

5  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"



DISEÑO DE UN KIT DE RESAZURINA PARA EL CONTROL  
MICROBIOLOGICO DE LA LECHE FLUIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERA EN ALIMENTOS  
P R E S E N T A

RAFAELA GUADALUPE REYES GALLARDO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN  | 1  |
| I. INTRODUCCION  |    |
| 1.1 Panorama de la producción mundial de leche                         | 2  |
| 1.2 Panorama actual de la producción de leche en México                | 7  |
| 1.3 Problemática y factores que limitan la actividad<br>lechera        | 10 |
| 1.4 Problemas en la producción y conservación de la leche              | 13 |
| 1.5 Principales factores que alteran la calidad de la<br>leche         | 15 |
| 1.5.1 Bacterias  | 15 |
| 1.5.2 Enzimas  | 18 |
| 1.6 Sistemas de industrialización de la leche                          | 19 |
| 1.6.1 Sistema de pasteurización lenta                                  | 20 |
| 1.6.2 Sistema de pasteurización rápida                                 | 21 |
| 1.6.3 Sistema de ultrapasteurización                                   | 21 |
| 1.6.4 Influencia de la temperatura de pasteurización<br>sobre la leche | 23 |

|   |    |
|---|----|
| 1.7 Fundamentos de los métodos de reducción de colorantes como indicadores de la calidad microbiológica de la leche | 25 |
| 1.7.1 Factores bacterianos determinantes en las pruebas de reducción de colorantes                                  | 26 |
| 1.7.2 Descripción de la naturaleza química de la resazurina   | 29 |
| 1.8 Nuevas alternativas para la determinación de la calidad microbiológica de la leche.                             | 31 |
| II. OBJETIVOS   | 35 |
| III. HIPOTESIS DE TRABAJO   | 35 |
| IV. MATERIALES Y METODOS  | 37 |
| 4.1 Manejo de las muestras  | 37 |
| 4.2 Pasteurización de la leche  | 39 |
| 4.3 Determinación de la calidad microbiológica de la leche  | 40 |
| 4.3.1 Método de recuento en placas  | 40 |
| 4.3.2 Método de reducción de la resazurina normal   | 40 |
| 4.3.3 Método del Kit de resazurina  | 42 |

|   |    |
|---|----|
| V. RESULTADOS                                 | 46 |
| VI. DISCUSION                                 | 61 |
| VII. CONCLUSIONES                             | 65 |
| VIII. PRE-FACTIBILIDAD ECONOMICA DEL PROYECTO | 69 |
| IX. BIBLIOGRAFIA                              | 79 |

## CONTENIDO DE CUADROS, GRAFICAS Y FIGURAS

Cuadro 1. Producción mundial de leche e incremento de la población.

Cuadro 2. Producción de leche por países. 1956-1979

Cuadro 3. Distribución mundial de la producción de leche

Cuadro 4. Inventario y producción de la ganadería lechera nacional especializada y no especializada. 1985

Cuadro 5. Importación de leche descremada deshidratada.

Cuadro 6. Condiciones de tiempo-temperatura de almacenamiento pre y post-pasteurización de las muestras de leche empleadas en la etapa experimental.

Cuadro 7. Resultados de la etapa experimental.

Cuadro 8. Resumen de los resultados estadísticos de las muestras de leche estudiadas.

Figura 1. Estructura química de la resozurina.

Figura 2. Mecanismo de reacción de la resozurina.



Gráfica 7. Tiempo de vire al rosa en el kit y log<sup>10</sup> cuentas totales para las muestras de leche

L, LP T, T; L, LP T, T.  
16 16 A R 24 24 A R

Gráfica 8. Tiempo de vire al rosa en las pruebas de la resazurina y del Kit de resazurina para las

muestras de leche LP T; LP T; LP T;  
0 R 8 R 16 R  
LP T.  
24 R

Gráfica 9. Tiempo de vire al rosa en el kit y log<sup>10</sup> cuentas totales para muestras de leche LP T,  
0 R

LP T; LP T; LP T.  
8 R 16 R 24 R

Gráfica 10. Tiempo de vire al rosa en las pruebas de resazurina y del Kit de resazurina para las

muestras de leche L, LP T; L, LP T; L,  
0 0 A 8 8 A 16  
LP T; L, LP T.  
16 A 24 24 A

Gráfica 11. Tiempo de vire al rosa en el kit y log<sup>10</sup> cuentas totales en las muestras de leche L,  
0

LP T; L, LP T; L, LP T; L, LP T; L, LP T.  
0 A 8 8 A 16 16 A 24 24 A

## RESUMEN

Se diseñó un kit en base a la prueba de la resazurina en estado sólido, con el objetivo de determinar la calidad microbiológica de la leche bronca, pasteurizada y almacenada a temperatura ambiente o de refrigeración. Se probó en muestras de leche, tratadas bajo condiciones representativas del manejo en la granja, en la pasteurizadora y en los centros de consumo.

La prueba de resazurina normal y el método de recuento en placas fueron usados con fines de comparación.

Los resultados indican una elevada correlación en el tiempo de vire al rosa entre el kit de resazurina y la prueba de resazurina normal y una relación inversa entre el número de cuentas bacterianas y el tiempo de vire al rosa en el kit de resazurina.

Nuestros resultados sugieren la posibilidad de reemplazar la prueba de la resazurina efectuada de acuerdo al método tradicional por el kit propuesto.

## 1.1 Panorama de la producción mundial de leche

La producción mundial de leche se ha incrementado substancialmente durante los últimos 25 años (cuadro 1); sin embargo, este incremento no ha sido suficiente para incrementar las disponibilidades de leche per-capita en el mundo. En efecto, la producción de leche se incrementó en un 49 % entre 1956 y 1979, pero la población aumentó en un 53 % en este mismo periodo. Este fenómeno se ilustra en el cuadro 2, (1).

A pesar de esta tendencia global, en algunas regiones geográficas particulares, el incremento en la producción de leche ha sido muy importante en los últimos 25 años.

En México por ejemplo, la producción de leche aumentó de 1 985 millones de litros en 1956 a 6 250 millones de litros en 1979; lo que representa un incremento del 319.5 %, siendo uno de los pocos países en que el crecimiento de la producción de leche fué mayor al de la población durante el periodo considerado. Esta situación se ilustra con el cuadro 2.

## PRODUCCION MUNDIAL DE LECHE Y CRECIMIENTO DE LA POBLACION

| Región                 | Vacas   | Incremento        |      | Población Humana  | Incremento % |
|------------------------|---------|-------------------|------|-------------------|--------------|
|                        |         | Total             | %    |                   |              |
|                        |         | 1956<br>(1,000 1) |      | 1956<br>(1,000 1) |              |
| Africa                 | 8,700   | 11,200            |      | 228,100           |              |
| Norte y Centro América | 68,800  | 68,900            |      | 244,200           |              |
| Sur América            | 14,000  | 14,700            |      | 126,900           |              |
| Asia                   | 17,600  | 37,500            |      | 1,509,300         |              |
| Europa                 | 111,400 | 116,100           |      | 411,500           |              |
| Oceanía                | 11,800  | 11,800            |      | 14,950            |              |
| URSS                   | 47,464  | 49,111            |      | 200,200           |              |
| Mundial                | 279,800 | 309,300           |      | 2,735,150         |              |
|                        |         | 1979<br>(1,000 1) |      | 1978<br>(1,000)   |              |
| Africa                 | 10,162  | 13,162            | 20.4 | 431,862           | 89.3         |
| Norte y Centro América | 73,238  | 73,546            | 6.7  | 356,447           | 46.0         |
| Sur América            | 25,237  | 25,405            | 72.8 | 232,578           | 83.3         |
| Asia                   | 32,673  | 63,611            | 69.6 | 2,399,390         | 59.0         |
| Europa                 | 174,280 | 179,203           | 54.4 | 478,833           | 16.4         |
| Oceanía                | 12,428  | 12,428            | 5.3  | 22,134            | 43.1         |
| URSS                   | 92,800  | 93,300            | 90.0 | 261,200           | 30.5         |
| Mundial                | 420,818 | 460,978           | 49.0 | 4,182,444         | 52.9         |

