumplen las especificaciones como el contenido de grasa y proteína, la calidad fisicoquímica, la calidad higiénica la evalúa mediante el tiempo de reducción de azul de metileno, la ausencia de antibióticos y conteo de células somáticas; sin embargo es necesario resaltar que los pagos que se realizan no son adicionales, sino que se le llama pago, porque de no cubrir los requisitos, los productores suelen ser acreedores a multas. Cabe mencionar que dentro de las responsabilidades de los productores es la de fungir como proveedor por un tiempo mínimo de 52 semanas continuas, para poder ser beneficiados por éste sistema (LICONSA, 2004).

Sin embargo, éstos sistemas de pago no están establecidos de manera formal, y solo llegan a sistemas con un nivel de producción alto (sistema intensivo o semi intensivo), por lo que los sistemas de tipo familiar o lecherías familiares no se encuentran incluidos, debido a que básicamente la producción es para autoconsumo y

procesamiento local, aunado a las fluctuaciones en los precios tanto de la leche, como de los insumos pecuarios, convierten a la producción de leche en una actividad poco rentable (Abrego, 2011). Lo anterior expone que el interés de realizar prácticas de manejo que garanticen la calidad de su leche decrecen por una parte porque no hay instituciones que las exijan, y por otra, no existen estímulos que puedan alentar por lo que esto provoca un desinterés y apatía en el tema.

3.8 Marco referencial de la producción de leche en la región de estudio

El estado de Tlaxcala tienen una superficie total de 3,997 Kilómetros cuadrados (Km²), cuenta con un uso de suelo principalmente agrícola (75.21%), seguida de una superficie relativamente baja de bosque (15.89%) y de pastizal (6.28%). La microcuenca del río Zahuapan se localiza en una franja que va de norte a sur en la parte central del estado, abarcando una superficie de 1,494 Km², representando el 37.4 de la superficie estatal. Es considerada un cuerpo de agua significativo que concentra más del 55% de la infraestructura hidráulica del estado y conforma parte del distrito 056 Atoyac-Zahuapan (SEMARNAT, 2006), que a su vez integra la parte Alta de La Microcuenca del Balsas.

Se ubica a una altura sobre el nivel del mar de 2,178 a 3,380 metros, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, con una temperatura promedio máxima anual registrada de 24.7 °C y una precipitación de 700 mm anuales. Durante el año, se observan variaciones en la temperatura que van desde los 0.5 °C como mínima, hasta los 30.6 °C como máxima, registrándose eventualmente temperaturas bajo cero en las partes más altas.

El río recorre gran parte del estado, sin embargo destacan los municipios de Apizaco, Nativitas, San Damián Texoloc, Muñoz de Domingo Arenas, Xicohtzinco, Xaltocan, Yauhquemehcan, San Lucas Tecopilco, Amaxac de Guerrero, Totolac, Tlaxcala, Apetitlan de Antonio Carvajal, Atlangatepec, Tetlatlahuca, Tlaxco entre otros, por tener los almacenamientos de dicho efluente más importantes del estado (INAFED, 2014) y ser utilizados como fuente hídrica para uso agrícola (5853 hectáreas).

Los cultivos considerados en la zona son el maíz grano (24,808.5 has), alfalfa (903 has) y avena forrajera (6,013 has). Dentro de esta microcuenca los municipios con mayor importancia en la producción de maíz destacan Tlaxco, Xaltocan, Atlangatepec y

Nativitas con un superficie sembrada de 15,686 hectáreas (ha) y un volumen de producción anual de 42,105 Ton que equivale al 26.5% de la producción estatal (SIAP, 2011). Otro cultivo significativo en la región es la alfalfa con volumen de producción de 55,065 toneladas sobresaliendo los municipios de Nativitas, Tetlatlahuca, Tlaxco y Atlangatepec; el volumen de producción de avena forrajera oscila en 108,405 ton, Tlaxco, Atlangatepec y Muñoz de Domingo Arenas tienen la mayor producción. Por último, en la zona se siembra alrededor de 880 hectáreas de maíz forrajero, de donde se obtienen 33,735 Ton anuales resaltando los municipios de Tlaxco, Atlangatepec, Tetlatlahuca y Apizaco (SIAP, 2012).

En los municipios que conforman la microcuenca existen 4,959 unidades lecheras de tipo familiar, que anualmente generan 33,130 Ton de leche y cuentan con un inventario de 24,248 cabezas de bovinos. Dentro de esta región destacan los municipios de Tetlatlahuca, Tlaxco, Nativitas, Apizaco y Atlangatepec, que concentran el 58% de las unidades de producción, el 81% del inventario bovino y el 80% de la producción de leche.

Por su posición geográfica dentro de la microcuenca y las condiciones de producción, municipios representativos de la producción de leche son Tlaxco, Atlangatepec y Tetlatlahuca. En el Cuadro 12 se presentan algunas características de los tres municipios, observándose que Tlaxco representa una zona de producción de leche basada en mayor medida en la producción de forrajes bajo condiciones de temporal como la avena, maíz forrajero y esquilmos agrícolas, que junto con la alfalfa, son los ingredientes fundamentales para la alimentación de las vacas. Tetlatlahuca se caracterizan por tener una mayor disponibilidad de agua para el establecimiento de cultivos forrajeros de corte, destacando leguminosas como la alfalfa y el trébol. Atlangatepec es un punto intermedio entre estos dos municipios, existen explotaciones que basan su alimentación en cultivos forrajeros producidos en condiciones de temporal, pero tiene disponibilidad de agua proveniente de la laguna ubicada en el municipio y que guarda su nombre (“Laguna de Atlangatepec”), donde se produce alfalfa y pastos forrajeros de corte.

Cuadro 12. Características de la producción agrícola y pecuaria en los sitios de estudio

Municipio	Actividad agrícola Superficie Sembrada (Ha)							Actividad Pecuaria		
	Total	Riego	Temporal	Alfalfa	Avena	Maíz grano	Maíz Forrajero	UP	Existencia (N° de cabezas)	Volumen de producción (miles de litros)
Tlaxco	22,818	553	22,265	90	2,320	7,169	295	795	6,189	706.80
Atlangatepec	13,672	297	13,375	60	680	2,454	205	357	2,924	330.10
Tetlatlahuca	2,174	1,262	912	212	183	1,425	145	427	4,643	543.69

UP= Unidades de Producción; Ha= Hectáreas; N°=Número

Fuente: SIAP, 2011

IV. METODOLOGÍA

En la Figura 5 se muestra un diagrama general de la metodología que se llevó a cabo en la presente investigación.

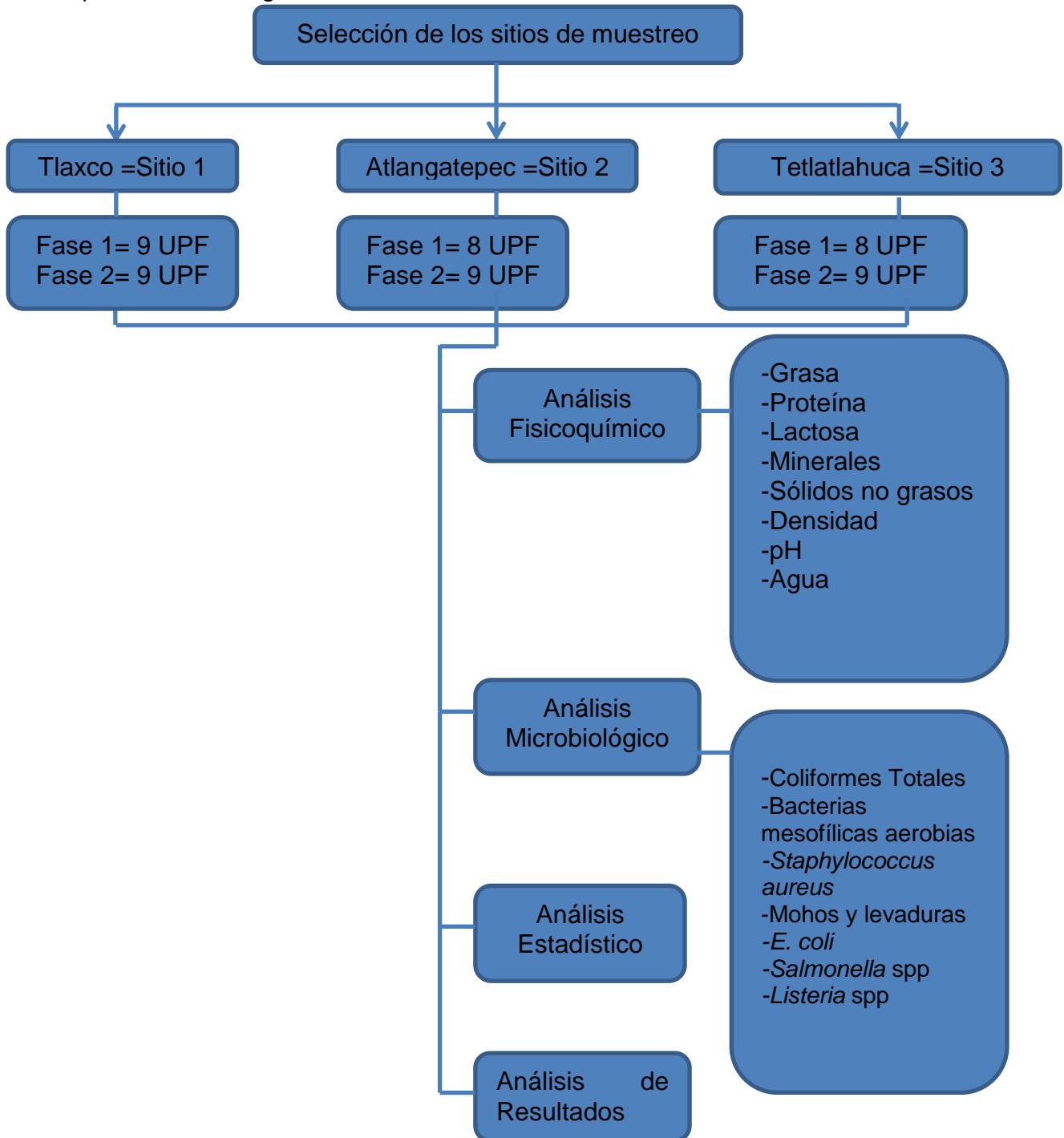


Figura 5. Diagrama General de Trabajo

4.1. Sitios de muestreo

Por la importancia en producción tanto en granos, forraje y leche enmarcaron el interés de considerar a los municipios de Tlaxco (sitio 1), Atlangatepec (sitio 2) y Tetlatlahuca (sitio 3) como sitios estratégicos de muestreo (Figura 6).

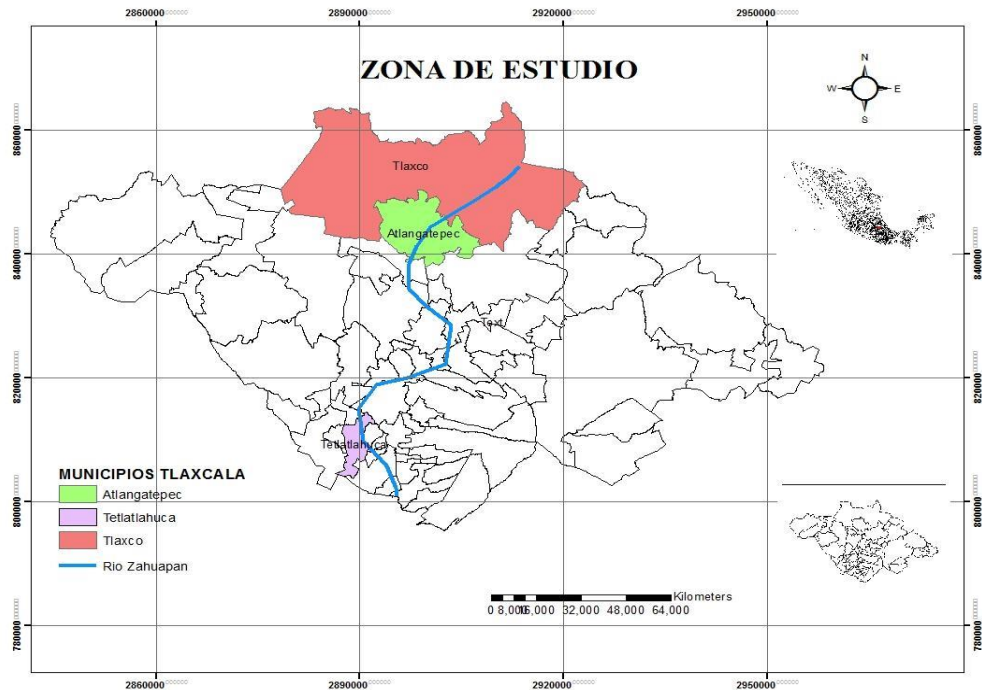


Figura 6. Ubicación de los sitios de estudio en la microcuenca del río Zahuapan

4.2. Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas en unidades de producción familiar (UPF) por cada sitio: sitio 1 (Tlaxco), sitio 2 (Atlangatepec) y sitio 3 (Tetlatlahuca). El muestreo se realizó en dos fases:

- En la fase 1, se colectaron 25 muestras, estas fueron tomadas una vez finalizado el proceso de ordeña (considerando el manejo que cada productor realiza antes de realizar dicha operación), se colectaron 100 mL en frascos herméticos estériles.
- En la fase 2, se colectaron 27 muestras. Se efectuó utilizando una técnica de limpieza antes del ordeño, que consistió en lavar perfectamente la ubre y cada uno de los cuartos del animal con agua corriente y jabón líquido (Axion®),

posteriormente se secó con toallas de papel y se aplicó una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, ejecutando el mismo procedimiento de secado. Se realizó la toma de muestra una vez concluida la ordeña, colectando una muestra representativa de 100 mL en frascos estériles y herméticos.

En cada una de las fases, las muestras se transportaron a una temperatura de 4-8 °C para el análisis fisicoquímico y microbiológico que se realizó en la Unidad de Laboratorios del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla.

4.3. Análisis fisicoquímico de leche

La determinación de propiedades de densidad, grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos, minerales y agua adicionada, se realizaron mediante la medición directa en el analizador de leche Milkoscope Julie C3® (Scope Electric, 2010) a partir de 20 mL de muestra. El pH fue determinado por medio de un potenciómetro Conductronic®.

4.4. Análisis microbiológico de leche

Las determinaciones microbiológicas que se realizaron se esquematizan en la Figura 7. A continuación se resume la metodología para cada una de las especificaciones microbiológicas, considerando que para la siembra de Coliformes Totales, Bacterias Mesofilicas Aerobias, Mohos y Levaduras y *E. coli* se realizaron las respectivas diluciones.