FUENTE : FAO

## PRODUCCION DE LECHE POR PAIS

|                        | Número/vacas<br>(1,000) |         | Leche anual<br>Rmto./vaca (kg) |       | Total Prod. Leche<br>(1,000 l) |         |
|------------------------|-------------------------|---------|--------------------------------|-------|--------------------------------|---------|
|                        | 1956                    | 1979    | 1956                           | 1979  | 1956                           | 1979    |
| Africa                 |                         | 20,856  |                                | 487   | 8,700                          | 10,162  |
| Sur América            | 3,036                   | 900     |                                | 2,833 | 2,137                          | 2,550   |
| Norte y Centro América |                         | 24,407  |                                | 3,001 | 68,800                         | 73,238  |
| Canadá                 | 3,164                   | 1,961   | 2,430                          | 3,916 | 7,704                          | 7,680   |
| México                 |                         | 8,300   |                                | 753   | 1,985                          | 6,250   |
| Estados Unidos         | 23,213                  | 10,769  | 2,720                          | 5,174 | 56,914                         | 55,719  |
| Sur América            |                         | 24,864  |                                | 1,015 | 14,000                         | 25,237  |
| Argentina              | 19,191                  | 2,623   |                                | 1,949 | 5,126                          | 5,113   |
| Brasil                 |                         | 15,400  |                                | 808   | 3,909                          | 12,450  |
| Colombia               | 2,252                   | 2,568   |                                | 1,052 | 2,085                          | 2,700   |
| Perú                   |                         | 733     | 560                            | 1,173 | 392                            | 860     |
| Uruguay                |                         | 480     |                                | 1,500 | 630                            | 720     |
| Venezuela              | 270                     | 1,047   | 1,190                          | 1,217 | 374                            | 1,274   |
| Asia                   |                         | 47,089  |                                | 694   | 17,600                         | 32,673  |
| China                  |                         | 7,664   |                                | 635   |                                | 4,865   |
| India                  | 20,354                  | 20,000  | 220                            | 500   | 8,180                          | 10,000  |
| Israel                 | 46                      | 102     | 4,320                          | 6,533 | 177                            | 669     |
| Japón                  | 497                     | 1,145   | 3,640                          | 5,633 | 1,154                          | 6,450   |
| Paquistán              | 6,017                   | 2,550   | 930                            | 800   | 3,538                          | 2,040   |
| Bangladesh             |                         | 3,120   |                                | 250   |                                | 780     |
| Turquía                | 3,204                   | 5,400   | 536                            | 611   | 1,717                          | 3,300   |
| Europa                 |                         | 51,790  |                                | 3,365 |                                | 174,280 |
| Austria                | 1,178                   | 1,002   | 2,220                          | 3,317 | 2,613                          | 3,325   |
| Bélgica                | 947                     | 1,040   | 3,760                          | 3,742 | 3,665                          | 4,130   |
| Bulgaria               | 577                     | 630     | 810                            | 2,302 | 456                            | 1,450   |
| Checoslovaquia         | 2,084                   | 1,909   | 1,770                          | 2,926 | 3,712                          | 5,585   |
| Dinamarca              | 1,148                   | 1,093   | 3,440                          | 4,871 | 5,068                          | 5,324   |
| Finlandia              | 1,136                   | 732     | 2,720                          | 4,413 | 3,085                          | 3,230   |
| Francia                | 6,928                   | 10,152  | 2,030                          | 3,132 | 18,540                         | 31,800  |
| Alemania Democrática   | 2,100                   | 2,135   | 2,370                          | 3,817 | 4,986                          | 8,150   |
| Alemania Federal       | 5,659                   | 5,443   | 3,010                          | 4,354 | 17,007                         | 23,700  |
| Grecia                 | 322                     | 506     | 790                            | 1,437 | 298                            | 727     |
| Hungria                | 891                     | 788     | 1,720                          | 3,036 | 1,518                          | 2,192   |
| Irlanda                | 1,187                   | 1,492   | 2,230                          | 3,646 | 2,646                          | 5,440   |
| Italia                 | 4,430                   | 3,687   |                                | 2,794 | 6,459                          | 10,300  |
| Nuevo Orleans          | 1,490                   | 2,254   | 4,040                          | 5,093 | 5,943                          | 11,481  |
| Nueva Guinea           | 640                     | 375     | 2,510                          | 4,917 | 1,606                          | 1,844   |
| Polonia                | 5,600                   | 5,930   | 1,840                          | 2,799 | 10,278                         | 16,600  |
| Portugal               |                         | 306     | 1,490                          | 2,190 | 206                            | 670     |
| Rumania                | 1,950                   | 2,487   | 820                            | 1,990 | 1,714                          | 4,949   |
| España                 |                         | 2,015   | 2,030                          | 2,888 | 2,715                          | 5,820   |
| Suiza                  | 1,393                   | 650     | 2,820                          | 5,185 | 3,935                          | 3,370   |
| Suecia                 | 901                     | 883     | 3,130                          | 4,100 | 2,014                          | 3,620   |
| Inglaterra             | 4,668                   | 3,330   | 3,010                          | 4,757 | 11,616                         | 15,840  |
| Yugoslavia             | 1,697                   | 2,745   | 1,090                          | 1,502 | 1,857                          | 4,124   |
| Oceania                |                         | 4,170   |                                | 2,975 | 11,800                         | 12,428  |
| Australia              | 4,243                   | 2,060   | 1,950                          | 2,825 | 6,571                          | 5,819   |
| Nueva Zelanda          | 2,108                   | 2,060   | 2,500                          | 3,180 | 5,204                          | 6,550   |
| URSS                   |                         | 43,100  | 1,680                          | 2,153 | 47,464                         | 92,800  |
| Mundial                |                         | 216,283 |                                | 1,946 | 279,800                        | 420,818 |

La población se ha incrementado considerablemente más que la producción de leche en: Africa, Oceanía, Estados Unidos de Norteamérica y Canadá; y ha ocurrido lo contrario en Europa y la U.R.S.S.

De la producción total de leche en el mundo, en 1979, el 91 % correspondió a la leche de vaca, el resto se reparte entre la leche de otras especies como búfala, cabra y oveja.

De acuerdo a recientes reportes estadísticos preparados por la FAO, la distribución total de leche, en función del estado de desarrollo de los países, ha sido la siguiente para 1982. Cuadro 3, (2).

Cuadro 3.

DISTRIBUCION MUNDIAL DE LA PRODUCCION DE LECHE

| Países        | Población |     | Producción de Leche(*) |     |
|---------------|-----------|-----|------------------------|-----|
|               | (miles)   | (%) | (1000 ton)             | (%) |
| Desarrollados | 1 186.090 | 26  | 368.576                | 76  |
| En desarrollo | 3 404.800 | 74  | 113.670                | 24  |

(\*) Incluye leche de vaca, búfala, oveja y cabra.

FUENTE: Anuario de Producción de la FAO (1982).

En 1982, todos los países en desarrollo aportaban aproximadamente el 24 % de la producción de leche y los países desarrollados el 76 %. Sin embargo, en estos dos grupos de países, la población estaba distribuida aproximadamente en forma inversa.

De la misma manera la población de animales vacunos, ovinos y caprinos se distribuye desigualmente en todos los continentes, y naturalmente en una forma distinta entre países desarrollados y en desarrollo.

## 1.2 Panorama actual de la producción de leche en México.

La producción de leche en México refleja una estructura heterogénea; por lo tanto cohabitan simultáneamente pequeños productores de leche a nivel familiar y grandes establecimientos a nivel comercial, cada uno con diversos grados de tecnificación; que van desde la producción artesanal hasta la producción altamente tecnificada, dando como resultado diferentes grados de integración comercial y organización de los productores.

La ganadería lechera está dividida en dos sistemas de explotación. El primero está compuesto por ganado de razas especializadas para la producción de leche, el cual representa el 17.4 % de la población bovina lechera. En 1983, 939 263 vacas especializadas produjeron aproximadamente el 54 % de la producción de leche nacional. (3).

El segundo sistema lo componen las ganaderías de razas de doble propósito, en las que el principal objetivo es la producción de carne y la producción de leche es sólo una actividad complementaria. Este sistema abarca 4 457 758 animales y aporta aproximadamente el 46 % de la producción de leche de nuestro país. Este sistema representa el 82.6 % de la ganadería lechera nacional. (3).

Las entidades con mayor producción de leche son Jalisco, México, Veracruz, Guanajuato, Coahuila, Chihuahua y Durango. Cuadro 4.

En cuanto a la producción nacional de leche bovina, la región de mayor importancia fué la del centro del país durante el periodo 1979 - 1981, con una participación en 1979 de un 29.22 % y para 1981 con un 29.50 % de la producción nacional (4). Esta región está comprendida por los estados de Jalisco, México, Guanajuato, Puebla y Michoacán.

## INVENTARIO Y PRODUCCION DE LA GANADERIA LECHERA ESPECIALIZADA Y NO ESPECIALIZADA (1985)

|                         | GANADERIA ESPECIALIZADA * |                        | GANADERIA NO ESPECIALIZADA * |                        | T          | D                | T A L            |              |                  |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------|------------------|------------------|--------------|------------------|
|                         | 1/                        | 2/                     | 1/                           | 2/                     |            |                  | 1/               | 2/           |                  |
|                         | Inventario                | Rendimiento Producción | Inventario                   | Rendimiento Producción | Inventario | Rendimiento      | Producción       |              |                  |
| Aguascalientes          | 27,949                    | 4,453                  | 124,462                      | 23,534                 | 1,661      | 39,101           | 51,483           | 3,177        | 163,563          |
| Baja California Norte   | 20,688                    | 5,142                  | 106,388                      | 9,882                  | 2,858      | 28,244           | 30,570           | 4,404        | 134,632          |
| Baja California Sur     | 2,334                     | 2,825                  | 6,593                        | 11,027                 | 568        | 6,260            | 13,361           | 962          | 12,853           |
| Campeche                | 3,285                     | 3,273                  | 10,751                       | 62,643                 | 541        | 33,882           | 65,928           | 677          | 44,633           |
| Coahuila                | 68,297                    | 5,080                  | 346,196                      | 75,182                 | 724        | 54,395           | 143,479          | 2,797        | 401,311          |
| Colima                  | 9,604                     | 2,919                  | 28,030                       | 21,033                 | 514        | 10,818           | 30,637           | 1,268        | 38,848           |
| Chiapas                 | 5,441                     | 3,227                  | 17,557                       | 525,528                | 625        | 328,635          | 530,969          | 652          | 346,192          |
| Chihuahua               | 43,932                    | 4,593                  | 201,761                      | 305,062                | 639        | 195,045          | 348,994          | 1,137        | 396,806          |
| Distrito federal        | 25,896                    | 4,967                  | 128,636                      | 3,614                  | 1,812      | 6,548            | 29,510           | 4,581        | 135,184          |
| Durango                 | 49,852                    | 5,008                  | 249,635                      | 118,499                | 844        | 100,029          | 168,351          | 2,077        | 349,664          |
| Guajuato                | 69,441                    | 4,819                  | 334,644                      | 142,710                | 766        | 109,387          | 212,151          | 2,093        | 444,031          |
| Guerrero                | 13,585                    | 2,820                  | 38,316                       | 136,758                | 425        | 58,054           | 150,343          | 641          | 96,370           |
| Hidalgo                 | 28,567                    | 4,300                  | 122,841                      | 86,624                 | 671        | 58,124           | 115,191          | 1,571        | 180,965          |
| Jalisco                 | 138,492                   | 3,954                  | 547,562                      | 424,099                | 1,094      | 463,976          | 562,591          | 1,798        | 1,011,538        |
| México                  | 123,382                   | 4,464                  | 550,716                      | 137,300                | 1,104      | 151,561          | 260,682          | 2,694        | 702,277          |
| Michoacán               | 52,315                    | 3,070                  | 160,581                      | 205,691                | 810        | 166,571          | 258,006          | 1,268        | 327,152          |
| Morelos                 | 3,181                     | 2,560                  | 8,143                        | 18,693                 | 986        | 18,434           | 21,874           | 1,215        | 25,577           |
| Nayarit                 | 5,762                     | 2,633                  | 15,172                       | 119,340                | 564        | 67,270           | 125,102          | 659          | 82,442           |
| Nuevo León              | 13,421                    | 2,722                  | 36,536                       | 27,722                 | 742        | 20,570           | 41,143           | 1,388        | 57,106           |
| Oaxaca                  | 31,226                    | 2,940                  | 91,818                       | 110,728                | 414        | 45,877           | 141,954          | 970          | 137,695          |
| Puebla                  | 54,322                    | 3,562                  | 193,507                      | 147,399                | 666        | 98,182           | 201,721          | 1,446        | 291,689          |
| Querétaro               | 37,994                    | 4,955                  | 188,279                      | 34,497                 | 909        | 31,370           | 72,491           | 3,030        | 219,649          |
| Quintana Roo            | 174                       | 989                    | 172                          | 7,256                  | 515        | 3,736            | 7,430            | 526          | 3,908            |
| San Luis Potosí         | 15,672                    | 3,739                  | 58,596                       | 120,857                | 554        | 67,011           | 136,529          | 920          | 125,607          |
| Sinaloa                 | 7,056                     | 3,596                  | 25,373                       | 121,035                | 706        | 85,426           | 128,091          | 865          | 110,799          |
| Sonora                  | 14,314                    | 3,767                  | 53,919                       | 149,101                | 672        | 100,181          | 163,415          | 943          | 154,100          |
| Tabasco                 | 3,200                     | 2,444                  | 7,822                        | 227,360                | 620        | 140,889          | 230,560          | 645          | 148,711          |
| Tamaulipas              | 6,662                     | 2,918                  | 19,437                       | 212,616                | 560        | 119,147          | 219,278          | 632          | 138,534          |
| Tlaxcala                | 25,593                    | 4,062                  | 103,958                      | 10,203                 | 1,259      | 12,845           | 35,795           | 3,263        | 116,803          |
| Veracruz                | 13,952                    | 2,149                  | 29,934                       | 696,033                | 820        | 570,663          | 709,985          | 846          | 600,647          |
| Yucatán                 | 2,774                     | 2,739                  | 7,597                        | 51,793                 | 462        | 23,943           | 54,567           | 578          | 31,540           |
| Zacatecas               | 20,900                    | 3,935                  | 82,239                       | 113,939                | 520        | 59,207           | 134,839          | 1,049        | 141,446          |
| <b>Total Nacional :</b> | <b>939,263</b>            | <b>4,150</b>           | <b>3,897,941</b>             | <b>4,457,758</b>       | <b>735</b> | <b>3,275,381</b> | <b>5,397,021</b> | <b>1,329</b> | <b>7,173,322</b> |