4.4.1. Preparación de diluciones

La preparación de las diluciones se realizó siguiendo el procedimiento detallado en la NOM-110-SSA1-1994. Se tomaron 10 mL de leche y se realizó una primera dilución en 90 mL de diluyente (agua peptonada al 0.1%), mezclando con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm, efectuados en un tiempo de 7 segundos. Continuando con las posteriores diluciones, se tomó 1 ml de la dilución anterior en cada caso (10^{-2} hasta 10^{-5}) colocándola en 9 ml del mismo diluyente, agitando en un vortex durante 7 segundos.

4.4.2. Determinación de bacterias coliformes totales

Para determinar la presencia de bacterias coliformes totales se utilizó la técnica de cuenta en placa, descrita en la NOM 113- SSA1- 1994 que consistió en realizar diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) utilizando Agar Rojo Violeta Bilis

(Bioxon®), la siembra se realizó por duplicado, adicionalmente se inoculó una placa testigo (sin muestra). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en posición invertida y, transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de las UFC considerando las placas para recuento, que contuvieron entre 15 y 150 colonias características (Figura 8), la verificación de la esterilidad se observa en la Figura 9.

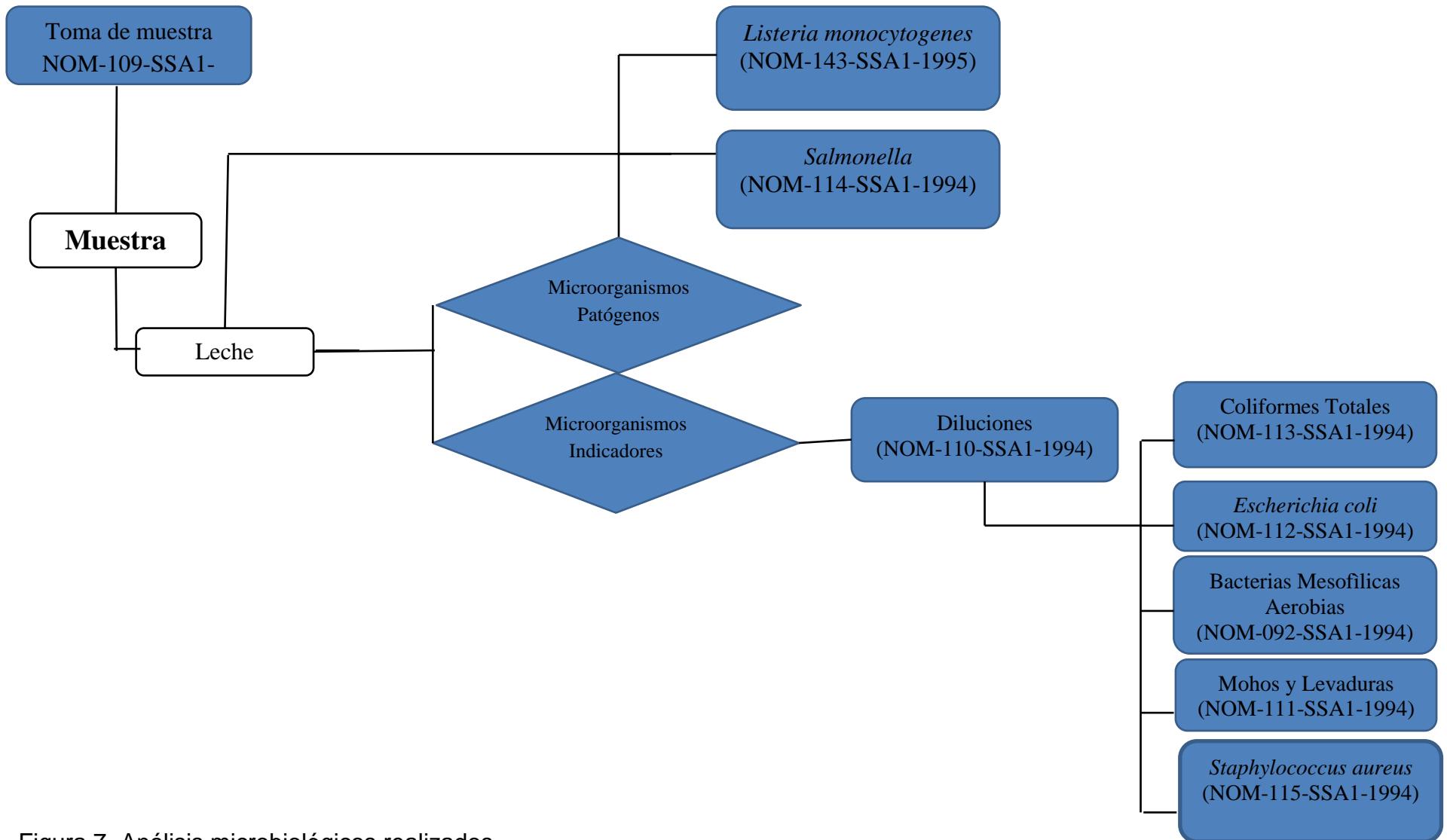


Figura 7. Análisis microbiológicos realizados

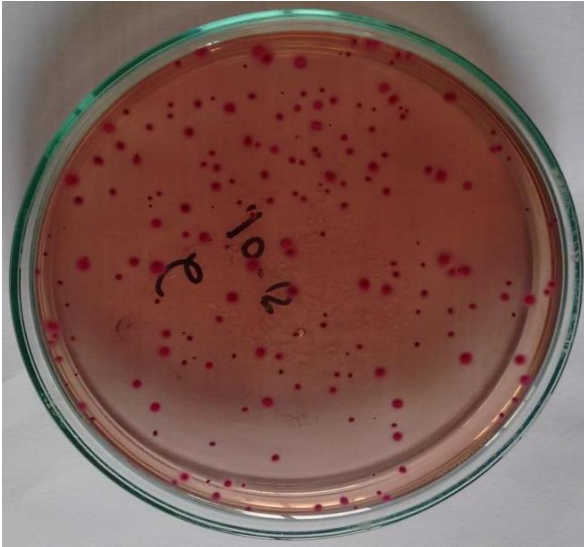


Figura 8. Crecimiento de Coliformes totales en Agar Rojo Violeta Bilis después del tiempo de incubación.



Figura 9. Placa testigo Agar rojo Violeta bilis sin inóculo después del tiempo de incubación.

4.4.3. Determinación de Bacterias Mesofilicas Aerobias (BMA)

La determinación de BMA se realizó mediante la técnica de vertido en placa, procedimiento establecido en la NOM 092- SSA1-1994 utilizando diluciones (10^{-1} - 10^{-5}). La siembra se realizó por duplicado. Se utilizó Agar Cuenta Estándar (Bioxon®), las placas se incubaron durante 48 horas a 35 ± 2 °C llegando el tiempo, se revisaron las placas considerando aquellas que tuvieron entre 25 y 250 colonias características (Figura 10). Se consideró una placa testigo para comprobar la esterilidad del medio de cultivo (Figura 11).



Figura 10. Crecimiento de Bacterias Mesofílicas Aerobias en Agar Cuenta Estándar, después del tiempo de incubación.

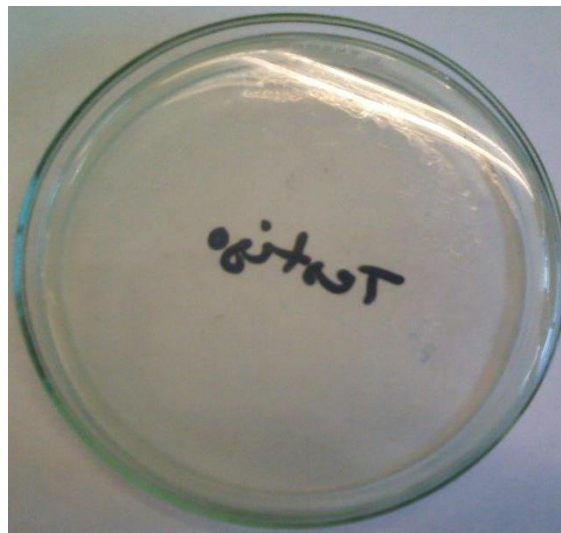


Figura 11. Placa testigo (Agar cuenta Estándar) sin inóculo, después del tiempo de incubación

4.4.4. Determinación de Mohos y Levaduras

La cuenta de mohos y levaduras se determinó utilizando la NOM-111-SSA1-1994 con diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), se sembraron por duplicado, tanto para mohos y para levaduras. Se utilizó Agar Papa Dextrosa (PDA Bioxon ®). Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h en el caso de levaduras y para mohos se utilizó una temperatura de incubación de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días, transcurrido el tiempo se seleccionaron las placas con crecimientos de entre 15 y 150 colonias y una placa adicional como testigo (Figura 12 y 13).

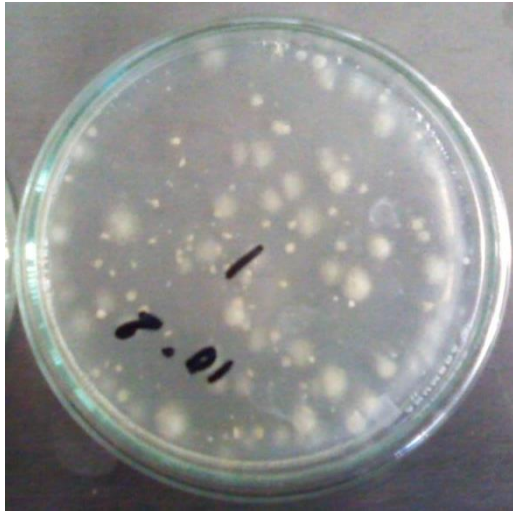


Figura 12. Crecimiento de Mohos (colonias grandes, vellosas y Levaduras (colonias pequeñas) en Agar papa Dextrosa (PDA), después del tiempo de incubación.

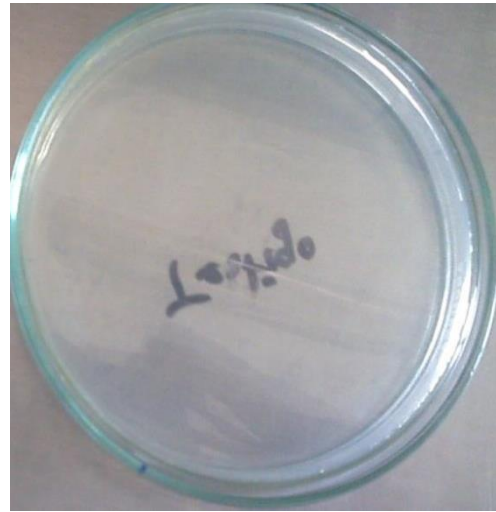


Figura 13. Placa testigo (PDA) sin inóculo, después del tiempo de incubación

4.4.5 Determinación de *Staphylococcus aureus*

La determinación de *Staphylococcus aureus* se realizó mediante la técnica establecida en la NOM 115-SSA1- 1994. Se utilizó como medio selectivo y diferencial el agar Baird Parker (Difco ®), se inocularon 0.1 mL de cada dilución (10^{-1} a 10^{-4}), por duplicado. Las cajas se incubaron por 48 h a una temperatura 35 ± 2 °C. Trascurrido el tiempo se realizó el conteo considerando las placas con crecimiento de entre 15 y 150 colonias típicas con halo claro (Figura 14), se inoculó una placa testigo para confirmar esterilidad (Figura 15), dichas colonias se confirmaron mediante la prueba de coagulasa en plasma sanguíneo humano.

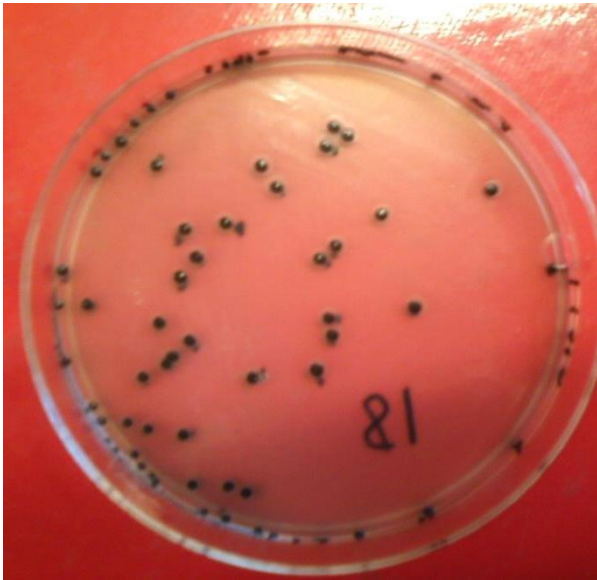


Figura 14. Colonias de *Staphylococcus aureus* (negras con halo blanco), en agar Baird Parker después del tiempo de incubación

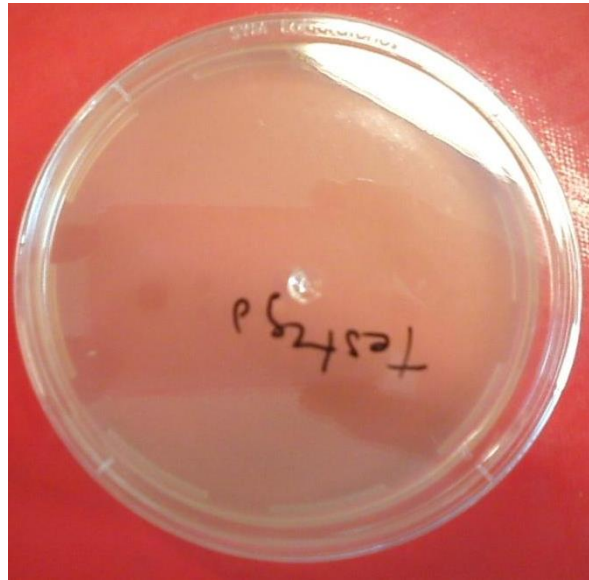


Figura 15. Placa testigo (agar Baird Parker) sin inóculo, después del tiempo de incubación

4.4.6 Determinación de *E. coli*

Para determinar la presencia *Escherichia coli* se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP) establecida en el método de prueba CCAYAC-M-004/8, utilizando diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-3}) por triplicado. Se depositó 1 ml de cada dilución a cada uno de los tres tubos, conteniendo 10 ml de caldo Lauril Sulfato Triptosa (Difco®) (Figura 16), con tubo o campana de Durham invertido para determinar la presencia de gas (prueba positiva). Los tubos se incubaron durante 24-48 horas a 35 ± 2 °C, los tubos positivos se transfirieron por asada a caldo *E. coli* MUG (Difco®) y se incubaron a una temperatura de 44.5 °C.

La prueba se consideró positiva (Figura 17), con formación de turbidez, gas en el tubo Durham y la emisión de fluorescencia observada bajo una lámpara de luz ultravioleta de 366 nm (Steren ®)



Figura 16. Siembra de tubos con Caldo Triptosa (Prueba presuntiva).



Figura 17. Fluorescencia emitida por tubos con Caldo *E. coli*- MUG, después del tiempo de incubación.

4.4.7 Determinación de *Salmonella* spp

Para determinar la presencia de *Salmonella* se realizó conforme el procedimiento de la NOM 114-SSA1-1994, en el cual se destacaron tres fases: Preenriquecimiento, enriquecimiento y aislamiento.

En la fase de Pre enriquecimiento se inocularon 25 mL de muestra (leche) en 225 mL de Caldo Lactosado (Bioxon®) y se incubó por 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$; posteriormente, en la fase de enriquecimiento se transfirió 1 mL de la mezcla a un tubo que contenía 10 mL de Caldo Selenito Cistina (Difco®) se incubó por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. En la fase de aislamiento (Figura 8a), los tubos con precipitado color rojo se sembraron en los medios selectivos Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Bioxon®) (Figura 18) y Verde Brillante (Bioxon®) por estría, los medios se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Para su identificación bioquímica (Figura 19) se utilizaron los medios de Hierro y Triple azúcar (Bioxon), Agar de Hierro Lisina (Bioxon®), Agar Movilidad, Indol y Ornitina (Bioxon®), Agar Citrato de Simmons (Bioxon®) se incubaron a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Finalmente se realizó confirmación mediante morfología a través de la tinción de Gram.



Figura 18. Colonias de *Salmonella* características productoras de ácido sulfhídrico (color negro), en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato después del tiempo de incubación.



Figura 19. Pruebas bioquímicas, después del tiempo de incubación. De izquierda a derecha: Agar de Hierro y Triple Azúcar, Agar Hierro Lisina, Medio MIO y Agar Citrato de Simmons.

4.4.8 Determinación de *Listeria* spp

El análisis se realizó mediante el procedimiento descrito en la NOM-143-SSA1-1995. Se efectuó una fase de enriquecimiento con caldo UVM (Difco®), en donde se utilizaron 25 mL de la muestra y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 h. El aislamiento se realizó en agar Oxford modificado (Difco®) incubándose por 48 h a 35 ± 2 °C (Figura 20). Finalmente se realizó una tinción de Gram para identificar morfología (Figura 21).

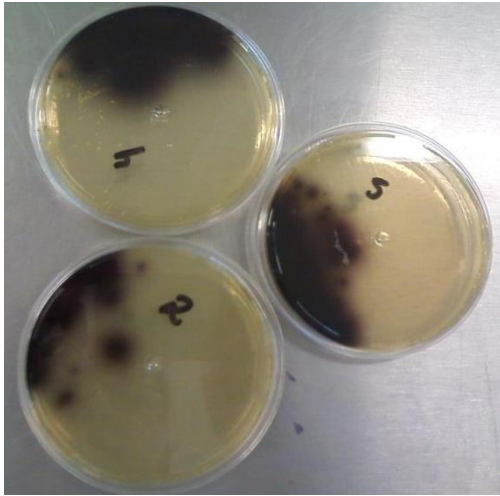


Figura 20. Placas con crecimiento de colonias sospechosas de *Listeria* spp. con hidrolisis de esculina (coloración negra).

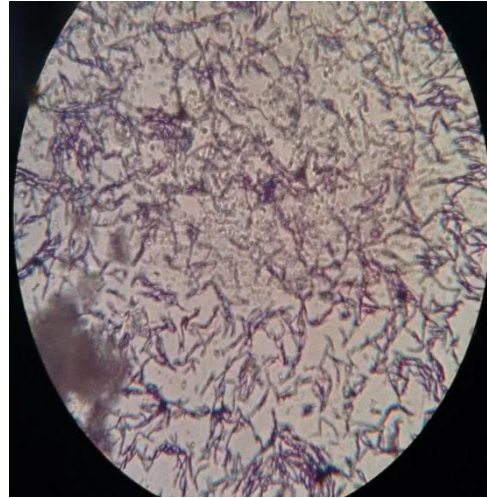


Figura 21. Tinción de Gram de colonias sospechosas de *Listeria*. Presencia de bacilos Gram positivos (coloración violeta).

4.5. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) mediante el siguiente modelo estadístico (Pedroza y Dikovskiy, 2006):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$i = 1,2,3$ sitios (tratamientos)

$j = 1,2,3$ unidades de producción familiar

μ = Media poblacional a estimar a partir del experimento

τ_i = Efecto del i –ésimo tratamiento correspondiente a los sitios de muestreo

ε_{ij} = Efecto aleatorio de variación

Para el análisis de parámetros fisicoquímicos se realizó un análisis de varianza y una comparación entre sitios muestreados y para las pruebas microbiológicas, se realizó un análisis de varianza, además de una comparación de medias de las dos fases de muestreo y entre los tres sitios, mediante el paquete estadístico SPSS Statistics 20 ®.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados para el estudio fisicoquímico se presentan haciendo un análisis general y por cada sitio muestreado. En el caso de los parámetros microbiológicos se realizó un análisis general de microorganismos indicadores por fases y por sitios, posteriormente se presenta un análisis para cada variable microbiológica considerando su comportamiento y distribución porcentual en cada fase y sitio.

5.1 Análisis de la calidad fisicoquímica de la leche

En el Cuadro 13 se muestran los resultados promedio y por sitio muestreado para las variables fisicoquímicas determinadas en el presente trabajo. En términos generales y comparando con la norma NMX-F-700-COFOCALEC-2012, los valores promedio encontrados indican que la leche producida en la microcuenca del río Zahuapan, cubre con los parámetros establecidos para el contenido de grasa, proteína y lactosa, mismos que deben ser al menos de 3.0%, 2.8% y 4.3%, respectivamente. Sin embargo, queda ligeramente bajo para contenido de minerales y sólidos no grasos (SNG), que deben ser de 0.7% y 8.3%, respectivamente, y que pueden directamente estar afectados por la adición de agua a la leche que algunos productores hacen para mejorar el rendimiento y las ganancias de la producción.

Los valores encontrados en esta investigación, son muy similares a los reportados por Abrego (2011) en explotaciones familiares de Nopalucan, Puebla, a los de Bernal *et al.* (2007) y Álvarez *et al.*, 2012 en el estado de México y a los de Cervantes *et al.* (2013) en Hidalgo. Estudios realizados en otros países como Colombia y África encontraron contenidos de grasa mayores que van de 3.9-4.0% (Botero *et al.*, 2012 y Millogo *et al.*, 2010)

Considerando la clasificación que hace la norma antes referida en términos de contenido de grasa, la leche es de muy buena calidad al quedar clasificada de tipo A ($\geq 3.2\%$); sin embargo, en términos de contenido de proteína, cubre la norma pero queda clasificada en la de tipo C (2.8- 2.9%), que es la de menor calidad. Desde un punto de vista nutricional del animal, se puede decir que las vacas son alimentadas

adecuadamente con alimentos altos en fibras para dar una leche rica en grasa, pero deficiente en energía que afecta la síntesis de proteína (Bunting, 2004)

En términos de densidad, la cual debe ser al menos de 1.0295, en el Cuadro 13 se observa que tiene un valor ligeramente más bajo, e inferior también a datos reportados por diferentes autores mostrados en el Cuadro 3, quienes reportan valores de 1.029 a 1.033. Los resultados obtenidos pueden verse afectados también por la adición de agua, dado que existe una correlación negativa entre ambos parámetros. Concerniente al pH, los valores encontrados son aceptables a los indicados en la literatura, que van de 6.6 a 6.8 (Maza y Legorreta, 2011) y son semejantes a los reportados por diferentes autores mostrados en el Cuadro 3, que van de 6.54 a 6.72.

Cuadro 13. Composición fisicoquímica de la leche en explotaciones familiares de la microcuenca del Rio Zahuapan (Media±DE).

Parámetro (N)	Promedio (N:52)	Sitio 1 (N:18)	Sitio 2 (N:17)	Sitio 3 (N:17)
Grasa (%)	3.23±1.86	3.83±1.69 ^a	2.9±1.3 ^b	3.03±2.05 ^b
Proteína (%)	2.92±.21	2.95±.19 ^a	2.83±.18 ^a	2.97±.21 ^a
Lactosa (%)	4.36±.31	4.4±.29 ^a	4.22±.28 ^a	4.44±.32 ^a
Minerales (%)	0.66±.04	0.66±.04 ^a	0.64±.03 ^a	0.66±.04 ^a
SNG (%)	7.95±.56	8.04±.53 ^a	7.71±.51 ^a	8.1±.59 ^a
Densidad (g/mL)	1.027±.002	1.027±.002 ^a	1.026±.002 ^a	1.028±.003 ^a
pH	6.68±.27	6.60±.23 ^a	6.70±.25 ^a	6.70±.31 ^a
Agua	3.43±4.58	2.94±4.56 ^a	4.96±5.81 ^a	2.41±2.63 ^a

^{a,b} Indican diferencia significativa entre sitios (ANOVA, Tukey $p < 0.05$) en la misma variable. N=Número de muestras; DE=Desviación estándar

5.1.1 Composición fisicoquímica por sitios

Las medias de la composición fisicoquímica de leche por sitio se enlistan de igual manera en el Cuadro 13. Se aprecia que a excepción del contenido de grasa, donde se observa un valor más elevado en el sitio 1 con respecto al sitio 2 y 3, en todas las variables estudiadas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sitios. El contenido de grasa del Sitio 1 es más bajo al obtenido en Colombia por Calderón *et al.* (2006) y Botero *et al.* (2012), quienes respectivamente, reportaron valores de 4.5% y 4.06%, lo que puede ser atribuible a la mayor cantidad de fibra utilizada para la alimentación de las vacas.

Como se mencionó en la metodología, en la zona 1 la producción de forrajes es mayormente bajo condiciones de temporal y por consiguiente, se utilizan los esquilmos agrícolas como ingredientes importantes en las dietas de las vacas; sin embargo, esta cifra también puede ser afectado por otros factores como el estado de salud del animal, ya que en el curso de enfermedades como la mastitis debido a cambios patológicos en el tejido mamario y permeabilidad de las membranas (Morales, 1999).

Aun cuando no hay diferencias estadísticas en el contenido de proteína de los diferentes sitios, se observa que la leche del sitio 2 se encuentra en el límite inferior que marca la norma; este menor contenido de proteína en el sitio 2, pudiera estar asociado a que la dieta está basada prácticamente en cultivos forrajeros de corte y es limitado el uso de ingredientes energéticos. En términos generales es en el sitio 2 donde la leche se observa más pobre en todo los componentes, puede en parte estar también asociado a que fue el lugar donde se detectó una mayor adición de agua. Dicha práctica es recurrente en todos los sitios y representa una estrategia que los productores han adoptado por el pago limitado y condicionado, que los “boteros” han establecido en la zona de estudio.

5.2. Análisis de Calidad microbiológica

5.2.1. Microorganismos indicadores

Los microorganismos indicadores muestran el índice de contaminación que posee la leche y el contenido de estos, refleja las condiciones de obtención y almacenamiento de dicho fluido. Dichos microorganismos son los responsables de reducir la vida de anaquel (García. 2014), tanto de la materia prima (leche cruda), como de sus derivados (queso, crema, mantequilla, etc.). En la Cuadro 14 se muestran los promedios obtenidos para cada uno de los indicadores de calidad higiénica determinados en las dos fases de estudio, donde se observa que la cantidad de microorganismos fue mayor en la fase 1 que en la 2 en cada uno de los parámetros estudiados.

Los valores determinados demuestran que bajo el manejo tradicional representado por la fase 1, la leche no cubre con las normas básicas de higiene que marca la norma en ninguno de los parámetros determinados; sin embargo, al realizar las prácticas de limpieza en la ordeña, todas las especificaciones microbiológicas, a excepción de *Staphylococcus aureus*, quedan dentro de los límites permitidos por la norma. El efecto de la higienización preordeño disminuyó la carga bacteriana, en un 83.7% los CT, 33.9% BMA, 43.5% *Staphylococcus aureus* y 84.8% en mohos y levaduras. Los valores anteriores indican que la higienización de la ubre tiene un efecto más significativo sobre la cuenta de CT y en mohos y levaduras; en contraste por BMA y *Staphylococcus aureus*, el efecto es menor. Para el caso de BMA, pudiera mayormente estar asociado a una contaminación indirecta (ambiente e instrumentos) y por otro lado *Staphylococcus aureus*, pudiera deberse a una contaminación directa de la ubre asociada a la salud del animal (mastitis).

Para el caso de CT la NOM-243-SSA1-2010, establece un límite máximo de 20 UFC/mL (1.3 Log₁₀ UFC/mL); sin embargo, el valor encontrado en la primer fase supera tres veces el valor permitido y evidencia una fuerte contaminación derivada de las deficientes prácticas de manejo en el ordeño. Valores superiores (8.17 Log₁₀ UFC/mL) a los encontrados en el presente trabajo (Cuadro 5), fueron reportados por Fuentes *et al.* (2013) en explotaciones campesinas del estado de México, donde las condiciones del almacenaje fueron determinantes. Mhone *et al.* (2011) en Zimbabwe encontraron

cargas de 6.4 Log₁₀ UFC/mL, asociadas a deficientes prácticas de manejo y por otro lado Ibitisam *et al.* (2007) en Sudán, evidenció una carga de 9.38 Log₁₀ UFC/mL para la época de verano y de 5.89 Log₁₀ UFC/mL en invierno. Con dichos estudios, se remarca que existen diferentes factores que están influyendo sobre la carga bacteriana. Valores similares a los encontrados en este estudio fueron reportados por Asmahan (2010) en Sudán, Calderón *et al.* (2006) en Colombia y Fulya (2011) en Turquía.

Cuadro 14. Recuento de microorganismos indicadores (Log₁₀ UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) y con un método de higienización (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan

Parámetro (N)	Fase 1 (25)	Fase 2 (27)	Efectividad (%)
Coliformes Totales	4.80±2.14 ^a	0.78±1.08 ^b	83.7
Bacterias Mesofílicas Aerobias	6.31±1.11 ^a	4.17±1.76 ^b	33.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.91±1.02 ^a	2.77±1.86 ^b	43.5
Mohos y Levaduras	3.62±1.58 ^a	0.55±1.20 ^b	84.8

^{a,b} Indican diferencia significativa entre Fases (ANOVA, Tukey p<0.05) en la misma variable. UFC= Unidades Formadoras de Colonia; N=Número de muestras; DE=Desviación estándar

Para el caso de BMA el valor promedio encontrado en la fase 1, queda fuera del valor permitido para clasificarla al menos como clase 4 o de mala calidad (Cuadro 6), lo que necesariamente obliga a utilizar métodos térmicos para su procesamiento o consumo. Los autores arriba citados que encontraron cargas altas en CT, coincidentemente también reportan valores de BMA superiores a los del presente trabajo (Cuadro 7), además de otros como Pys Lukasik *et al.* (2015) y Asmahan (2010); Calderón *et al.* (2006). Otros autores como Calderón *et al.* (2006) y Mariscal *et al.* (2013) en Bolivia, Stulova *et al.* (2010) en Estonia, Tremonte *et al.* 2014 en Italia, Elmosleman *et al.* (2009) en Canadá y Álvarez *et al.* (2012) en México. Este último, estudió pequeñas explotaciones evidenciando diferencias significativas entre épocas del año.