FUENTE : S.A.R.H.

1/ Litros Vaca-Año

2/ Miles de Litros

\* Se considera a todos los vientres cuya función zootécnica está orientada a la producción de leche.

\*\* Se considera a los vientres cuya función zootécnica está orientada a la producción de carne.

### 1.3 Problemática y factores que limitan la actividad lechera

La disminución de la producción de leche en México a partir de 1979, es originada por diversos factores. Entre los más importantes podemos citar:

- a). La política de precios tope oficiales para la producción de leche, que reducen el margen de utilidades del productor e impide que ésta sea una actividad económicamente atractiva, puesto que el costo de los insumos (mano de obra especializada, maquinaria, etc.) ha aumentado de manera más acelerada que el precio oficial del producto.
- b). El déficit creciente de la producción de leche, que se ha generado como consecuencia de la baja rentabilidad de esta producción ha sido cubierto por el gobierno mediante la importación de leche descremada en polvo. Esta situación se muestra en el cuadro 5. Sin embargo, la importación de leche en polvo descremada es una solución a corto plazo que exige un esfuerzo económico considerable por parte del Estado, y que por

representar una competencia para el productor, a largo plazo agrava la situación de todo el sector de la producción, transformación y comercialización de leche y derivados, si no se acompaña con medidas tendientes a restituir la rentabilidad de esta actividad.

- c). Del total de leche que se consume en el país, una tercera parte se obtiene de la importación de leche en polvo descremada, de este volumen, el 31 % de la leche es rehidratada y reconstituida a través de una empresa paraestatal LICONSA para su venta a precios subsidiados entre la población de escasos recursos económicos de algunas ciudades de el país. La participación del Estado en la oferta de leche con un producto subsidiado representa una competencia desleal para los productores y desalienta a la producción nacional.

- d). La producción especializada de leche se caracteriza por sus altos costos de producción y fuertes compromisos administrativos y tecnológicos, debido a ésto la rentabilidad es muy frágil en un mercado controlado con costos de insumos no controlados. Como consecuencia, en los últimos años se ha registrado una reducción en el

hato lechero al pasar de 1 037 893 vientres en producción en 1978 a 939 263 vientre en producción en 1985 (4).

Es paradójico que la producción de leche en el sistema no especializado, que implica menos riesgos e inversiones, sea más rentable que la producción en el sistema especializado.

Cuadro 5.

IMPORTACION DE LECHE DESCREMADA DESHIDRATADA

| ANO  | MONTO (ton) | %       |
|------|-------------|---------|
| 1977 | 77 500      | (2.06)  |
| 1978 | 75 900      | 3.42    |
| 1979 | 78 500      | 248.00  |
| 1980 | 194 700     | (31.27) |
| 1981 | 133 800     | (29.44) |
| 1982 | 94 400      |         |

FUENTE: Dirección General de Econotecnia Agrícola, 1983

#### 1.4 Problemas en la producción y conservación de la la leche.

La composición química y las propiedades de la leche hacen de ésta un producto altamente susceptible a la descomposición bacteriana. Es por ello que las condiciones de sanidad en la producción de leche, son un factor determinante en la obtención de un producto de buena calidad.

La temperatura de almacenamiento, determina la población bacteriana predominante durante este periodo.

Las bacterias mesófilas son considerados el tipo predominante de los microorganismos responsables de la descomposición de la leche; sin embargo al mejorarse los métodos de manejo, enfriamiento y sanidad, la flora psicrótrofa adquiere cada vez mayor importancia.

El periodo entre el procesamiento y el momento en el cual la leche se vuelve inaceptable para su consumo es denominado como "vida de anaquel de la leche". La vida de anaquel refleja el potencial de conservación de la leche, sin embargo no existen medidas objetivas, ni métodos exactos para predecir la vida de anaquel del producto (5).

La calidad de conservación de la leche pasteurizada puede prolongarse si la proliferación bacteriana es controlada durante el período pre-pasteurización. Esto puede llevarse a cabo mejorando las condiciones y reduciendo el tiempo de almacenamiento de la leche cruda.

Las condiciones y el período de almacenamiento serían óptimas si la leche se pasteurizara en la granja y se conservara pasteurizada en refrigeración, ésto representa una nueva alternativa para el manejo de la leche, que podría ser de interés en nuestro país. Aún cuando este principio es incosteable para los bajos volúmenes que se manejan normalmente.

Tan importante como el desarrollo de métodos para mejorar la calidad de conservación de leches refrigeradas es la necesidad por desarrollar métodos más adecuados para predecir su vida de anaquel. Las pruebas basadas en el crecimiento de bacterias en cultivo es de uso limitado por ser poco prácticas, costosas y requerir de un período de tiempo demasiado largo.

Es necesaria una medida objetiva que permita predecir la vida de anaquel y evaluar el efecto de la tecnología empleada durante el proceso de la leche sobre las alteraciones de ésta. De ser así es factible intentar mejorar la calidad de conservación de la leche.

## 1.5 Principales factores que alteran la calidad de la leche.

### 1.5.1 Bacterias

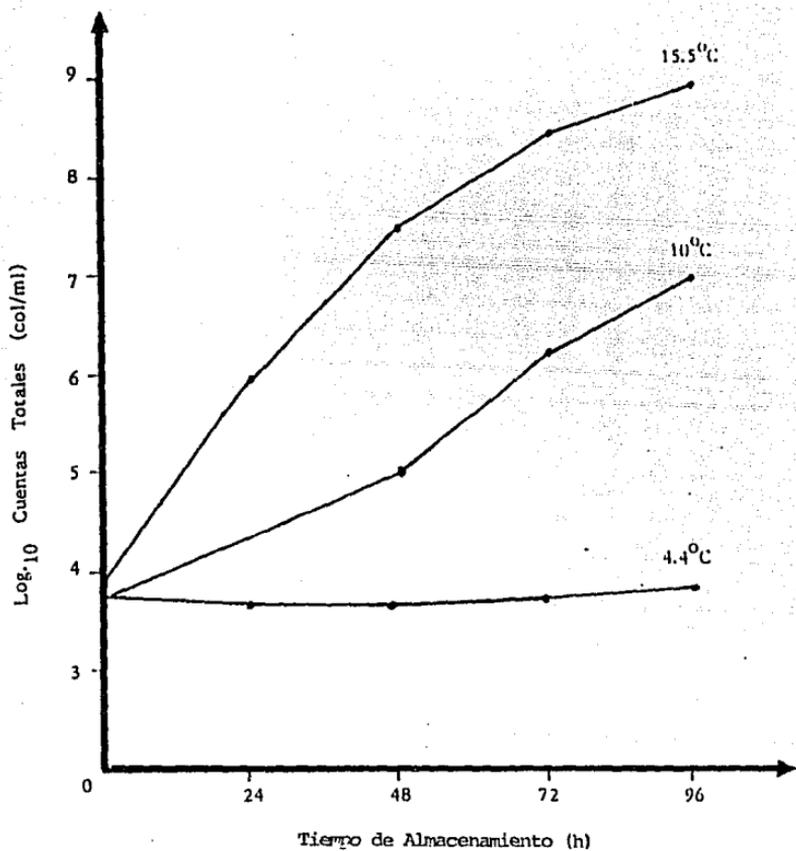
El número de microorganismos presentes en la leche fresca que ha sido tratada bajo condiciones higiénicas satisfactorias, se sitúa en el rango de  $1 \times 10^3$  m.o./ml a  $1 \times 10^4$  m.o./ml.

La gráfica 1 muestra que el número de microorganismos en la leche fluida se eleva rápidamente a altas temperaturas de almacenamiento, mientras que a bajas temperaturas de almacenamiento el incremento es pequeño.

Actualmente la leche que se refrigera inmediatamente después de la ordeña en la granja, comienza a contaminarse dentro de la lechería y el número de microorganismos aumenta de  $1 \times 10^4$  m.o./ml. hasta  $1 \times 10^6$  m.o./ml. (6).

La pasteurización reduce este número a alrededor de  $1 \times 10^4$  m.o./ml a  $1 \times 10^5$  m.o./ml inmediatamente después del calentamiento. Los microorganismos más abundantes en la leche pasteurizada son termorresistentes y están constituidos principalmente por Streptococos thermophilus junto con micrococos y microbacterias; en menor escala se encuentran lactobacilos termorresistentes y Achromobacter.

Gráfica 1. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el crecimiento de las bacterias en leche.



FUENTE: Kessler Gerhard, H (1981)

Los estudios realizados por Kandler (7), muestran que el número de microorganismos presentes inicialmente en la leche y el tipo de éstos, son los factores de mayor importancia en la reducción de la cuenta bacteriana durante la pasteurización.

Busse (8), examinó leches almacenadas en refrigeración por períodos de tiempo prolongados y encontró que el número de microorganismos se incrementa en función de la temperatura, y que la naturaleza de la flora sufre alteraciones drásticas. En lugar de la flora presente inmediatamente después de la pasteurización, los principales géneros presentes eran Pseudomonas, Enterobacterias (coliformes) y variedades de Streptococos. Puesto que estos géneros son altamente susceptibles a la pasteurización, estos resultados sugieren que la flora reportada proviene de fuentes de contaminación post-pasteurización o recontaminación.

En base a lo anterior Vögele (9) concluyó que no hay correlación entre el número de microorganismos presentes en la leche cruda y el número de microorganismos presentes después de la pasteurización, y que tampoco existe

correlación entre el número de microorganismos sobrevivientes y la vida de anaquel de la leche pasteurizada. La flora bacteriana sobreviviente a la pasteurización crece sólo ligeramente en leches refrigeradas. Son excepciones las esporas psicrótrofas, las cuales son la causa principal de la descomposición de leches que han sido recontaminadas.

Los Streptococos y enterococos psicrótrofos no son considerados usualmente como microorganismos introducidos por recontaminación, sin embargo, pueden sobrevivir al tratamiento térmico por tiempos cortos y actuar como microorganismos responsables de la descomposición de las leches pasteurizadas.

#### 1.5.2 Enzimas

Las enzimas actúan como catalizadores de reacciones químicas causando cambios en el metabolismo de los organismos vivos. La mayoría de las enzimas pueden ser inactivadas a temperaturas menores de 100 °C. Sin embargo, las enzimas producidas por microorganismos psicrótrofos como Pseudomonas ( lipasas y proteasas ) requieren temperaturas de 150 °C para su inactivación. Las enzimas de este género provocan deterioros sólo cuando el número de microorganismos psicrótrofos en leche excede de  $1 \times 10^5$  n.o./ml (10).

La actividad de las enzimas en algunos procesos es deseable, pero en la mayoría de los casos éstas producen cambios desagradables en el sabor de los alimentos durante su almacenamiento, provocando su descomposición. Por ésto las enzimas deben ser inactivadas mediante un tratamiento térmico.

#### 1.6 Sistemas de industrialización de la leche.

El principio de la pasteurización definido por Charles Porcher en 1933 es: "Pasteurizar la leche es destruir en ella, mediante el empleo apropiado del calor, todos o algunos de los microorganismos presentes en la leche, reteniendo tanto como sea posible las propiedades organolépticas y nutricionales de la leche fresca".

Adicionalmente, se inactivan en forma más o menos completa las enzimas presentes, de acuerdo al tiempo y temperatura del tratamiento.

La importancia de retener tanto como sea posible las propiedades organolépticas y nutricionales de la leche, ha contribuido al desarrollo de métodos térmicos, los cuales utilizan la temperatura mínima que destruye a todos los

microorganismos patógenos, aunque también muchos de los microorganismos no patógenos son destruidos, tal es el caso de la pasteurización. En el caso de la esterilización se destruyen todos los microorganismos e inactivan las enzimas.

Las condiciones de tiempo-temperatura de la pasteurización 61.8 °C por 30 min., fueron originalmente implantadas para la destrucción del bacilo tuberculoso Mycobacterium tuberculosis. Posteriormente se observó que a estas condiciones sobrevive la Coxiella burnettii; (que es la rickettsia patógena causante de la fiebre Q), por lo que se aumentó la intensidad del tratamiento a 63 °C por 30 min (11).

Actualmente en la industria lechera se emplean distintos tipos de pasteurización, determinados por la intensidad y duración de el tratamiento térmico. En base a estos dos factores se clasifican en:

#### 1.6.1 Pasteurización Lenta

La pasteurización lenta consiste en un tratamiento térmico a 63 °C durante 30 min. Es un método lento y discontinuo, pero presenta la ventaja de no modificar las propiedades organolépticas de la leche; no coagula la

albumina ni la globulina y no altera la estructura de los glóbulos grasos, por lo que la leche conserva la línea de crema. (10),

#### 1.6.2 Pasteurización Rápida

La pasteurización rápida consiste en un calentamiento a 72 °C por 15 seg. El método es continuo y rápido, pero modifica ligeramente las propiedades organolépticas de la leche, si bien los equipos modernos reducen estos inconvenientes. La albumina y globulina sufren sin embargo, una coagulación parcial. Este método, se conoce en los países anglosajones como High Temperature, Short Time. (10).

#### 1.6.3 Ultrapasteurización

La ultrapasteurización es un tratamiento térmico a 110 115 °C por 4 seg. Es un sistema muy rápido, permite obtener productos inalterables por tiempos prolongados. Este método se conoce como Ultra High Temperature ( UHT ). (10).

Cuando la pasteurización es llevada a temperaturas menores de 100 °C , las leches tienen una vida de almacenamiento limitada, ya que la actividad enzimática es sólo parcialmente inhibida y el número de microorganismos solamente reducido. Si la leche no tiene una contaminación post-pasteurización podrá ser guardada por un periodo de cinco a diez días, dependiendo de la temperatura de almacenamiento. Solamente a temperaturas de almacenamiento de 5 °C o menores puede lograrse una vida de anaquel de 20 días (10).

La destrucción de todos los microorganismos y la inactivación completa de las enzimas, se lleva a cabo mediante la esterilización a temperaturas mayores de 100 °C .

Los productos esterilizados pueden conservarse indefinidamente, no hay cambios organolépticos debido a reacciones químicas tales como la oxidación, enranciamiento de la grasa por efectos de la luz. La leche permanece satisfactoriamente desde el punto de vista organoléptico alrededor de cuatro a seis semanas.

#### 1.6.4 Influencia de la temperatura de pasteurización sobre la leche.

Cuando la leche se calienta sufre ciertas alteraciones, y estos cambios se deben a dos factores antes ya mencionados, que son:

- 1). El periodo durante el cual la leche se halla expuesta al calentamiento.
- 2). La temperatura alcanzada durante el proceso.

De una manera semejante a otro líquido, la leche se dilata en el calentamiento, siendo el coeficiente de expansión mayor que el agua. Ocurren también los siguientes cambios (12):

- a) La leche pierde su viscosidad
- b) Se forma una película o membrana (nata), sobre la superficie de la leche cuando ésta se encuentra en contacto con el aire y a temperatura entre 60 °C y 70 °C, completándose ésta a temperatura de ebullición. Esta película proporción de todos los componentes de la leche, pero principalmente está formada por lactoalbúmina. Esta capa no se forma en condiciones anaerobias.

- c) El dióxido de carbono es expulsado, los bicarbonatos se descomponen parcialmente, produciendo un ligero incremento en la acidéz, y las sales de calcio y magnesio se precipitan.
- d) La leche calentada a 73.8 °C durante 30 min., no coagula en presencia de renina. La firmeza del coágulo está inversamente relacionada con la temperatura, principalmente debido a la precipitación de las sales de calcio, lo que disminuye la capacidad de coagulación de la caseína de la leche.
- e) Se descompone la caseína y la nucleína.
- f) A temperaturas mayores de 62.7 °C los glóbulos de grasa resultan modificados en su estructura, esto afecta a la línea de crema, pudiendo originar una reducción del 10 al 20 %, aunque no se extraiga crema de la leche.
- g) Se destruyen las enzimas si la leche se mantiene a una temperatura de 79.4 °C durante un periodo corto.
- h) Se reduce el porcentaje de calcio soluble a temperaturas de 62.7 °C.
- i) El punto de congelación se eleva ligeramente a 62.7 °C y la acidéz se reduce ligeramente.

- J) Los fosfatos se precipitan mediante un calentamiento prolongado a altas temperaturas y éstos determinan la destrucción de las vitaminas C, B, A y D, en el orden citado.
- K) Las altas temperaturas de pasteurización afectan al sabor natural de la leche.

#### 1.7 Fundamento de los métodos de reducción de colorantes para determinar la calidad microbiológica de la leche.

Según la teoría de Wieland, los métodos de transformación se basan en la reducción de la sustancia agregada ( colorante químico ) y los receptores naturales presentes; los cuales resultan reducidos por el hidrógeno de la deshidrogenación, cuya transferencia cuantitativa del colorante depende de las bacterias presentes. (13).

Los métodos de reducción de colorantes sirven de referencia para conocer el número de bacterias presentes en la leche. La rapidéz e intensidad de las modificaciones cromáticas visibles ( virajes, decoloraciones, etc. ), está directamente relacionada con el número de bacterias presentes en la leche (13).

El potencial de óxido-reducción ( Eh ) de la leche fresca aerada es de  $\pm$  0.35 a  $\pm$  0.40 voltios, debido principalmente al contenido de oxígeno disuelto en el producto. Si por cualquier causa ese oxígeno es eliminado, el Eh disminuye. Esto ocurre cuando los microorganismos crecen en la leche y consumen el oxígeno; si el número de microorganismos es muy elevado, el consumo de éste será grande y por consiguiente el Eh descenderá rápidamente y viceversa (12).

El principio anterior encuentra aplicación en la determinación de la calidad sanitaria de la leche, utilizando como indicadores químicos al azul de metileno, a la resazurina, al tetrazolium, etc.

#### 1.7.1 Factores bacterianos determinantes en las pruebas de reducción de colorantes.

Los factores que condicionan el resultado de la pruebas de reducción en la leche son, según Davis (14), y antes que las bacterias, las sustancias ácidas disueltas en la leche en cuestión.