El efecto de la higienización no fue una práctica suficiente para obtener un conteo permitido dentro de la norma para *Staphylococcus aureus*. Los valores encontrados en la fase 1 (Cuadro 8) fueron menores a los encontrados por Asmahán (2010) que lo relacionó con problemas de la ubre y a la manipulación poco higiénica después del ordeño, Ibitisam *et al.* (2007) que atribuyeron a mastitis y Mhone *et al.* (2011) coinciden con problemas de la ubre y debido a una contaminación cruzada. Aunque en su revisión este último autor menciona que este microorganismo puede ser eliminado por tratamiento térmico; sin embargo, los metabolitos (termotoxinas) que liberan son resistentes al calor convirtiéndose en riesgos potenciales.

En levaduras y mohos la norma estipula un valor menor de 2.6 Log₁₀ UFC/m, encontrando valores superiores en la Fase 1; sin embargo en la literatura se reportan valores superiores como los de Fulya (2011) quienes atribuyen los altos conteos al uso de alimentos mal conservados como los ensilados, que contienen altos niveles de micotoxinas que pasan a la leche. Otros autores con valores más altos a los de este trabajo fueron Tremonte *et al.* (2014) y Asmahan (2010).

Cuadro 15. Recuento de microorganismos indicadores (Log UFC/mL) en leche por sitio de estudio en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan. (Media±DE)

Parámetro	Sitio (N)	Fase 1			Fase 2		
		1 (9)	2 (8)	3 (8)	1 (9)	2 (9)	3 (9)
Coliformes Totales		5.92±1.62 ^a	3.57±2.83 ^a	4.77±1.13 ^a	1.02±1.28 ^a	0.71±1.08 ^a	0.62±.96 ^a
Bacterias Mesofílicas Aerobias		6.69±.67 ^a	6.19±1.54 ^a	6.00±1.03 ^a	4.24±1.85 ^a	4.95±1.59 ^a	3.33±1.64 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>		4.98±1.02 ^a	4.96±1.10 ^a	4.76±1.07 ^a	2.69±2.02 ^a	2.58±1.94 ^a	3.05±1.80 ^a
Mohos y Levaduras		4.38±.63 ^a	4.22±1.38 ^a	2.17±1.63 ^b	1.12±1.69 ^a	0.00	0.53±1.05 ^a

^{a,b} indican diferencia significativa en la misma fila en distinta fase (p<0.05)

UFC= Unidades Formadoras de Colonia; N=Número de muestras; DE=Desviación Estándar

En el Cuadro 15 se observa que no se encontraron diferencias significativas (p>0.05) en los recuentos entre los 3 sitios, tanto en la fase 1 como en la fase 2 en los parámetros de CT, BMA, y *Staphylococcus aureus*; no obstante, en el conteo de Mohos y Levaduras si existe una diferencia significativa ((p<0.05) al ser superior el sitio 3

($p < 0.001$) con respecto a los sitios 1 y 2; mientras que en la fase 2, en el sitio 2 no se identificaron este tipo de microorganismos y en los sitios 1 y 3, fueron cargas muy bajas. Lo anterior demuestra que bajo el manejo tradicional la carga bacteriana es homogénea en toda la región muestreada, con valores superiores significativamente a los indicados por las normas establecidas para cada bacteria.

5.2.2 Distribución gráfica de las cargas de microorganismos indicadores

Coliformes totales

En la Figura 22 se aprecia que en la Fase 1, el 40% de las muestras tuvieron cargas excesivamente altas ($> 1,000,000$ UFC/mL), 40% con conteos altos (1000 y $< 1,000,000$ UFC/mL), el 12% con contenido moderado (100 y $< 1,000$ UFC/mL) y el 8% de muestras con conteos considerables (< 100 UFC/mL), que a pesar de tener cifras menores no cubren los requisitos mínimos de calidad para leche cruda. La importancia de la presencia de este grupo de microorganismos en la leche está asociada a que pueden estar presentes bacterias que pueden afectar las características iniciales en la leche, mermando de esta forma su vida de anaquel. Calderón *et al.* (2006) relaciona tal contenido con el grado de limpieza de las manos de los operarios (en el caso del ordeño manual), sin embargo también está asociado a la limpieza de equipos y pezones del animal.

En la Fase 2 se encontró que solo el 3.7% de muestras tuvo conteos altos (1000 y $< 1,000,000$ UFC/mL), mientras que el 22.2% tuvo contenidos moderados (100 y $< 1,000$ UFC/mL) y el 74.1% de muestras con valores considerables (< 100 UFC/mL), lo que pudo comprobar que, la alternativa para obtener una leche que cubra los requerimientos de calidad es realizar una higiene pre ordeño.

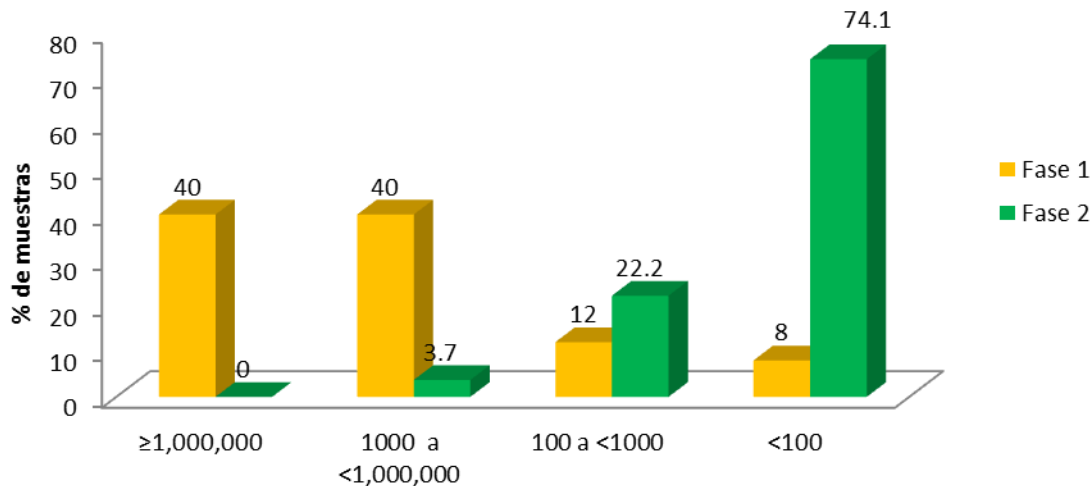


Figura 22. Distribución del recuento de Coliformes Totales (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Río Zahuapan.

Bacterias Mesofílicas Aerobias

Como se señaló en el Cuadro 6, existen clasificaciones para la leche cruda de acuerdo al contenido de BMA presentes. En la Figura 23 se muestra que en la Fase 1, el 64% de las explotaciones sobrepasa los límites permitidos para la clase 4 (> 1, 200,000 UFC/mL), en el 20% de las muestras se hallaron cifras para leche clase 2 y 3 (100,000 a 1,200, 000 UFC/mL) y solo el 16% cubre la especificación para una leche clase 1 (<100, 000 UFC/mL), considerada como una leche de buena calidad higiénica, tales conteos están asociados principalmente a factores ambientales y debido al manejo que se da dentro de las unidades de producción.

En la Fase 2, el 18.6% tiene conteos superiores a la clase 4; 14.8% a conteos de leche clase 2 y 3 y el 66.6% cubre la especificación de leche clase 1. Tales resultados demuestran que la limpieza antes del ordeño, favorece la obtención de un producto de calidad higiénica, lo que lleva a confirmar lo citado por Arrieta (2011), que es a partir de la ordeña cuando aumenta el recuento microbiano, en el caso muy particular de limpieza tanto de ubres, operarios, así como de instrumentos y almacenaje. La importancia de tener conteos altos en dicha especificación radica en que, además de

que dentro de este grupo se incluyen bacterias que suelen provocar alteraciones en las propiedades de la leche y reducir la vida de anaquel, significa también el riesgo de contener bacterias patógenas que puedan afectar al consumidor (Carrasco *et al.* 2011).

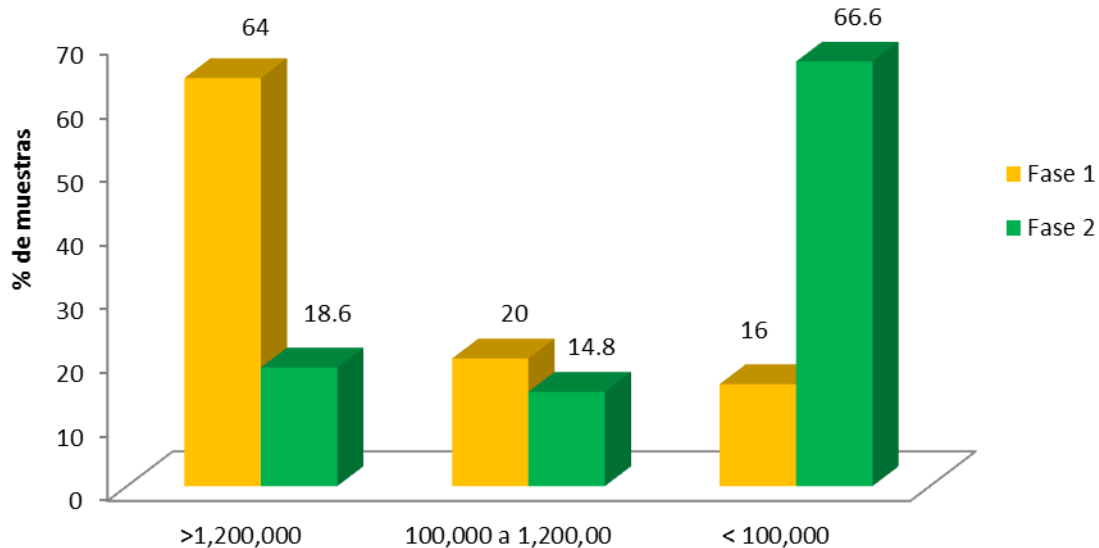


Figura 23. Distribución del recuento de Bacterias Mesofílicas Aerobias (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Río Zahuapan.

Staphylococcus aureus

El conteo para *Staphylococcus aureus* se expone en la Figura 24, en donde en la fase 1, el 12% de las muestras tienen conteos excesivamente altos (>1,000,000 UFC/mL) y el 40% de muestras con conteos altos (>100,000 y < 1,000,000 UFC/mL) y sólo el 48% corresponde a valores con conteos moderados (100-100,000 UFC/mL)). Los valores excesivamente altos y altos, tienen gran importancia sanitaria ya que no solo indica la deficiente calidad de acuerdo a la NOM- 243- SSA1- 2010, sino que también significan un riesgo en virtud de que se ha determinado que con dicha concentración bacteriana, se producen toxinas que son resistentes a tratamientos térmicos (Pascual y Calderón, 1999), por lo que, aunque la leche sufriera pasteurizaciones, no se garantizaría su inocuidad. Por otra parte, el conteo alto y excesivo demuestra que los animales no gozan de una vida saludable, dado que es posible que tengan una alta incidencia de mastitis

En la fase 2 se obtuvieron 70.4% de muestras que se ubican dentro del mismo rango, esta distribución explica que aunque se realicen técnicas de higiene, existen factores como la salud del animal que influyen en la calidad de la leche y en menor proporción debida al manejo. El 29.6% en esta misma fase tienen conteos <50 UFC/ mL, dato que aunque es bajo, no cubre las especificaciones de la normatividad mexicana, sin embargo no representan mayor peligro, puesto que tales microorganismos son sensibles a tratamientos térmicos.

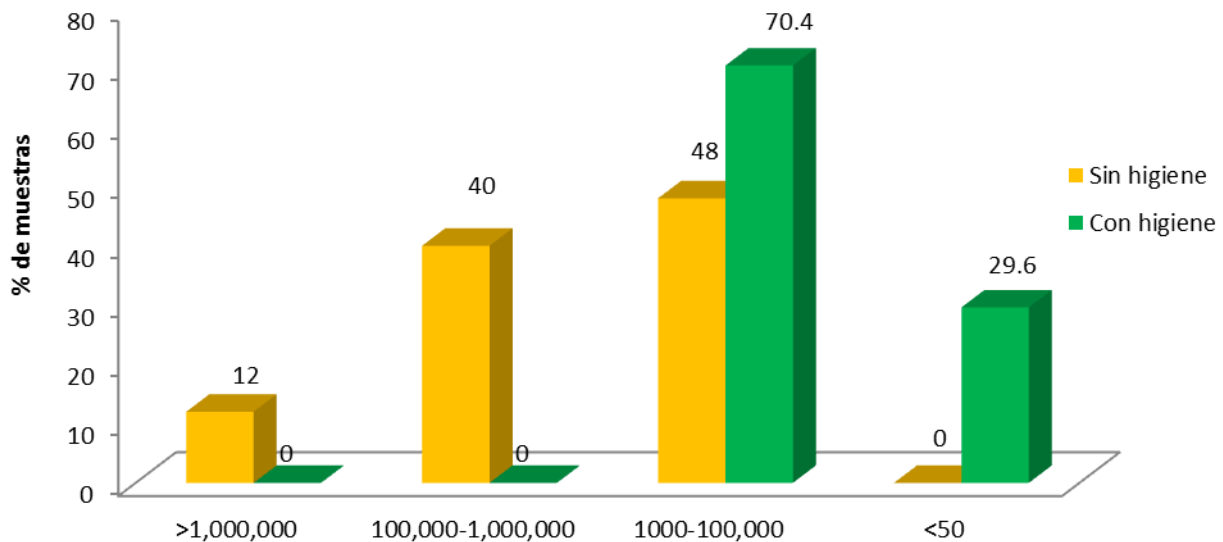


Figura 24. Distribución del recuento de *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Río Zahuapan

Mohos y Levaduras

La distribución de mohos y levaduras para cada una de las fases se aprecia en la Figura 25. Se encontró que el 32% de las muestras de la fase 1 y el 88.8 % de la fase 2 tuvieron conteos permitidos para la leche cruda según la NOM- 243- SSA1- 2010 (<500 UFC/mL.); mientras que el 68% de las muestras de la fase 1 y 11.2% de muestra de la fase 2 superan dicho valor establecido, estas cifras son de gran importancia ya que

existen más de 100 especies de hongos productores de micotoxinas, incluidas en tres géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Abarca *et al.*, 2000) lo que implica que la presencia de estos pudieran originar tales compuestos al reproducirse dentro del fluido. El origen de estos microorganismos en la leche, está asociado por una parte, a factores externos, sin embargo algunos autores lo han relacionado con el tipo de alimentación en el ganado (ensilados mal almacenados) y de esta forma estar presentes en el fluido (Fulya. 2011). La importancia de estos además de mermar la calidad tanto de leche como materia prima, y de producto terminado, es un riesgo potencial para los consumidores.