Los ácidos presentes en la leche deben ser consumidos por las bacterias y eliminados de la leche, para que el colorante pueda reducirse. Al utilizar métodos de reducción de colorantes como indicadores de la calidad microbiológica de la leche, se deben tener presentes los aspectos relacionados con la biología de las bacterias:

- a). La fuerza reductora de las bacterias es muy variada. En particular los Streptococos típicos generadores de ácido láctico, poseen una intensa fuerza reductora, al igual que el grupo Coli-aerogenes (15).
- b). Existe la posibilidad de un sinergismo entre gérmenes de acompañamiento de escasa capacidad reductora y gérmenes con elevada capacidad reductora que puede influir en forma significativa sobre el proceso de reducción.
- c). Muchos gérmenes, sobre todo en muestras de leche fresca almacenadas a temperaturas de refrigeración durante largo tiempo, no manifiestan inmediatamente su actividad debido a que se encuentran en la fase de adaptación.
- d). El número de bacterias y la forma en que se agrupan también tiene influencia.

Las bacterias lácticas regularmente presentes en la leche, se distinguen por su fuerza reductora, los métodos de reducción de colorantes constituyen una prueba específica de el estado de frescura de la leche cruda y de su capacidad de conservación frente a la acidificación.

Por ello, estos métodos proporcionan la mejor información sobre el contenido real de gérmenes cuando la contaminación de la leche es a base de este tipo de bacterias, cosa que sucede con la mayor parte de la leche que se comercializa (16).

Las recientes investigaciones de Kandler (17), muestran que el 90 % de los tiempos de reducción se determinaron con flora compuesta de bacterias mesófilas generadoras de ácido láctico.

Walser y Bohl (18), comprobaron una disminución del tiempo de reducción en 0.9 - 1.2 horas cuando aumenta en un 10 % la tasa de gérmenes acidificantes.

El tiempo de reducción del colorante depende del tipo de microorganismos presentes en la leche. Así, cuanto mayor sea la uniformidad de las bacterias en la leche más estrecha es la relación entre el número de microorganismos y el tiempo de reducción (19).

### 1.7.2 Descripción de la naturaleza química de la resazurina.

Dado que la resazurina es el colorante seleccionado por sus cualidades físico-químicas para el diseño del Kit como indicador de la calidad microbiológica de la leche, se tratará con detalle su naturaleza.

En 1929 la resazurina fué introducida en Alemania por Pesch y Simmert (20), como sustituto del azul de metileno, para pruebas de reducción en leche.

La resazurina es más electropositiva y más sensible que el azul de metileno para detectar cambios en el potencial de óxido-reducción de la leche.

La resazurina es una oxazona ( figura 1 ), que imparte color azul a la leche. Por pérdida de oxígeno se reduce en dos etapas: en la primera se reduce (de manera irreversible ) en su correspondiente oxazina, pasando por diversas tonalidades de violeta hasta rojo-rosa por la formación de un compuesto llamado resorufina. Si la pérdida de oxígeno continúa, la reducción pasa a una segunda etapa reversible, en la cual la resorufina se reduce a dehidrorresufina, compuesto incoloro que por oxidación puede pasar nuevamente a resorufina (rojo-rosa) (12). Figura 2.

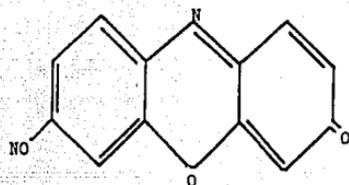


Figura 1. Estructura química de la resazurina

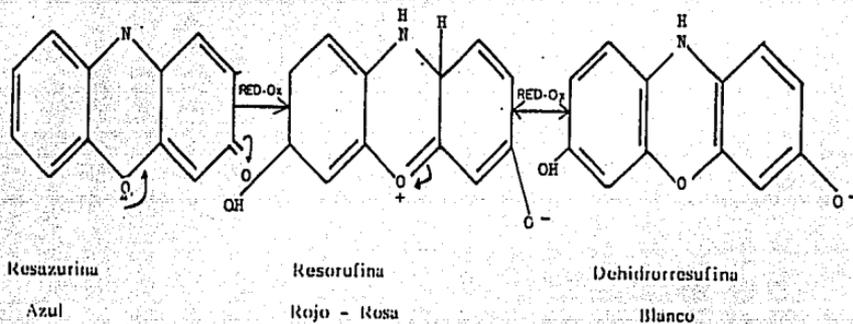


Figura 2. Mecanismo de reacción de la resazurina.

En la primera etapa, el viraje tiene lugar con un potencial redox de  $+ 0.2$  a  $+ 0.05$  voltios, y en la segunda etapa de  $+ 0.15$  a  $0$  voltios (21), es decir; la decoloración se produce con mayor rapidez que con el azul de metileno.

La prueba de la resazurina se traduce en dos ventajas principales:

- Menor tiempo de reducción que permite obtener resultados más rápidos ( tres horas máximo ).
- Mayor sensibilidad para reconocer la presencia de calostro y leches anormales.

#### 1.8 Nuevas alternativas para la determinación de la calidad microbiológica de la leche.

México es un país con bajos rendimientos en la producción lechera. Uno de los factores que explican este atraso en la intensificación de la producción de leche es la falta de investigación tecnológica en esta área de lácteos. La investigación desarrollada en otros países no es la adecuada a las condiciones de producción existentes en nuestro país.

Sin embargo, debido a la ausencia de tecnologías propias en nuestro país se han importado tecnologías inadecuadas. Esto es evidente por las siguientes razones:

- 1.- Los sistemas de industrialización de leche, actualmente no son aplicables a la realidad de la producción y comercialización de la leche en México.
- 2.- Los países en desarrollo no han creado una infraestructura técnico-científica propia a sus necesidades.
- 3.- No existe desarrollo genético de vacas de alta producción para zonas tropicales.

Dado que los métodos de control de calidad más usados son propios sólo para la producción y manejo de la leche a nivel industrial, es urgente el diseño de un método accesible y práctico que proporcione información veraz del control sanitario y seguridad de calidad del producto para el productor, distribuidor y consumidor.

El sistema de producción y comercialización de la leche ha sido diseñado para favorecer a los concentradores del producto (plantas pasteurizadoras e industrializadoras) y han sido pocos los intentos realizados para favorecer que el mismo productor comercialice su leche, por consiguiente, en

México no existe tecnología para el procesado de la leche en pequeños volúmenes, y la existente no parece adaptarse a los pequeños productores por múltiples circunstancias:

- 1). Altos costos de los equipos
- 2). Necesidad de comercialización diaria
- 3). Requerimientos de personal calificado para el proceso.
- 4). La distancia entre el productor y el consumidor hace que muy pocas veces el productor sea también el comerciante.
- 5). Falta de vías de comunicación e infraestructura para la recolección diaria (carreteras, tanques pipa, etc.).

Dada esta situación se ha desarrollado un paquete tecnológico, el cual consiste en un equipo de pasteurización lenta (63 °C durante 30 min.), provisto de un sistema de envasado.

El diseño del kit de resazurina como un método para determinar la calidad microbiológica de la leche cruda y pasteurizada, forma parte de este paquete tecnológico, cuyo propósito es brindar una alternativa diferente para la determinación de la calidad de la leche fluida, que beneficie tanto al consumidor como al productor.

Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio (22) y (23) muestran que la leche pasteurizada, envasada y comercializada en la granja bajo el sistema de pasteurización lenta (63 °C durante 30 min.) tiene una vida de anaquel 5 veces mayor que los productos actualmente comercializados.

## II. OBJETIVOS

- 1.- Diseñar un kit de resazurina para la evaluación rápida y práctica de la calidad microbiológica de la leche.
- 2.- Determinar la contaminación microbiana de muestras de leche bajo diversas condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento por medio de el kit de resazurina propuesto y comparar los resultados con los obtenidos con las pruebas de reducción de la resazurina y recuento en placas.
- 3.- Evaluar la factibilidad técnico-económica del kit de resazurina.

## III. HIPOTESIS DE TRABAJO

- 1.- La prueba de reducción de resazurina normal puede ser reemplazada por el Kit de resazurina propuesto sin pérdida de confiabilidad.

- 2.- El Kit de resazurina es un método representativo de la calidad microbiológica de la leche, reportada por el método de recuento de colonias en placas.
  
- 3.- El kit de resazurina es un método accesible a todo tipo de mercado dada su confiabilidad y simplificación.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### 4.1 Manejo de la muestras

Se tomaron 8 muestras de 1 litro de leche directamente del tanque de recepción del rancho de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. La leche provenia de un hato de 32 vacas de raza Holstein. Las muestras se colectaron en matraces estériles y se asignaron aleatoriamente a 4 tratamientos, con 2 repeticiones cada tratamiento. Los tratamientos fueron asociados a los símbolos L<sub>0</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>16</sub>, L<sub>24</sub>; los valores 0, 8, 16 y 24 indican el tiempo en horas que la leche fué almacenada a una temperatura de 23 °C antes de ser pasteurizada a 63 °C durante 30 min., (pasteurización lenta). Después de la pasteurización, las muestras fueron subdivididas en 2 lotes y almacenadas a 4 °C ó a 23 °C durante diferentes tiempos de almacenamiento post-pasteurización, produciendo el conjunto de tratamientos que se ilustra en el cuadro 6.

CUADRO 6.

CONDICIONES DE TIEMPO-TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO PRE Y POST-PASTEURIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE EMPLEADAS EN LA ETAPA EXPERIMENTAL

| Tiempo de Almacenamiento<br>Pre-Pasteurización a 23°C |                 | Temperatura de Almacenamiento<br>Post-Pasteurización |                | Tiempo de Almacenamiento<br>Post-Pasteurización |    |    |          |
|---|-----------------|--|----------------|---|----|----|----------|
| (Hrs.)  | Muestra         |  |                |   |    |    |          |
| 0   | L <sub>0</sub>  | LP <sub>0</sub>                                      | T <sub>A</sub> | 0   | 24 | 48 | 72 horas |
|   |                 |  | T <sub>R</sub> |   | 10 | 20 | 30 días  |
| 8   | L <sub>8</sub>  | LP <sub>8</sub>                                      | T <sub>A</sub> | 0   | 24 | 48 | 72 horas |
|   |                 |  | T <sub>R</sub> |   | 10 | 20 | 30 días  |
| 16  | L <sub>16</sub> | LP <sub>16</sub>                                     | T <sub>A</sub> | 0   | 24 | 48 | 72 horas |
|   |                 |  | T <sub>R</sub> |   | 10 | 20 | 30 días  |
| 24  | L <sub>24</sub> | LP <sub>24</sub>                                     | T <sub>A</sub> | 0   | 24 | 48 | 72 horas |
|   |                 |  | T <sub>R</sub> |   | 10 | 20 | 30 días  |

T<sub>A</sub> = 23°C

T<sub>R</sub> = 4°C

## 4.2 Pasteurización de la leche

Inmediatamente después de la recepción de las muestras de leche, se determinó la calidad microbiológica inicial de cada una de ellas, utilizando el kit de resazurina propuesto y la prueba de reducción de la resazurina normal.