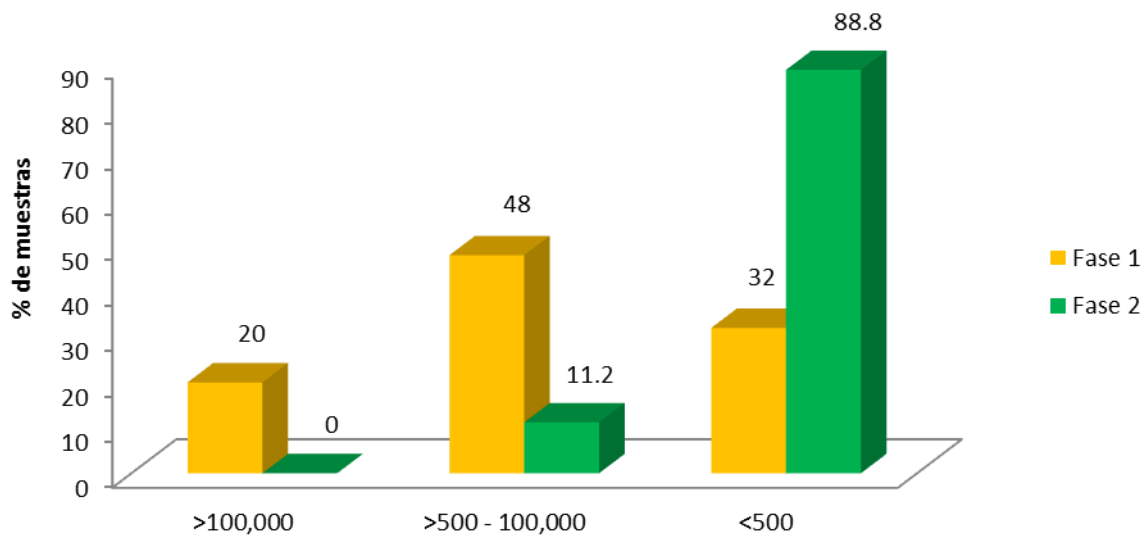


Figura 25. Distribución del recuento de Mohos y Levaduras (UFC/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Rio Zahuapan.

Escherichia coli

En la Figura 26 se expone la distribución de la estimación para *E. coli*, en donde 96% de las muestras fueron positivas en la Fase 1, a dicho microorganismo, además, superaron el valor permisible por la NOM-243-SSA1-2010 (<3NMP/mL) y solo el 4% se encuentra dentro del rango permitido. Los valores concuerdan con los obtenidos por Fulya (2011), en donde el 100% (N=100) de las muestras fueron positivas para *E. coli*; Mhone *et al.* (2011) obtuvo 40.8% (N=120) de muestras positivas. Dichos resultados

tiene importante significado debido a que su presencia indica contaminación fecal y un posible riesgo de contener cepas patógenas productoras de toxinas (*E. coli* O157 H7), sin embargo en el presente estudio no se encontró tal presencia. Por otra parte en la Fase 2, el 25.9% superan el límite permitido, mientras que 74.1% de las muestras se encuentran dentro de la norma. Los porcentajes antes mostrados corroboran que cuando se realiza una limpieza pre-ordeño se pueden lograr rangos aceptables (77% efectividad de la técnica) por la normatividad. Algunos estudios han asociado la presencia de dicha bacteria por una parte la deficiente limpieza pre-ordeño y por otra al uso del agua contaminada que es utilizada para el lavado de ubres, o la limpieza de instrumentos y utensilios.

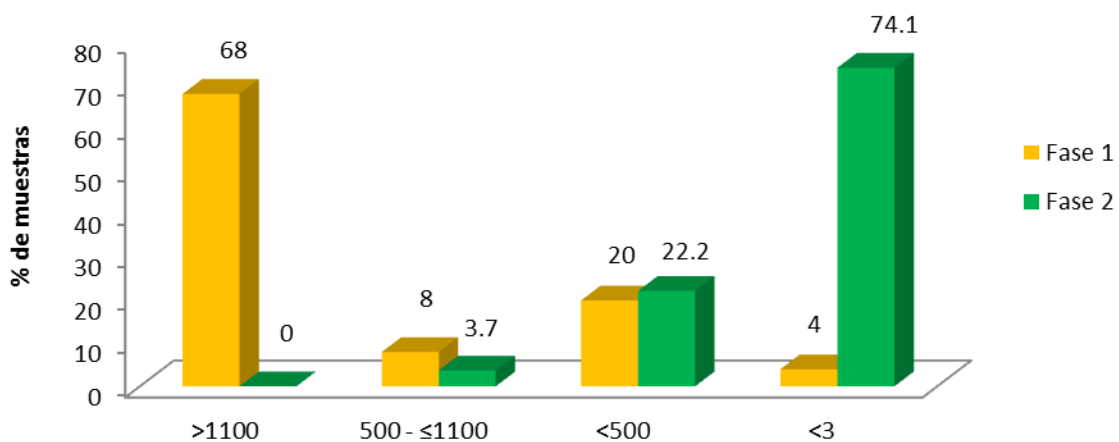


Figura 26. Distribución de la estimación de *Escherichia coli* (NMP/mL) en leche bajo el manejo tradicional (Fase1) e higiene pre-ordeño (Fase 2) en explotaciones familiares ubicadas en la microcuenca del Río Zahuapan.

5.2.3 Microorganismos patógenos

Estos microorganismos pueden encontrarse en el ambiente, además tienen la capacidad de infectar animales y de ésta forma explicar su existencia en la leche (Claeys *et al.*, 2013). En el Cuadro 17 se expone la cantidad de muestras positivas para *Listeria* spp que fue de 3 (12%) y para *Salmonella* cuyo valor fue de 1 (4%), ambas fueron encontradas en la fase 2. Esta información implica considerar que las bacterias presentes una vez realizado un proceso de limpieza, pudieran estar asociadas a la

presencia de estas en el ganado habiendo causado una posible enfermedad. Las muestras presuntamente positivas para las dos especificaciones se encontraron en las unidades de producción del sitio 3 (Tabla 7), en dichas explotaciones se observó que existe cierto control en el ordeño, ya que es el único sitio que utiliza soluciones a base de yodo como sellador, por lo que la posible vía de entrada en el animal pudo haber sido por la ingesta de agua o alimentos contaminados con dicha bacteria.

En algunos estudios reportaron la presencia de *Listeria* en la leche cruda (Cuadro 10), Camacho, Contreras y Torres(2007) el 3% (n=200) en Colombia; Hill *et al.*, (2012) 0.68% (n=297) en Nueva Zelanda; Jamali *et al.*, (2013), el 22.5% (n=240) en Irán; Kalmus *et al.*, (2015) tuvo el 28.5% (n=14) en Estonia, y Bianchi *et al.*, (2013) determina la presencia de *Listeria* spp en 1.6% de muestras y *Salmonella* de 0.32% (n=618) en Italia. La presencia de estos microorganismos en los estudios está asociada a las prácticas de ordeño deficientes y el uso de agua contaminada para dichas actividades; no obstante, el alimento juega un papel importante debido a que *Listeria* se ha aislado de los ensilajes por contener un pH en donde dicho microorganismo es capaz de sobrevivir (4.0 -9.0) (Araya, s.f), en estudios realizados por Fernández *et al.*, (2007) se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes* en el 3% de las muestras de ensilaje de maíz, en unidades de producción lechera en España.

Cuadro 16. Porcentaje de muestras positivas para microorganismos patógenos por fase

Fase	Microorganismo	Muestras presuntamente positivas	Muestras Negativas
Fase 1	<i>Listeria</i> spp	0	27(100)
	<i>Salmonella</i> spp	0	27(100)
Fase 2	<i>Listeria</i> spp	3(12)	22(88)
	<i>Salmonella</i> spp	1(4)	24(96)

VI. CONCLUSIONES

Con base a las hipótesis planteadas se concluye lo siguiente:

Hipótesis 1. La calidad fisicoquímica de la leche producida en las unidades familiares de la microcuenca del río Zahuapan es homogénea y está dentro de los parámetros normales que expresa la normatividad vigente.

Los resultados obtenidos demuestran que la calidad fisicoquímica de la leche no fue homogénea en el contenido de grasa, la cual puede ser atribuida al mayor uso de fibra en la dieta del animal, pero si fue en el contenido de proteína, lactosa, minerales, sólidos no grasos y en las propiedades de densidad y pH; además, se encontró que el contenido de grasa, proteína y lactosa están dentro de la norma vigente, pero no el contenido de minerales, sólidos no grasos y la densidad, que pudieron estar afectados por la adición de agua que realizan los productores.

Hipótesis 2. La calidad microbiológica de la leche producida tradicionalmente en las unidades familiares en la microcuenca del río Zahuapan no cubre los parámetros establecidos por las normas vigentes.

El estudio demostró que efectivamente, la calidad microbiológica de la leche que se produce de manera tradicional es deficiente, ya que todos los microorganismos indicadores superan los límites permitidos por la normatividad.

Hipótesis 3: Implementando una técnica de higienización en el proceso de ordeño se reduce significativamente la carga microbiológica de la leche, logrando los límites permitidos por la norma.

Con la técnica de higienización propuesta pre ordeño se redujo considerablemente la carga microbiológica de la leche, siendo el grupo de los coliformes totales y mohos y levaduras los que presentaron mayor susceptibilidad a la técnica con un porcentaje de efectividad de 83.7% y 84.8%; además hubo una disminución considerable de *E. coli* en un 74.1% de muestras.

El procedimiento propuesto permitió obtener valores sanitarios que son permitidos por la norma para cada variable, a excepción de *Staphylococcus aureus*, microorganismo

que a pesar de estar asociado a malas prácticas de higiene, probablemente puede estar asociado a la sanidad de la vaca, así como las bacterias patógenas (*Listeria* spp y *Salmonella* spp).

En resumen, las técnicas de limpieza preordeño favorecen la obtención de un producto de calidad higiénica aceptable, por lo que se puede presentar como alternativa a los productores para favorecer la calidad de su producto, sin embargo no existe un esquema de beneficios que pueda alentar a los que practican dicha actividad, lo anterior aunado al precio fluctuante, tiene como resultado un desinterés por parte del productor respecto al tema, lo que hace necesario difundir la importancia de brindar un producto que no signifique un riesgo para el consumidor, debido a esto las instancias que regulan la actividad deben de poner énfasis en temas de aseguramiento de la calidad de leche y productos lácteos.

VII. LITERATURA CITADA

Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., Accensi, F. y Cabañes, F. J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev. Iberoam. Micol 17: 63-68.

Abrego Castillo H. 2011. El sistema familiar de producción de leche bovina en el municipio de Nopalucan, Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados.

Aguhob S, Axtell B. 1998. Procesamiento de lácteos: pruebas para medir la calidad de la leche. Intermedyate Technology Development Group (ITDG-Perú). Asociación Gráfica Educativa p.29.

Alais C y Lacasa A.1985. Ciencia de la leche: Principio de la técnica lechera. Editorial Reverte S.A. de C.V. Cuarta edición.

Altalhi A., Hassan, S. 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. Food Control, 20(10), 913–917. Disponible en <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.01.005>

Álvarez G., Herrera J., Alonso G., Barreras, A. 2012. Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. Archivos de Medicina Veterinaria. 44, 237–242.

Amico D. y Donnelly C. 2010. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. Dairy Science. 93:134–147

Aranceta B. y Serra J.2005. Leche, lácteos y salud. Impacto de los procesos industriales en el valor nutricional de los productos lácteos. Editorial Panamericana. p 127-144.

Arrieta L. 2011. Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia. Disponible en: <http://www.vetzoo.umich.mx/phoca/Tesis/2011/Febrero/> Consultada: Septiembre 2012. ed. Morelia: Tesis Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Araya O. sf. Problemas tóxicos de bovinos asociados con forrajes conservados y piensos. [Disponible en http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR23515.pdf](http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR23515.pdf)

Asmahan A. 2010. Microbiological safety of raw milk in khartoum state, Sudan: 2-khartoum-North City. Pakistan Journal of Nutrition 9(7), 851–853. <http://doi.org/10.3923/pjn.2010.651.653>

Barrera C. y Sánchez B. 2003. Caracterización de la cadena agroalimentaria nacional e identificación de sus demandas tecnológicas. Programa Nacional Estratégico de necesidades de Investigación y de transferencia tecnológica. Guadalajara, Jalisco.

Bernal M., Castelán O., Espinoza O., Estrada J., Rojas Garduño M., Vázquez F. 2007. Determinación de la calidad fisicoquímica de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del Estado de México. *Veterinaria*, México. 38(4). Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42338402>.

Bianchi D., Barbaro A., Gallina S., Vitale N., Chiavacci L., Caramelli M. y Decastelli, L. 2013. Monitoring of foodborne pathogenic bacteria in vending machine raw milk in Piedmont, Italy. *Food Control*, 32(2), 435–439. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2>

Bille P., Haradoeb B., Shigwedha N. 2009. Evaluation of chemical and bacteriological quality of raw milk from neudamm dairy farm in Namibia. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 92(7) 5374

Botero A., Vertel M., Flores M., Medina P. 2012. Calidad composicional e higiénico-sanitaria de leche cruda entregada en época por productores de Galera Sucre. *Vitae*. 19(1).314–316.

Bravo F.2004. El manejo higiénico de los alimentos: Guía para la obtención del distintivo H. Editorial Limusa. 115p.

Briñez W., Valbuena E., Castro G., Tovar A., Ruiz J. 2008. Algunos parámetros de composición y calidad en Leche cruda de vacas doble propósito en el municipio Machiques de Perijá. Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 18 (5), 607 – 617.

Bunting D. (2004). Estrategias nutricionales para cambiar los componentes de la leche. II Seminario sobre alimentación y manejo de ganado lechero. Efecto de la proteína de Soya, los aminoácidos y los microminerales en la producción. 23 de Junio, Querétaro, Qro. y 25 de junio, Guadalajara, Jal. 2004. México.

Caicedo R., Garita G. y Calderón N. 2011. Salud animal de una microcuenca lechera bajo el sistema de traspatio Puebla México. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 1: 323-326. Disponible en: www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Caicedo2011_1_323_326.pdf

Calderón A., García F. y Martínez G. 2006. Indicadores de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista MVZ*. Córdoba; 11(1):725-737. Disponible en: www.redalyc.org/pdf/693/69311106.pdf

Calderón A., Rodríguez V., Arrieta G., Martínez N. y Vergara, O. 2012. Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema

doble propósito en montería (Córdoba). *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 15(2): 399–402.

Calderón Rangel A., Rodríguez Virginia C., Martínez N. 2013. Determinación de adulterantes en leches crudas acopiadas en procesadoras de queso en Montería (Córdoba). *Orinoquia*. 17(2). 202- 206.

Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones_alimentos/

Camacho K., Contreras Y., Torres P. 2007. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expendida en el municipio de Pamplona, Colombia. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona* 5(2), 49–57.

Cámara Nacional de Industriales de la leche. 2011. “El libro blanco de la leche y los productos lácteos”. Primera Edición.

Caravaca R., Castel G., Guzmán G., Delgado P., Mena G. y Alcalde A. 2003 Bases de la producción animal. Secretariado de Publicaciones de la universidad de Sevilla. 452-460.

Cepero O., Salado J., Aguilar J., González A. 2005. Magnetización: una posible alternativa en la conservación de la leche cruda sin refrigerar en condiciones de desastres. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVE*. 6(3).

Cervantes F., Cesín A., Mamani I. 2013. La calidad estándar de la leche en el estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4(1): 75–86.

Cesín V., Aliphath F M., Ramírez V., Herrera H., Martínez C. 2007. Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México. *Técnica Pecuaria en México*, 45(1): 61-76.

Churchill R., Lee H., Hall C. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*. 64, 141–170.

Claeys W., Cardoen S., Doube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., Dieven D., Imberechts H., Thiange P., Vandenplas Y., Hermann L. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control* 31: 251-262

Codex Alimentarius. 2004. Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos. CAC/RCP 57. Segunda edición. Disponible en www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_057s.pdf

Comisión Nacional del Agua. 2008. Estadísticas del Agua en México. 1a. Edición.

Comisión Nacional del Agua. 2010. Estadísticas agrícolas de los Distritos de riego. Año agrícola 2008-2009.

Elmoslemany M., Keefe G., Dohoo R., Dingwell R. 2009. Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 92(9): 4239–4248. <http://doi.org/10.3168/jds.2008-1751>

Food and Agricultural Organization. 2003. Examen de las políticas sobre productos alimenticios básicos. 98. Disponible. <http://www.fao.org/docrep/003/y0911s/y0911s00.htm>

Fuentes C., Ruíz R., Sánchez G., Ávila R. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 10: 419–432.

Fulya T. 2011. Microbiological and chemical properties of raw milk consumed in Burdur. *Journal of animal and veterinary advances* 10(5): 635-641

García H., Aguilar V., Leuvano G. y Cabral M. 2005. La globalización productiva y comercialización de la leche y sus derivados. Plaza y Valdés SA de CV.

García H. 2014. Recepción y almacenamiento de la leche y otras materias primas. INAE0209. IC Editorial p.334.

Godic T. y Golc T. 2008. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slovenica* 92(1): 61–74.

Guifarro O. 2005. Impactos en la salud humana por el consumo de leche y lácteos contaminados. Disponible en: www.paselo.rds.hn/document/festival_de_la_leche/salud_humana_%20cons

Hernández A., Alfaro I., Arrieta R. 2003. Microbiología Industrial. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia. p.65

Hernández A. 2010. Composición y calidad nutritiva de los alimentos: Leche y sus derivados. Editorial Panamericana Tomo II segunda edición.

Hernández C., Aguilera A., Castro E. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4).

Hurtaud C. 2004. Alimentation et qualité du lait des fromages et du beurre (curso). Master Recherche Agrocampus Rennes Francia. INRA, UMR Production de lait, Saint Guilles, Francia.

Hill B., Smythe B., Lindsay D., Shepherd J. 2012. Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology* 157: 305–308

Ibtisam E., ElZubeir y I. A. A. 2007. The hygienic quality of raw milk produced by some dairy farms in Khartoum State, Sudan. *Research Journal of Microbiology*, 2(12), 988–991.

INAFED. 2014. Enciclopedia de los Municipios. Disponible <http://inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM29tlaxcala/index.html>.

INEGI. 2007. VIII Censo Agrícola, Pecuario y Forestal. Disponible en http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/metodologias/censo_agrope/2007/metodo_2007/SinMetCAGyF.pdf

INEGI. 2008. Estadísticas de Mortalidad. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>

Jamali H., Radmehr B. y Thong L. 2013. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control* 34(1): 121–125. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont>

Kalmus P., Kramarenko T., Roasto M., Meremäe K., Viltrop A. 2015. Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia. *Food Control* 51:135-139

Lejeune J. y Rajala P. 2009. Unpasteurized milk: a Continued Public Health Threat. *Clinical Infectious Diseases* 48(1): 93-100.

LICONSA. 2004. Manual de Normas de control de Calidad de leche cruda. VST-DP-NR-005.

Mamani J 2010. Calidad de leche: Evaluación de la calidad higiénica de las muestras de leche cruda de establos en el servicio oficial de calidad lechera - Majes- 2009, por el método de tiempo de reducción de azul de metileno-TRAM. (Perú). Consultado el 5 de enero del 2010. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/industria-lechera/articulos/calidad-lecheevaluacion-calidad t2928/472-p0.htm>

Mariscal P., Ibáñez R. y Gutiérrez M. 2013. Características microbiológicas de leche cruda de vaca en mercados de abasto de Trinidad, Bolivia. *Agrociencias Amazonia* 1(2): 18–24.

Martínez B., Álvarez M. y Del Valle MA.1999. Dinámica del sistema lechero mexicano en el marco regional y global. Plaza y Valdes SA de CV, p 412

Mataix V. 2013. Enfermedades más frecuentes producidas por el consumo de alimentos contaminados. *Nutrición para educadores*. Ediciones Díaz de Santos, pag. 629.

Maza P. y Legorreta C. 2011. Generalidades de la leche y los productos lácteos. El libro blanco de la leche y los productos lácteos. CANILEC.p 26.

MedlinePlus. 2011. National Library of Medicine. Disponible en <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/>

Mhone T., Matope G. y Saidi P. 2011. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 151(2): 223–228. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.028>

Millogo V., Svennersten S., Ouédraogo G., Agenäs S. 2010. Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food Control* 21(7): 1070–1074. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.029>

Morales S. 1999. Factores que afectan la composición de la leche. *TecnoVet*, 5 (1) Recuperado de <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5224/5104>

Negri L.(2005). Manual de referencias Técnicas para el logro de leche de calidad. INTA 2da edición. Disponible en <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>.

NMC Annual Meeting Proceedings. 2004. Global Milk Quality. <https://www.nmconline.org/>

NMX-F-700-COFOCALEC-2012 - Sistema producto leche, alimento, lácteo, leche cruda de vaca especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos.

Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de listeria monocytogenes.

Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.

Orberá, 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. Rev. Cubana de Salud Pública, 30(3): ISSN 0864-3466. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S086434662004000300016&script=sci_arttext#cargo

Olivas E. y Alarcón M. 2012. Manual de Prácticas. Laboratorio de Microbiología Médica. <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011298.pdf>

Ortiz S., García T y Morales T. (2005). Manual bovinos leche: manejo de Bovinos productores de leche. Colegio de Postgraduados. SAGARPA.

Osorio M. 2010. Producción de la leche en la Zona Alta de Veracruz. Primer Foro sobre Ganadería lechera de la Zona alta de Veracruz.

Pascual A y Calderón V. 1999. Microbiología alimentaría: Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ediciones Díaz Santos pp.464

Pedroza H. y Dikovskiy. 2006. Sistema de Análisis Estadístico SPSS. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura (IICA). LITONIC 57p.

Pereira G. 2014. Leche y productos lácteos en la especie humana. Jornada ExpoCulun.2015. Disponible en <http://www.consorciolachero.cl/industria-lactea/wp-content/uploads/2015/05/ExpoColun-C-Barrera.pdf>

Pérez L. 2011. La producción de leche. El libro blanco de la leche y los productos lácteos. CANILEC. 10p.

Pinzón G. 2001. Mastitis Bovina: Tipos, agentes causales y diagnósticos. Revista de Difusión de Tecnología Agrícola y Pesquera del FONAIAP, Núm. 31.

Pyz-Lukasik R., Paszkiewicz W., Tatara M., Brodzki P. y Bełkot, Z. 2015. Microbiological quality of milk sold directly from producers to consumers. Journal of Dairy Science 98(7): 4294–4301. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-9187>

Ramirez A. 1995. Calidad de la leche y algunos problemas de adulteración. Dinámica del sistema lechero en el marco regional y global. Plaza y Valdés. Primera edición. 362p

Revilla Aurelio. 1982. Tecnología de la leche. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2da edición p. 20-40.

Reyes A. y Soltero G. 2004. Microbiología de la leche cruda de vaca. Disponible en <http://infolactea.com/biblioteca/microbiologia-de-la-leche-cruda-de-vaca/>

Reyes G., Molina S. y Coca V. 2010. Calidad de la leche cruda. Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz. Disponible http://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDELALECHE_CRUDA.pdf

Rodríguez R. y Magro S. 2008. Bases de la alimentación humana. Editorial Netbiblo, S.L. La Coruña.110p.

Romero C. 2007. Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial panamericana. Tercera edición. 108p.

SAGARPA, 2010. Claridades Agropecuarias. Un horizonte ASERCA del mercado agropecuario.207. ISSN 0188-9974.

Salas S. 2008 .Normas de higiene y seguridad alimentaria. Nutrición y dietética Elsevier España. 2da Edición. 51-53 pp.

Secretaría de Economía/Dirección General de Industrias Básicas. 2012. Análisis del Sector Lácteo en México.

Secretaria de Salud. 2012. Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales. Disponible en https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/infecciosas-intestinales_-_junio12.pdf

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Agricultura, producción anual. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Producción pecuaria anual. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-avance-de-la-produccion-pecuaria-por-estado/>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. Resumen Nacional. Producción, precio, valor, animales sacrificados y peso. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Boletín de leche. Enero-Marzo. Disponible en http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/boletinlechenero-marzo_2015.pdf

SEMARNAT.2006. Programa Nacional Hídrico 2007-2012. Disponible en http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/PNH_05-08.pdf

Stulova I., Adamberg S., Krisciunaite T., Kampura M., Blank L., Laht T. 2010. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. *Letters in Applied Microbiology* 51(6): 683–690. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02951.x>

Torkar K. y Vengušt A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19(6): 570–577. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.008>

Tremonte P., Tipaldi L., Succi M., Pannella G., Falasc L., Capilongo V., Sorrentino E. 2014. Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *Journal of Dairy Science* 97(6): 1–7.

Valero L., Rivera S., Valbuena E., Boscán L., Valeris R., Castro G., Briñez W. 2012. Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. *Revista Científica Redalyc*

Vásquez S. 2010. Plan de marketing: estrategias de comercialización. Caso: leche la ordeña - Colima, México" en *Observatorio de la Economía Latinoamericana*, N° 130. Disponible en <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/2010/jrvs.htm>

Villegas G. 2003. Manual de prácticas de Tecnología de alimentos de origen animal (leche y carne). Universidad Autónoma Chapingo. 11p.

World Health Organization. 2008. Estadísticas Sanitarias Mundiales. Disponible en http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ES_WHS2008_Full.pdf

World Health Organization. 2014. Estadísticas Sanitarias Mundiales. Disponible en http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ES_WHS2014_Full.pdf

VIII. ANEXOS

DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

Coliformes Totales en placa

El método permite poner de manifiesto el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales son identificados mediante el viraje del indicador de pH y precipitación de las sales biliares.

Material

- Cajas Petri de vidrio
- Puntas estériles
- Micropipeta 1000mL
- Vortex
- Agitadores de vidrio

Reactivos

- Agar Rojo Violeta Bilis
- Agua destilada

Procedimiento (diagrama 1)

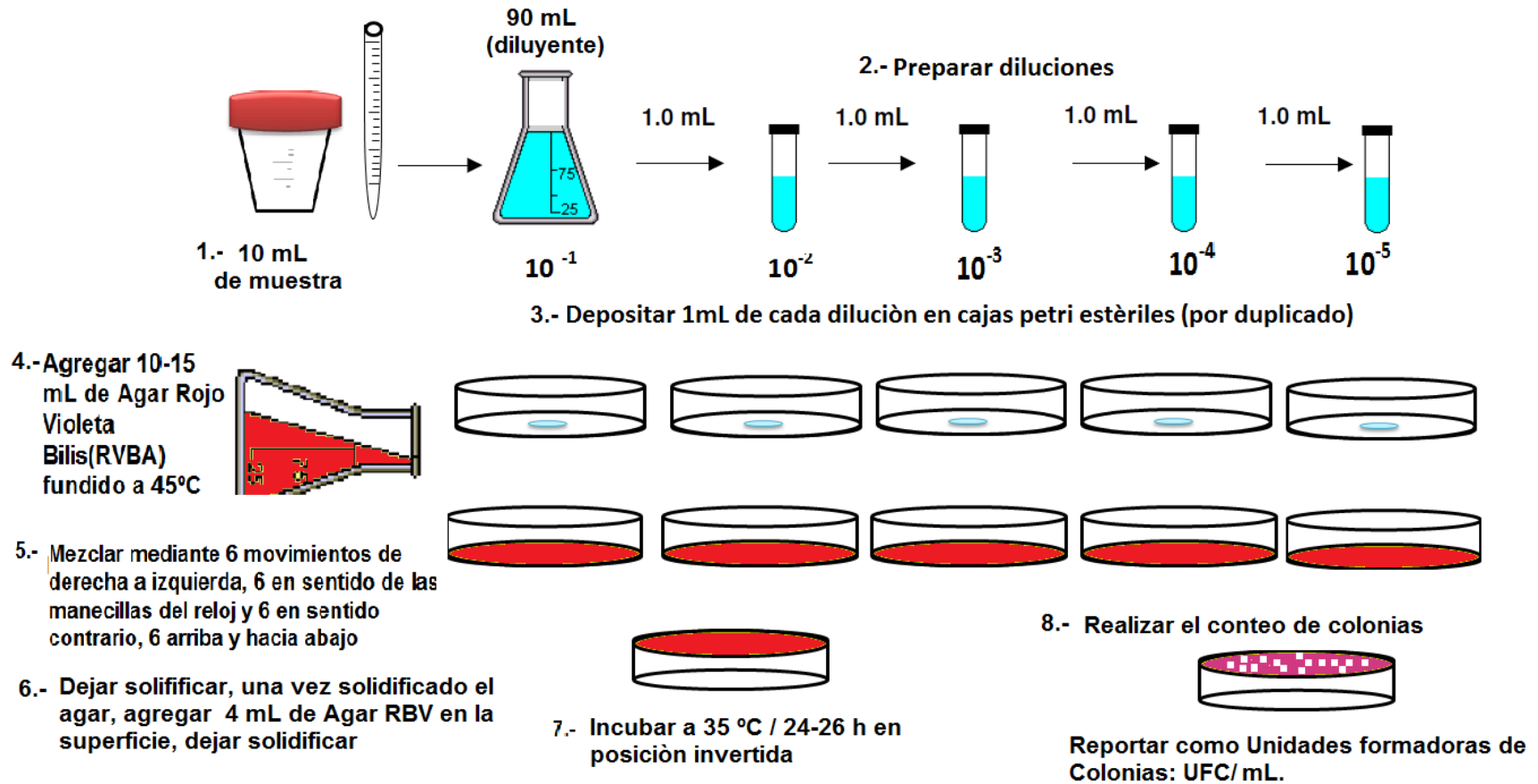
La preparación de la muestra se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

Cada una de las placas fue marcada con datos de la muestra problema.

1. Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de cada una las diluciones (10^{-1} hasta 10^{-5}), utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
2. Verter 15 ml del Agar Rojo Violeta Bilis (RVBA), previamente hidratado y esterilizado de acuerdo al procedimiento del fabricante con una temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

3. Mezclar el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada.
4. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.
5. Adicionalmente reparar una caja control (testigo) con 15 ml de medio para verificar la esterilidad del medio y de la placa.
6. Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.
7. Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.
8. Después del periodo especificado para la incubación, realizar el conteo de colonias con el contador de colonias considerando ciertas especificaciones (ver cuadro de especificaciones para conteos microbiológicos)
9. Se seleccionaron las placas que contuvieron entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, con un vire de indicador debido a la precipitación de las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.
10. Se separaron las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas y se contaron las colonias presentes.
11. Se calculó el número de coliformes por mililitro, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución.

Diagrama 1. Recuento de bacterias coliformes totales en placa (NOM-113-SSA1-1994)



Bacterias Mesofílicas Aerobias

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

Material

- Cajas Petri de vidrio
- Puntas estériles
- Micropipeta 1000mL
- Vortex
- Agitadores de vidrio

Reactivos

- Agar Cuenta Estándar
- Agua destilada

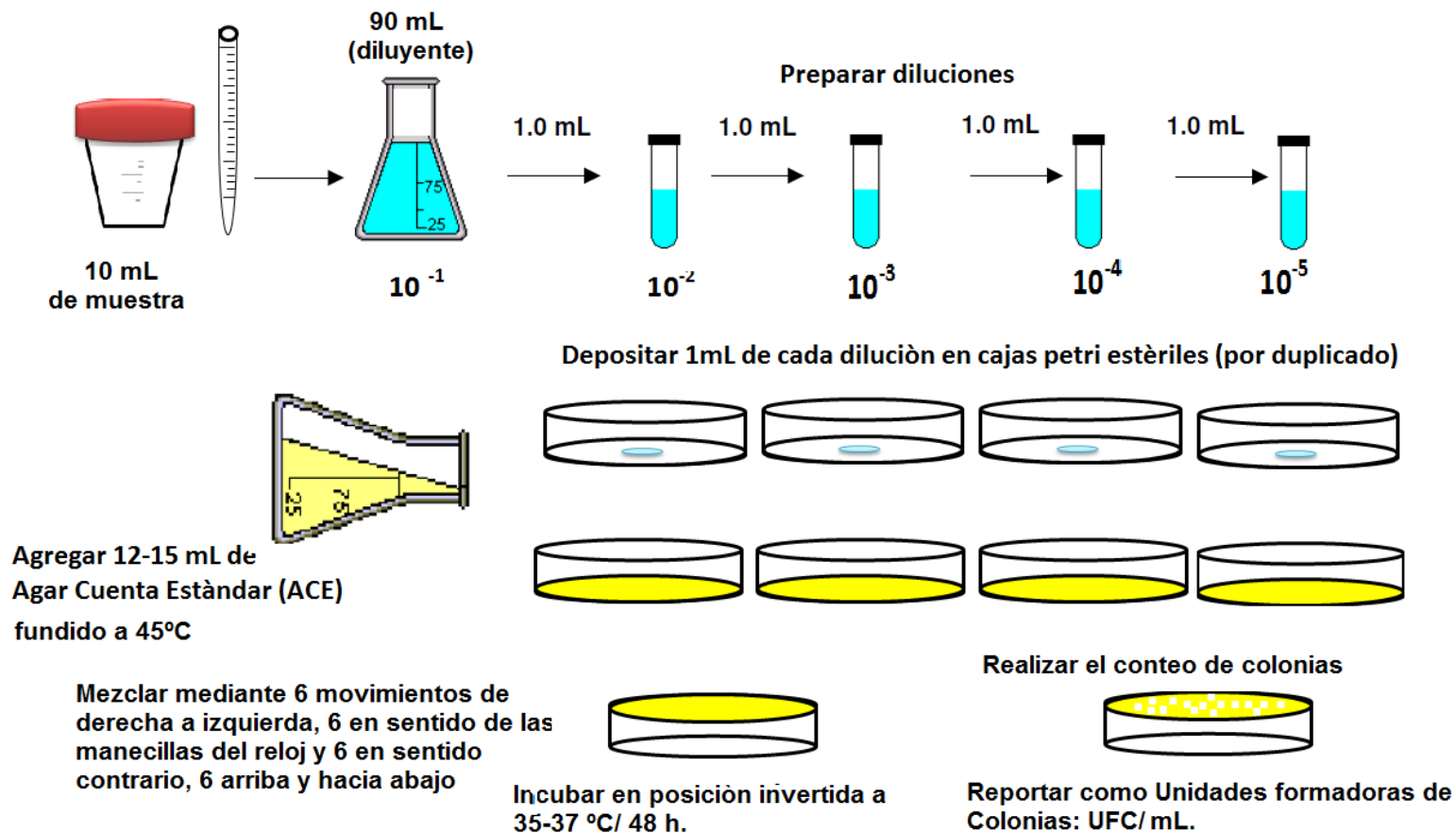
Procedimiento (diagrama 2)

1. La preparación de la muestra se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".
2. Las diluciones se colocaron en cada una de las cajas por duplicado anotando los datos de identificación pertinentes.
3. Agregar 12 a 15 mL de Agar Cuenta Estándar (Bioxon®), mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y

horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

4. Incluir una caja sin inóculo solo con diluyente y medio preparado como testigo de esterilidad.
5. Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por 48 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.
6. Finalizado el tiempo de incubación se realizó en conteo de las cajas con contenido de entre 25 a 250 colonias.

Diagrama 2. Recuento de Bacterias Mesofilicas Aerobias (NOM-092-SSA1-1994)



Mohos y Levaduras

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

Material

- Cajas Petri de vidrio
- Puntas estériles
- Micropipeta 1000mL
- Vortex
- Agitadores de vidrio

Reactivos

- Agar Papa Dextrosa (Bioxon®)
- Agua destilada

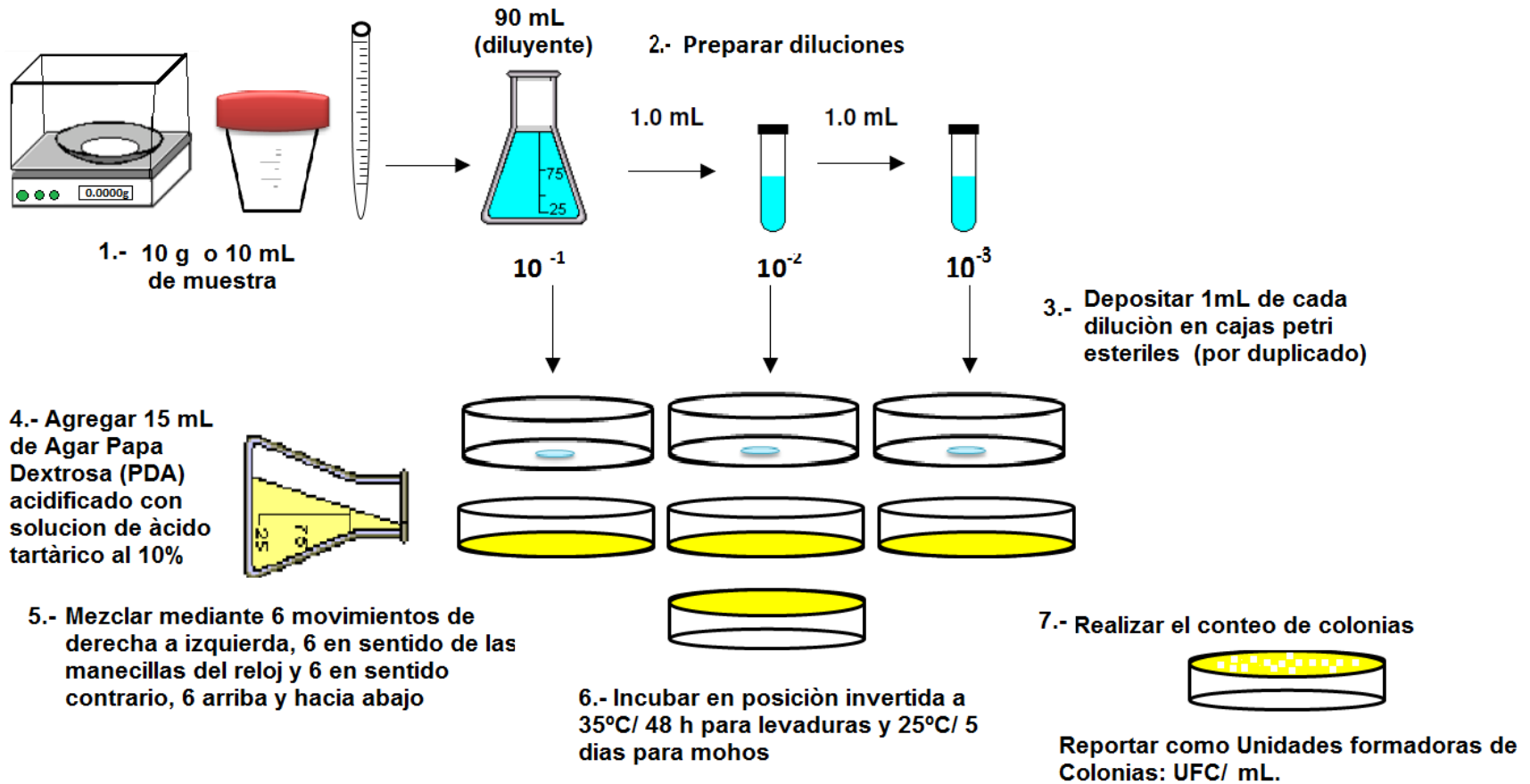
Procedimiento (diagrama 3)

- Colocar por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
- Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
- Verter de 15 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
- Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido

contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

- Preparar una caja control con 15 ml de medio, para verificar la esterilidad.
- Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, en el caso de mohos y a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Contar las colonias de cada placa después 5 días de incubación para mohos y 48 horas en el caso de levaduras.
- Considerar cajas con 10 a 150 colonias en ambos casos con crecimiento característico de cada grupo.

Diagrama 3. Conteo de mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994)



Staphylococcus aureus

En este método se permite estimar el contenido de Staphylococcus aureus en placas de medio selectivo y diferencial mediante la confirmación con la prueba de coagulasa

Material

- Cajas Petri de vidrio
- Puntas estériles
- Micropipeta 1000mL
- Vortex
- Agitadores de vidrio

Reactivos

- Agar Baird Parker(Bioxon®)
- Suplemento Yema de huevo – Telurito de potasio
- Agua destilada

Procedimiento (Diagrama 4)

Se depositó 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker de cada una de las diluciones (10^{-1} a 10^{-4}).

El inóculo se distribuyó sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

La placas se mantuvieron en la en posición horizontal hasta que el inóculo se absorbió por el agar.

Una vez efectuado dicho proceso las placas se incubaron durante 45 a 48 h a 35°C.

Para realizar los conteos se consideraron las placas que tuvieron entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*. (Colonias negras , circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm con zona opaca con halo claro)

Se seleccionaron dichas colonias y se les realizó la prueba de coagulasa.

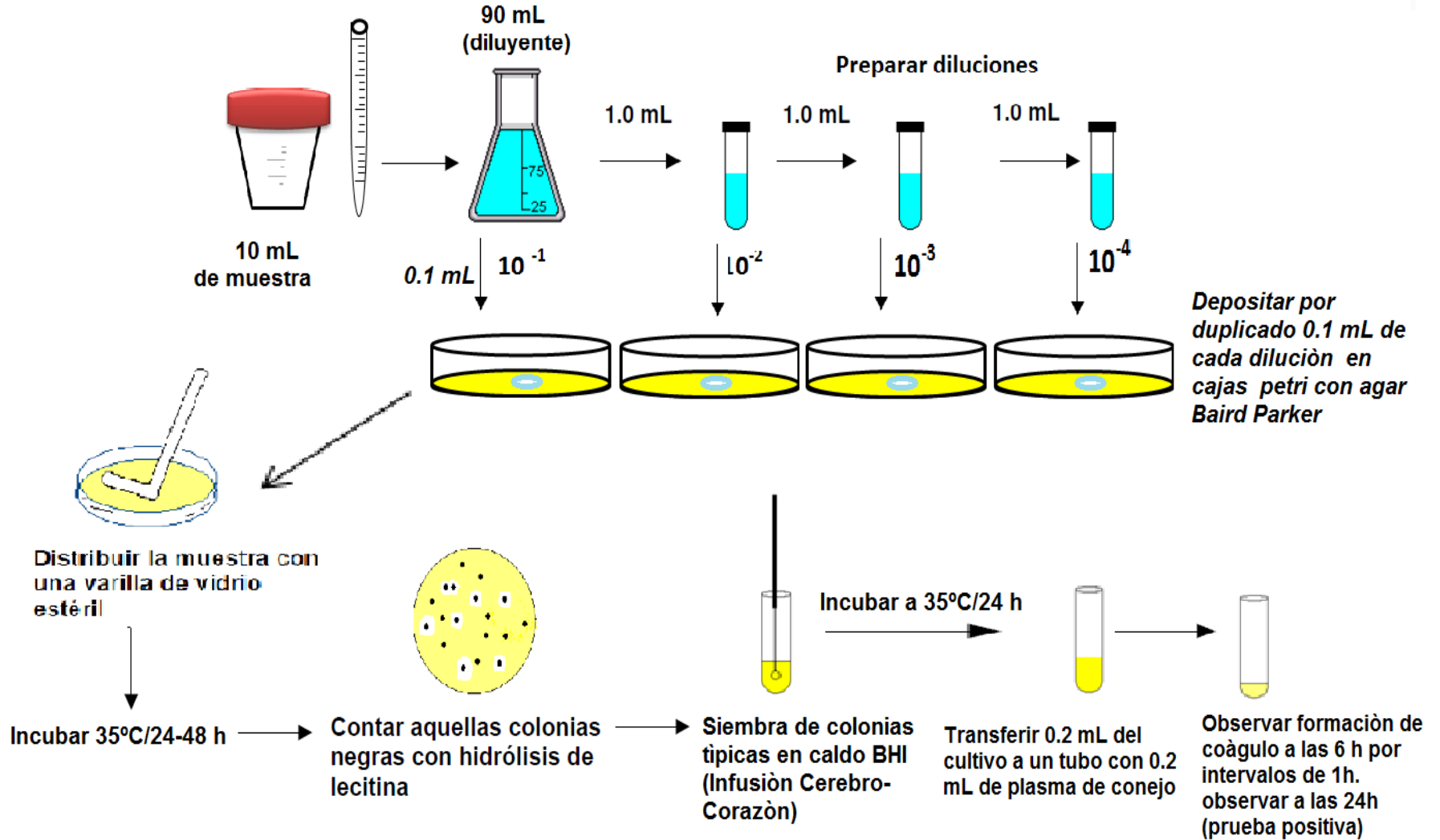
La prueba de coagulasa se realizó mediante el siguiente procedimiento:

Previamente las colonias con dichas características se sembraron cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón y se dejaron incubar a 35°C durante 24 h.