Al término del periodo de almacenamiento respectivo, las muestras de leche se pasteurizaron en matraces de 1000 ml., a fuego directo a 63 °C durante 30 min., (pasteurización lenta). Cada muestra de leche se subdividió en 2 partes que se colocaron en matraces estériles de 500 ml., se taparon herméticamente y se etiquetaron respectivamente con el tratamiento asignado. Así, un matraz se guardó a 23 °C mientras que el otro se almacenó a 4 °C. El tiempo de almacenamiento para cada muestra es el indicado en el cuadro 6.

#### 4.3 Determinación de la calidad microbiológica de las muestras de leche.

##### 4.3.1 Método de recuento en placas

Al finalizar el periodo de almacenamiento correspondiente a cada tratamiento, se determinó la flora presente por duplicado, por el método de recuento en placas o recuento de colonias. Se plaquearon las diluciones de leche desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^{-9}$ , utilizando un medio de cultivo para recuento total (24) ("Plate Count" Bioxon de México, S.A. cat. 13-4. Oaxaca, Oax.). Las placas se incubaron a 32 °C durante un periodo de 72 h. El recuento de la flora presente en las placas se realizó visualmente.

##### 4.3.2 Método de reducción de la resazurina normal

Se determinó la calidad microbiológica de la leche, utilizando la prueba de reducción de la Resazurina (12). Para realizar esta prueba, se preparó una solución de resazurina según la metodología explicada a continuación: Se disolvieron 0.0005 gramos de resazurina en polvo en un volumen menor a 1 litro de agua destilada caliente, se agita y se afora con agua destilada fría hasta un volumen de 1 litro.

La solución se conserva en un recipiente de color ambar por no más de un periodo de 8 días. De esta solución se toma 1 ml., se deposita en un tubo de ensayo y se agregan 10 ml. de la leche problema, se tapa herméticamente, se invierte el tubo 3 veces para mezclar la leche con la solución colorante. Se incuba el tubo a 37 °C en baño maría, después de un plazo de 5 minutos en que la leche alcanza la temperatura de incubación se comienza a cronometrar el tiempo de incubación. Los tubos pueden ser incubados por un periodo de tiempo que puede variar entre una y tres horas.

La clasificación de las muestras en función del vire ó decoloración (12) después de una hora de incubación es la indicada a continuación:

| <u>CLASE</u> | <u>CALIDAD</u> | <u>COLOR DEL VIRE</u> |
|--------------|----------------|-----------------------|
| Clase 1      | Excelente      | Azul                  |
| Clase 2      | Buena          | Púrpura               |
| Clase 3      | Aceptable      | Malva                 |
| Clase 4      | Pobre          | Malva rosado          |
| Clase 5      | Mala           | Rosa encendido        |
| Clase 6      | Muy mala       | Blanca                |

Después de 1 hora de incubación a 37 °C, cualquier muestra que haya cambiado al color rosa es calificada como proveniente de una leche de mala calidad.

Después de 2 horas de incubación, las muestras que tengan un color rosa son clasificadas como aceptables, después de 3 horas como buena y después de 4 horas o más como muy buena.

Cualquier muestra que adquiriera color blanco después de 1 hora es clasificada como de muy baja calidad microbiológica (12).

#### 4.3.3 Método del kit de resazurina

Para el diagnóstico de la calidad microbiológica de la leche, se desarrolló un kit de resazurina, basado en la Prueba de Reducción de la Resazurina. El kit consiste en un recipiente de vidrio transparente de 8 ml., el cual contiene una solución de resazurina, que posteriormente se seca.

Para preparar la solución, se pesaron 0.0125 mg., de resazurina, se disolvió en 15 ml., de agua destilada caliente y se aforó con agua destilada fría con una pipeta volumétrica a un volumen final de 25 ml. La solución ya preparada se agitó y se tomaron, con pipetas estériles alicuotas de 0.05

ml., para depositarias en cada tubo de vidrio ; se cerraron ligeramente con tapón de baquelita.

Para secar la solución se colocaron los tubos en una gradilla metálica, y se introdujeron a una estufa a 80 °C durante 12 horas.

Los kits de resazurina se conservaron almacenados a temperatura ambiente durante periodos hasta de 10 meses.

Para el uso del kit de resazurina, se tomó una muestra de 5 ml. de leche con pipeta estéril y se añadió al kit, se tapó herméticamente, se agitó perfectamente y se guardó en una bolsa de la ropa pegada al cuerpo (37 °C) durante 3 horas. Se registró el color de la leche inicialmente y cada hora durante un periodo de 3 horas.

Se utilizó este kit para determinar la calidad microbiológica de muestras de leche tratadas bajo las condiciones ilustradas en el cuadro 6.

Se hicieron las pruebas de calidad microbiológica por los 3 métodos ya descritos. Se determinaron los tiempos de vire al violeta, al rosa y al blanco en el kit de resazurina y en la prueba de la resazurina normal para todas las muestras estudiadas. Cuadro 6.

En el análisis de los resultados, se consideran únicamente los tiempos de vire al rosa para las pruebas de resazurina normal, el kit de resazurina y las cuentas totales

correspondientes.

Los resultados se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS (25). Se determinó la correlación entre el tiempo de vire al rosa en el Kit y el tiempo de vire al rosa medido por la prueba de la resazurina normal, y entre el tiempo de vire al rosa en el Kit y el número de cuentas totales expresado en forma logarítmica para los resultados de los grupos de tratamientos del cuadro 6.

Se determinaron las ecuaciones de regresión, que predicen la relación entre el tiempo de vire al rosa en el kit y en la prueba de resazurina normal y entre el tiempo de vire al rosa en el Kit y las cuentas totales para los grupos de tratamientos ya indicados. Cuadro 6.

La correlación entre los 3 métodos estudiados se determinó (26) por medio de la ecuación:

$$r^2 = \frac{[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}]^2}{[(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})]}$$

en donde:

x = tiempo de vire al rosa en la prueba de reducción de la resazurina (h).

$y =$  tiempo de vire al rosa en el kit de resazurina (h)

$y = \log_{10}$  cuentas totales (m.o./ml).

De esta manera se determinó el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para los resultados obtenidos de todas las muestras de leche correspondientes a los grupos de leche L<sub>0</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>16</sub> y L<sub>24</sub>.

Se determinó el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para los resultados obtenidos de todas las muestras de leche del grupo L<sub>0</sub> y L<sub>8</sub>.

Se determinó el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para los resultados obtenidos de todas las muestras de leche del grupo L<sub>16</sub> y L<sub>24</sub>.

Se determinó el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para los resultados obtenidos de las muestras de leche LP<sub>0</sub>T<sub>0</sub>, LP<sub>8</sub>T<sub>8</sub>, LP<sub>16</sub>T<sub>16</sub>, LP<sub>24</sub>T<sub>24</sub>, LP<sub>0</sub>T<sub>8</sub>, LP<sub>0</sub>T<sub>16</sub>, LP<sub>0</sub>T<sub>24</sub>, LP<sub>8</sub>T<sub>0</sub>, LP<sub>8</sub>T<sub>16</sub>, LP<sub>8</sub>T<sub>24</sub>, LP<sub>16</sub>T<sub>0</sub>, LP<sub>16</sub>T<sub>8</sub>, LP<sub>16</sub>T<sub>24</sub>, LP<sub>24</sub>T<sub>0</sub>, LP<sub>24</sub>T<sub>8</sub>, LP<sub>24</sub>T<sub>16</sub>.

Se determinó el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para los resultados obtenidos de las muestras de leche LP<sub>0</sub>A<sub>0</sub>, LP<sub>8</sub>A<sub>8</sub>, LP<sub>16</sub>A<sub>16</sub>, LP<sub>24</sub>A<sub>24</sub>, LP<sub>0</sub>A<sub>8</sub>, LP<sub>0</sub>A<sub>16</sub>, LP<sub>0</sub>A<sub>24</sub>, LP<sub>8</sub>A<sub>0</sub>, LP<sub>8</sub>A<sub>16</sub>, LP<sub>8</sub>A<sub>24</sub>, LP<sub>16</sub>A<sub>0</sub>, LP<sub>16</sub>A<sub>8</sub>, LP<sub>16</sub>A<sub>24</sub>, LP<sub>24</sub>A<sub>0</sub>, LP<sub>24</sub>A<sub>8</sub>, LP<sub>24</sub>A<sub>16</sub>.

## V. Resultados

Los resultados de los tiempos de vire al violeta, al rosa y al blanco utilizando la prueba de reducción de la resazurina normal, la prueba de reducción de resazurina en Kit y los logaritmos de las cuentas bacterianas totales determinadas por el método de recuento en placas, para cada una de las muestras de leche utilizadas en la etapa experimental, se muestran en el cuadro 7.

De los resultados del tiempo de vire de la resazurina al violeta, al rosa y al blanco empleando los 2 métodos de reducción de la resazurina; el tiempo de vire al rosa es el que nos proporciona una información más clara para manejar la determinación microbiológica de las muestras de leche. Es por ésto, que el análisis estadístico se llevó a cabo a partir de los datos del tiempo de vire al rosa tanto en la prueba de reducción de la resazurina normal, como en el Kit de resazurina propuesto, y sus correspondientes cuentas bacterianas. Adicionalmente, el tono rosa es fácil de identificar visualmente, lo que es una ventaja con respecto a los otros tonos.

Los resultados de los tratamientos estadísticos correspondientes a los grupos de muestras de leche estudiados se resumen en el cuadro 8.

CUADRO 7

## RESULTADOS DE LA ETAPA EXPERIMENTAL

| MUESTRAS<br>DE LECHE | TIEMPOS DE VIRE DE LA RESAZURINA (HRS.) |                    |                 |                 |                   |                   | LOG COLONIAS<br>BACTERIANAS | COLONIAS<br>(n.o./ml) |
|----------------------|---|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                      | AL VIOLETA<br>R.N.                      | AL VIOLETA<br>R.K. | AL ROSA<br>R.N. | AL ROSA<br>R.K. | AL BLANCO<br>R.N. | AL BLANCO<br>R.K. |                             |                       |
| L                    | 1.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 4.86                        | 74,000                |
| O                    | 0.5                                     | 0.5                | 2.5             | 2.5             | 3.5               | 3.5               | 5.40                        | 252,500               |
| LP T                 | 3.0                                     | 2.0                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.68                        | 4,833                 |
| O A (0)              | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 2.95                        | 900                   |
| LP T                 | 1.5                                     | 1.5                | 2.5             | 2.5             | 2.5               | 3.5               | 5.50                        | 322,000               |
| O A (24)             | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.92                        | 8,325                 |
| LP T                 | 1.5                                     | 1.5                | 1.5             | 1.5             | 1.5               | 1.5               | 6.25                        | 1,800,000             |
| O A (48)             | 1.5                                     | 1.5                | 2.5             | 2.5             | 3.5               | 3.5               | 7.07                        | 11,800,000            |
| LP T                 | 0.0                                     | 0.0                | 0.5             | 0.5             | 0.5               | 0.5               | 6.57                        | 3,725,000             |
| O A (72)             | 0.0                                     | 0.0                | 0.5             | 0.5             | 2.5               | 2.5               | 7.67                        | 47,660,000            |
| LP T                 | 2.5                                     | 2.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.17                        | 1,500                 |
| O R (10)             | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 2.69                        | 500                   |
| LP T                 | 2.5                                     | 2.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.17                        | 1,500                 |
| O R (20)             | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 2.90                        | 800                   |
| LP T                 | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 4.04                        | 11,066                |
| O R (30)             | 3.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 2.90                        | 800                   |
| L                    | 2.5                                     | 2.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 5.02                        | 106,000               |
| B                    | 0.0                                     | 0.0                | 0.5             | 0.5             | 0.5               | 0.5               | 7.70                        | 51,000,000            |
| LP T                 | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.47                        | 3,000                 |
| B A (0)              | 1.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.00                        | 1,000                 |
| LP T                 | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.54                        | 3,500                 |
| B A (24)             | 1.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 4.14                        | 14,000                |
| LP T                 | 0.5                                     | 0.5                | 1.5             | 1.5             | 3.5               | 3.5               | 5.65                        | 456,000               |
| B A (48)             | 0.5                                     | 0.5                | 0.5             | 2.5             | 2.5               | 3.5               | 5.95                        | 900,000               |
| LP T                 | 0.5                                     | 0.5                | 0.5             | 0.5             | 2.5               | 2.5               | 6.47                        | 2,985,000             |
| B A (72)             | 0.5                                     | 0.5                | 0.5             | 0.5             | 2.5               | 2.5               | 6.72                        | 5,250,000             |
| LP T                 | 2.5                                     | 2.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.98                        | 9,583                 |
| B R (10)             | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 2.92                        | 850                   |
| LP T                 | 2.5                                     | 2.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 7.56                        | 37,150,000            |
| B R (20)             | 3.5                                     | 3.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 2.84                        | 700                   |

## RESULTADOS DE LA ETAPA EXPERIMENTAL

| MUESTRAS<br>DE LECHE | TIEMPOS DE VIRE DE LA RESAZURINA (HRS.) |                    |                 |                 |                   |                   | LOG COLONIAS<br>BACTERIAS | COLONIAS<br>(n.o./ml)       |
|----------------------|---|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                      | AL VIOLETA<br>R.N.                      | AL VIOLETA<br>R.K. | AL ROSA<br>R.N. | AL ROSA<br>R.K. | AL BLANCO<br>R.N. | AL BLANCO<br>R.K. |                           |                             |
| LP T<br>8 R (30)     | 1.5<br>3.5                              | 1.5<br>3.5         | 2.5<br>3.5      | 2.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 7.51<br>2.97              | 32,600,000<br>950           |
| L<br>16              | 0.0<br>0.5                              | 0.0<br>0.5         | 0.5<br>0.5      | 0.5<br>0.5      | 1.5<br>1.5        | 1.5<br>1.5        | 7.75                      | 56,500,000                  |
| LP T<br>16 A (0)     | 1.5<br>1.5                              | 1.5<br>1.5         | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 3.30                      | 2,000                       |
| LP T<br>16 A (24)    | 1.5<br>1.5                              | 1.5<br>1.5         | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 3.81<br>3.87              | 6,500<br>7,500              |
| LP T<br>16 A (48)    | 0.5<br>0.5                              | 0.5<br>0.5         | 0.5<br>0.5      | 0.5<br>0.5      | 0.5<br>3.5        | 0.5<br>3.5        | 7.06<br>7.17              | 11,500,000<br>15,000,000    |
| LP T<br>16 A (72)    | 0.0<br>0.0                              | 0.0<br>0.0         | 0.5<br>0.5      | 0.5<br>0.5      | 0.5<br>0.5        | 0.5<br>0.5        | 8.14<br>8.74              | 141,000,000<br>555,000,000  |
| LP T<br>16 R (10)    | 2.5<br>2.5                              | 2.5<br>2.5         | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 5.00<br>5.00              | 100,000<br>100,000          |
| LP T<br>16 R (20)    | 2.5<br>2.5                              | 2.5<br>2.5         | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 4.65                      | 45,000                      |
| LP T<br>16 R (30)    | 2.5                                     | 2.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 5.50                      | 320,000                     |
| L<br>24              | 0.0<br>0.0                              | 0.0<br>0.0         | 0.5<br>0.5      | 0.5<br>0.5      | 1.5<br>1.5        | 1.5<br>0.5        | 8.45<br>8.36              | 281,750,000<br>231,833,333  |
| LP T<br>24 A (0)     | 3.5<br>3.5                              | 1.5<br>0.5         | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 3.90<br>5.47              | 8,000<br>300,000            |
| LP T<br>24 A (24)    | 3.5<br>2.5                              | 3.5<br>0.5         | 3.5<br>2.5      | 3.5<br>2.5      | 3.5<br>3.5        | 3.5<br>3.5        | 4.51<br>5.47              | 33,000<br>300,000           |
| LP T<br>24 A (48)    | 0.0<br>2.5                              | 1.5<br>0.0         | 0.0<br>2.5      | 0.0<br>2.5      | 0.5<br>3.5        | 0.5<br>3.5        | 8.60<br>7.60              | 405,000,000<br>40,000,000   |
| LP T<br>24 A (72)    | 0.0<br>0.5                              | 0.0<br>0.5         | 0.0<br>0.5      | 0.0<br>0.5      | 0.0<br>0.5        | 0.0<br>0.5        | 9.12<br>7.47              | 1,331,666,666<br>30,000,000 |

CUADRO 7

## RESULTADOS DE LA ETAPA EXPERIMENTAL

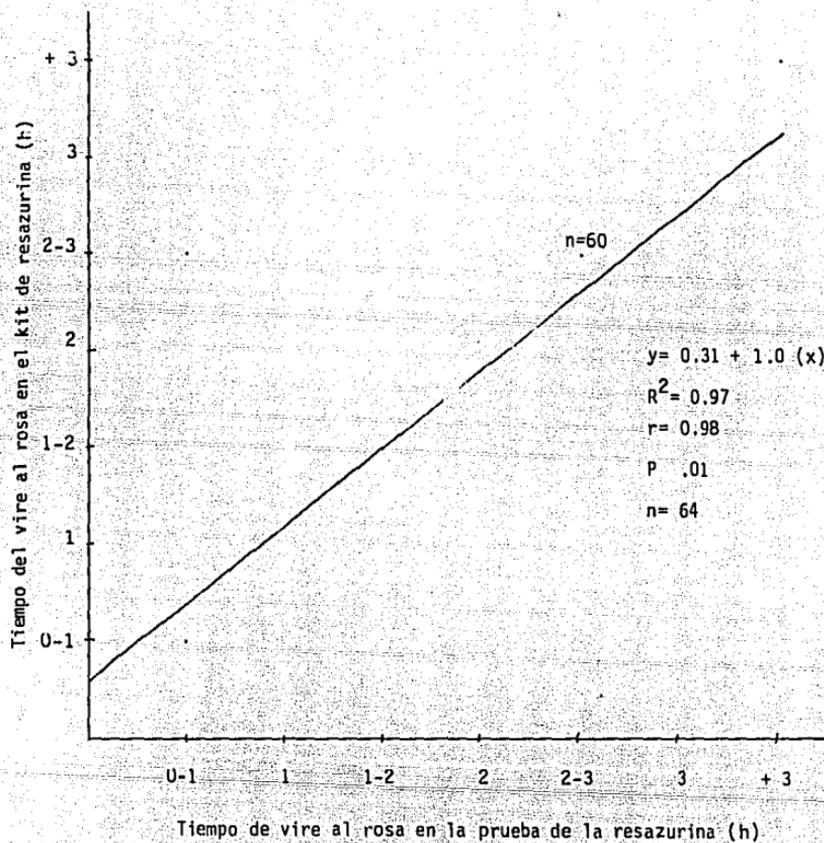
| MUESTRAS<br>DE LECHE | TIEMPOS DE VIRE DE LA RESAZURINA (HRS.) |                    |                 |                 |                   |                   | LOG COLONIAS<br>BACTERIAS | COLONIAS<br>(n.o./ml) |
|----------------------|---|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
|                      | AL VIOLETA<br>R.N.                      | AL VIOLETA<br>P.K. | AL ROSA<br>R.N. | AL ROSA<br>R.K. | AL BLANCO<br>R.N. | AL BLANCO<br>R.K. |                           |                       |
| LP T                 | 1.5                                     | 2.5                | 1.5             | 1.5             | 3.5               | 3.5               | 3.69                      | 5,000                 |
| 24 R (10)            | 3.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.54                      | 3,500                 |
| LP T                 | 3.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 4.87                      | 75,000                |
| 24 R (20)            | 3.5                                     | 1.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.31                      | 2,850                 |
| LP T                 | 0.5                                     | 1.5                | 0.5             | 0.5             | 3.5               | 3.5               | 7.23                      | 17,300,000            |
| 24 R (30)            | 3.5                                     | 0.5                | 3.5             | 3.5             | 3.5               | 3.5               | 3.30                      | 2,600                 |