Posteriormente se a dichos tubos se les adicionó 0,2 ml de plasma de humano diluido con solución salina estéril.

Se incubaron a 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h hasta formarse el coágulo (prueba positiva en la formación de éste).

Diagrama 4. Determinación de *Staphylococcus aureus* en leche (NOM- 115-SSA1- 1994)



E. coli

La determinación de *E. coli* se realizó mediante el método de Prueba CCAYAC- M-004/8 que permite establecer la estimación de la densidad de coliformes fecales y presencia de *E. coli* mediante la técnica del número más probable.

Material

- Tubos con rosca
- Puntas estériles
- Micropipeta 1000mL
- Vortex
- Campanas de durham
- Lámpara de luz UV

Reactivos

- Caldo Lauril Sulfato (Bioxon®)
- Caldo *E. coli* MUG
- Agua destilada

Procedimiento (diagrama 5)

Para determinar la presencia de bacterias *E. coli* se utilizó la técnica de Número Más Probable (NMP), que consistió en realizar diluciones 10^{-1} a 10^{-3}

Se depositó 1 ml de cada dilución a cada uno de los tres tubos, conteniendo 10 ml de Caldo Lauril Sulfato esteril con tubo de Durham invertido para determinar la presencia de gas y se incubaron durante 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

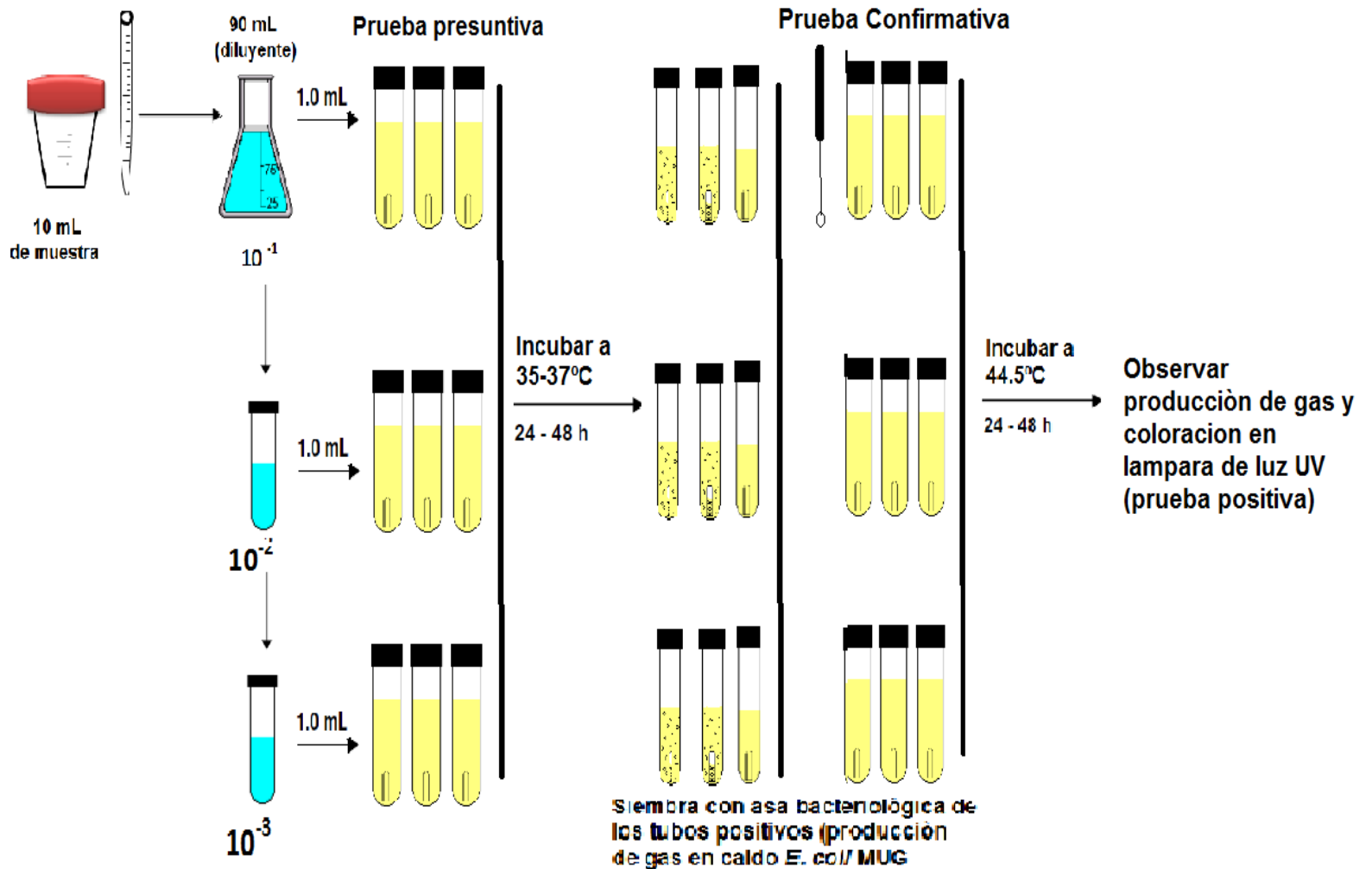
Después del tiempo de incubación se revisaron los tubos que presentaron formación de gas y en los que se observó la presencia de burbujas en los tubos de

Durham y aquellos que fueron negativos a la presencia de gas, se incubaron 24 horas más.

Transcurrido este tiempo, se seleccionó la dilución más alta en la que se observó la presencia de gas en los tres tubos con caldo lactosado y se tomaron dos asadas y se sembraron en los tubos con Caldo *E. coli* MUG (Bioxon®), se incubaron por 24 h a 44.5 °C.

Después de la incubación se revisaron los tubos con producción de gas y se observaron bajo una lámpara de luz UV para confirmar fluorescencia (prueba positiva para *E. coli*).

Diagrama 5. Recuento de *E.coli* por la técnica del Número más probable (NMP) (CCAYAC-M-004/8)



Salmonella spp

Para realizar la detección de Salmonella se consideran 4 pasos básicos:

Preenriquecimiento: Se utilizó un medio no selectivo (Caldo Lactosado)

Enriquecimiento selectivo con el fin de incrementar las células presentes en el medio (Caldo Selenito Cistina)

Selección en medios sólidos: se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a Salmonella y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de Salmonella.

Material

- Tubos con rosca
- Puntas estériles
- Micropipeta 1000mL
- Vortex
- Asas bacteriológicas
- Placas de plástico
- Microscopio

Reactivos

- Caldo Lactosado (Bioxon®)
- Caldo Selenito Cistina (Difco®)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Bioxon®)
- Agar Verde Brillante (Bioxon®)
- Agar Hierro Lisina- LIA (Bioxon®)

- Agar Triple azúcar y hierro(Bioxon®)
- Agar Citrato de Simmons (Bioxon®)
- Medio MIO (Bioxon®)
- Agua destilada
- Azul de metileno
- Lugol
- Alcohol-cetona
- Safranina

Procedimiento (diagrama 6)

Para el enriquecimiento se sembraron 25 mL. de leche en un frasco con rosca con un contenido de 225 mL de caldo lactosado, se mezcló y se dejó incubar por 24 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

En el enriquecimiento, de los frascos previamente incubados, se tomó 1mL y se transfirió a un tubo con rosca con 10 mL de caldo selenito cistina.

Siembra en medios selectivos: del tubo con crecimiento (tubo con coloración rojiza), se agitó y se tomó una asada que fue sembrada por estría cruzada en los medios selectivos agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar verde brillante (VB), se dejaron incubar durante 24 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de Salmonella, de acuerdo con las siguientes características:

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Identificación bioquímica

Esta prueba se realizó a partir de colonias aisladas en medio selectivo (VB o XLD)

Se tocó el centro de cada colonia y se inocularon en los tubos uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo, adicionalmente se sembró agar citrato de Simmons solo inoculando la superficie y medio MIO (movilidad, indol y ornitina) por punción; todos los tubos se incubaron por 24 ± 2 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se observó el crecimiento en tubos considerando las siguientes reacciones en cada prueba.

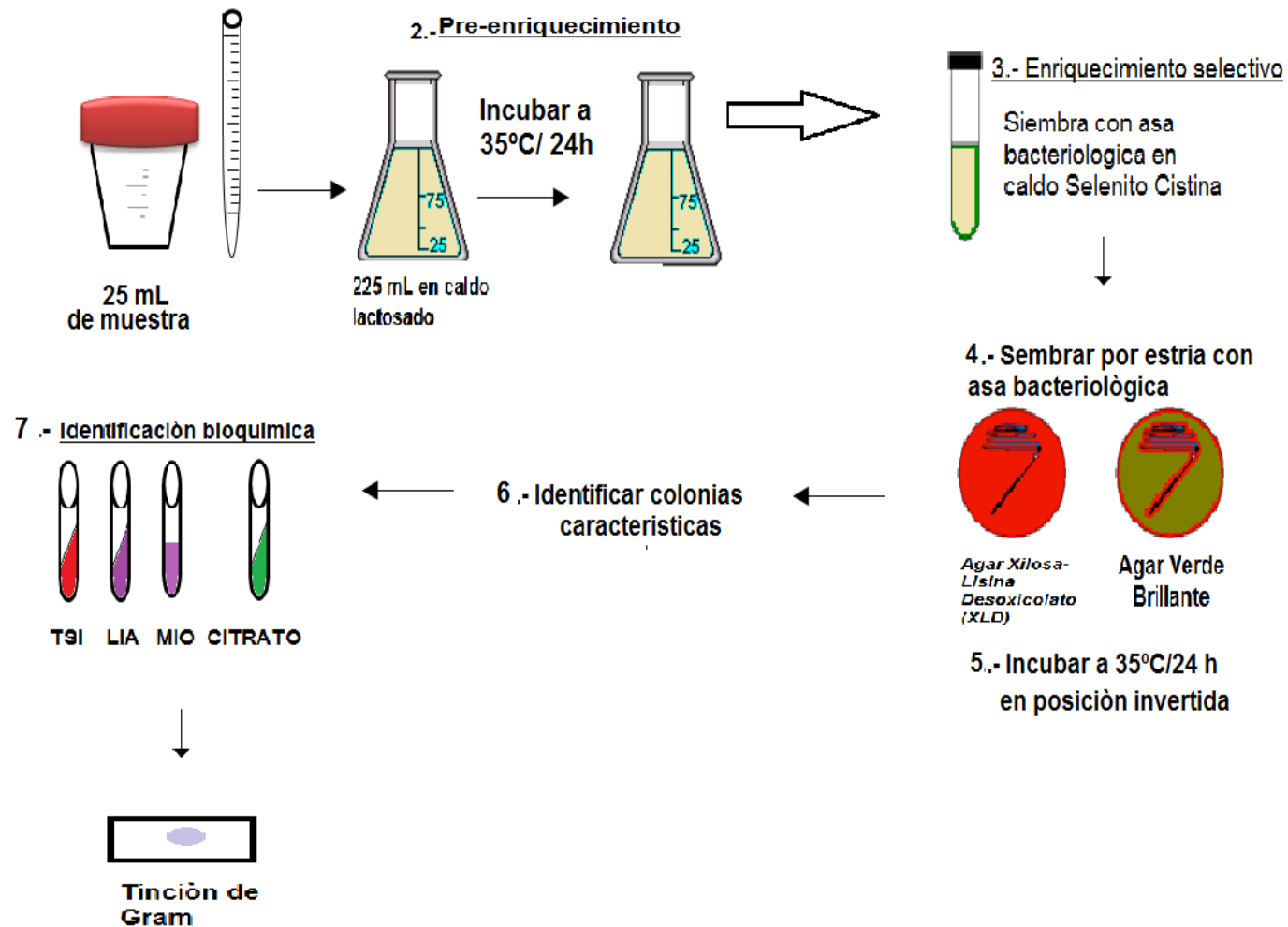
En el Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

En el Agar LIA, se observó intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina, con producción de ácido Sulfhídrico (coloración negra)

Agar citrato Simmons: no se observó crecimiento (sin cambio de color), por lo tanto fue una prueba negativa.

Se realizó la Prueba Movilidad, Indol y Ornitina. Finalmente del crecimiento en tubo se realizó tinción de Gram para identificar la morfología (bacilos gram negativos).

Diagrama 6. Determinación de *Salmonella spp* (NOM-114- SSA1- 1994)



Listeria spp

El método para detectar la presencia de *L. monocytogenes* se basa en el aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria* spp., principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de este género.

Material

- Asas bacteriológicas
- Placas de plástico
- Microscopio

Reactivos

- Caldo Lactosado (Bioxon®)
- Agar Oxford Modificado (Difco®)
- Agua destilada
- Azul de metileno
- Lugol
- Alcohol-cetona
- Safranina

Procedimiento (diagrama 7)

Enriquecimiento

Se colocaron 25 ml de la muestra en un recipiente conteniendo 225 ml de medio de enriquecimiento (caldo lactosado) y se incubó por 48 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Aislamiento

Después de la incubación se sembró en medio Oxford Modificado mediante estría cruzada y se incubaron las placas en posición invertida durante 24 a 48h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se observó el crecimiento en el medio con colonias negras, con halo negro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro.

Finalmente se realizó una tinción de gram de las colonias sospechosas para confirmar la morfología.

Diagrama 7. Determinación de *Listeria* spp (NOM-143-SSA1-1995)