Cuadro B

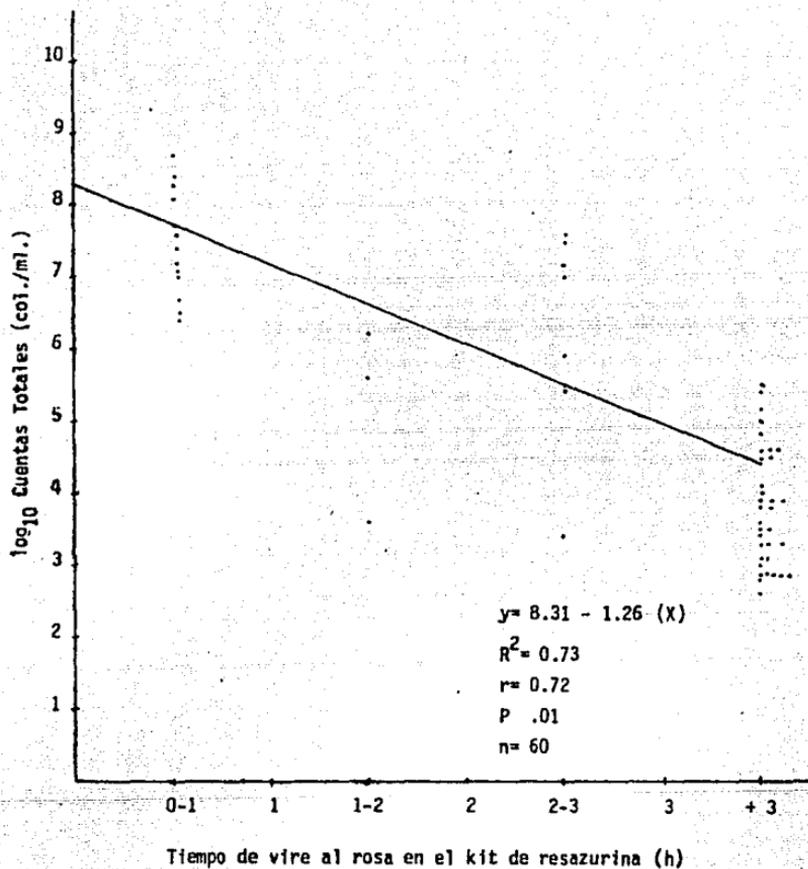
## RESUMEN DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LAS MUESTRAS DE LECHE ESTUDIADAS

| MUESTRAS DE LECHE   | ANÁLISIS     | n  | EC. DE REGRESION      | R <sup>2</sup> | r    | P  |
|---|--------------|----|-----------------------|----------------|------|----|
| Todos los grupos de muestras de leche   | R.N. vs. Kit | 64 | $y = 0.31 + 1.0 (x)$  | 0.97           | 0.98 | ** |
|   | C.T. vs. Kit | 60 | $y = 8.31 - 1.26 (x)$ | 0.73           | 0.72 | ** |
| Todas las muestras de los grupos L <sub>0</sub> y L <sub>8</sub>                                | R.N. vs. Kit | 32 | $y = 0.97 + 1.01 (x)$ | 0.91           | 0.96 | ** |
|   | C.T. vs. Kit | 32 | $y = 8.0 - 1.23 (x)$  | 0.71           | 0.70 | ** |
| Todas las muestras de los grupos L <sub>16</sub> y L <sub>24</sub>                              | R.N. vs. Kit | 32 | $y = 0 + 1 (x)$       | 1.0            | 1.0  | ** |
|   | C.T. vs. Kit | 28 | $y = 8.32 - 1.2 (x)$  | 0.74           | 0.73 | ** |
| LP <sub>0</sub> <sup>T</sup> R (0, 10, 20, 30)  | R.N. vs. Kit | 24 | $y = 0 + 1 (x)$       | 1.0            | 1.0  | ** |
| LP <sub>8</sub> <sup>T</sup> R (0, 10, 20, 30)  |              |    |                       |                |      |    |
| LP <sub>16</sub> <sup>T</sup> R (0, 10, 20, 30)   | C.T. vs. Kit | 22 | $y = 7.16 - 0.9 (x)$  | 0.21           | 0.17 | *  |
| LP <sub>24</sub> <sup>T</sup> R (0, 10, 20, 30)   |              |    |                       |                |      |    |
| LP <sub>0</sub> <sup>T</sup> A, LP <sub>8</sub> <sup>T</sup> A, LP <sub>16</sub> <sup>T</sup> A | R.N. vs. Kit | 40 | $y = 0.25 + 0.99 (x)$ | 0.95           | 0.98 | ** |
| LP <sub>24</sub> <sup>T</sup> A (0, 24, 48, 72)   | C.T. vs. Kit | 38 | $y = 8.24 - 1.2 (x)$  | 0.78           | 0.78 | ** |

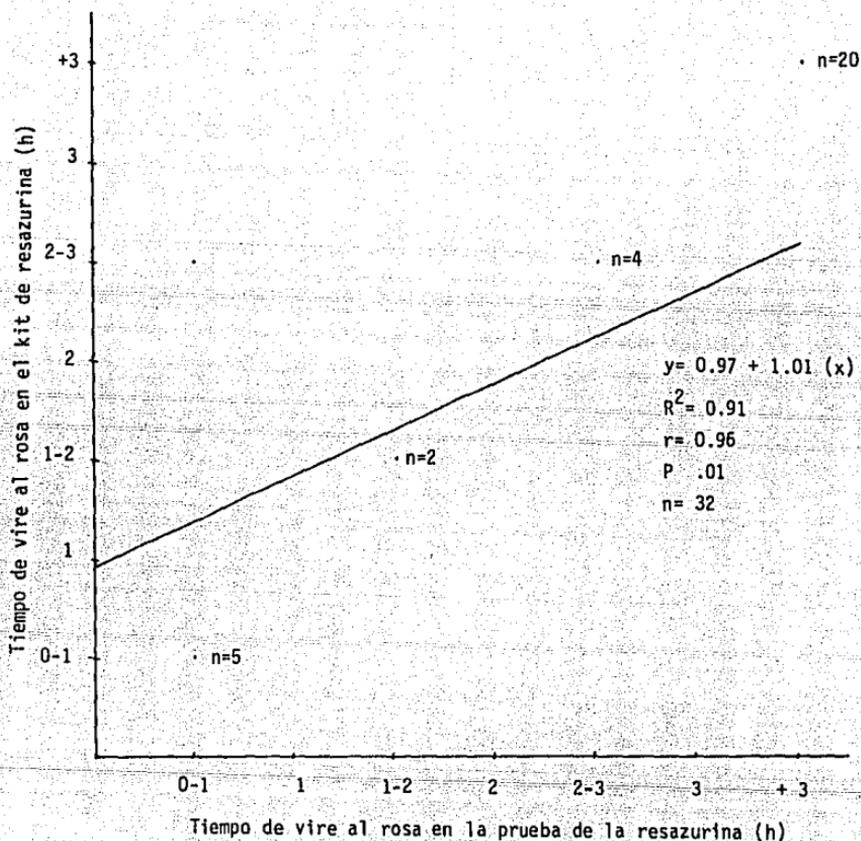
en donde: R.N. = Prueba de red de la resazurina normal  
 Kit = Prueba de la red de la resazurina en el Kit propuesto  
 C.T. = Cuenta bacteriana total por el método de recuento en placas  
 n = Número de muestras en el experimento  
 x = Tiempo de vire al rosa (h)  
 R<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación  
 r = Coeficiente de correlación  
 P = % de probabilidad de la ecuación de regresión  
 \*\* = P ( .01  
 \* = P ( .0342



Gráfica 2. Tiempo de vire al rosa en la prueba de la resazurina y del kit de resazurina para todas las muestras de los tratamientos  $L_0$ ,  $L_8$ ,  $L_{16}$  y  $L_{24}$ .

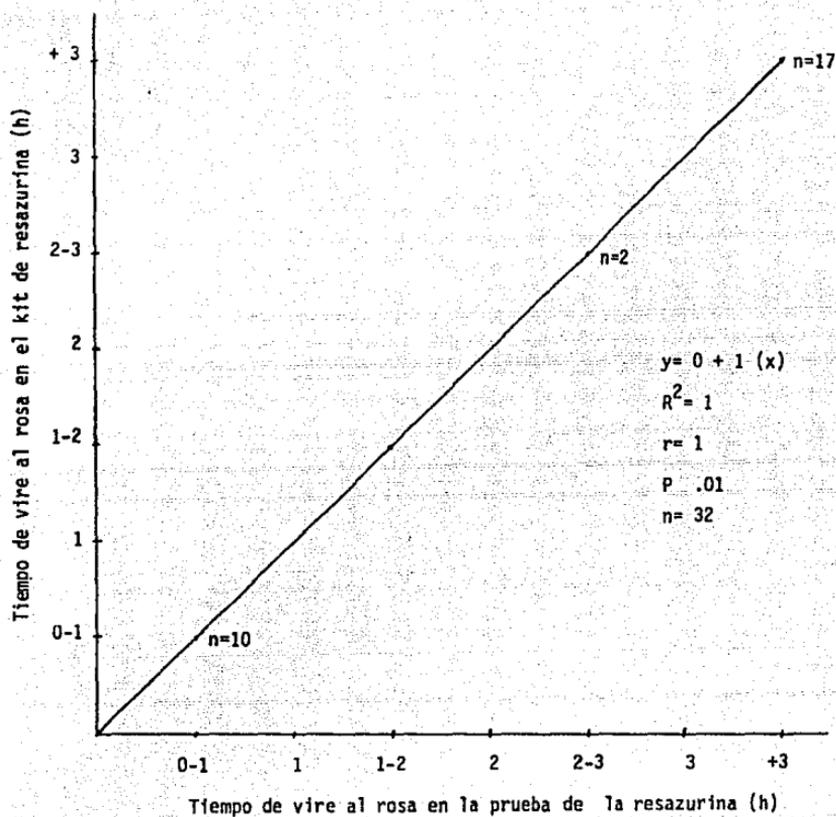


Gráfica 3. Tiempo de vire al rosa en el kit de resazurina y  $\log_{10}$  cuenta bacteriana para las muestras de leche  $L_0, LP_0T_A, T_R; L_8, LP_8T_A, T_R; L_{16}, LP_{16}T_A, T_R; L_{24}, LP_{24}T_A, T_R$ .

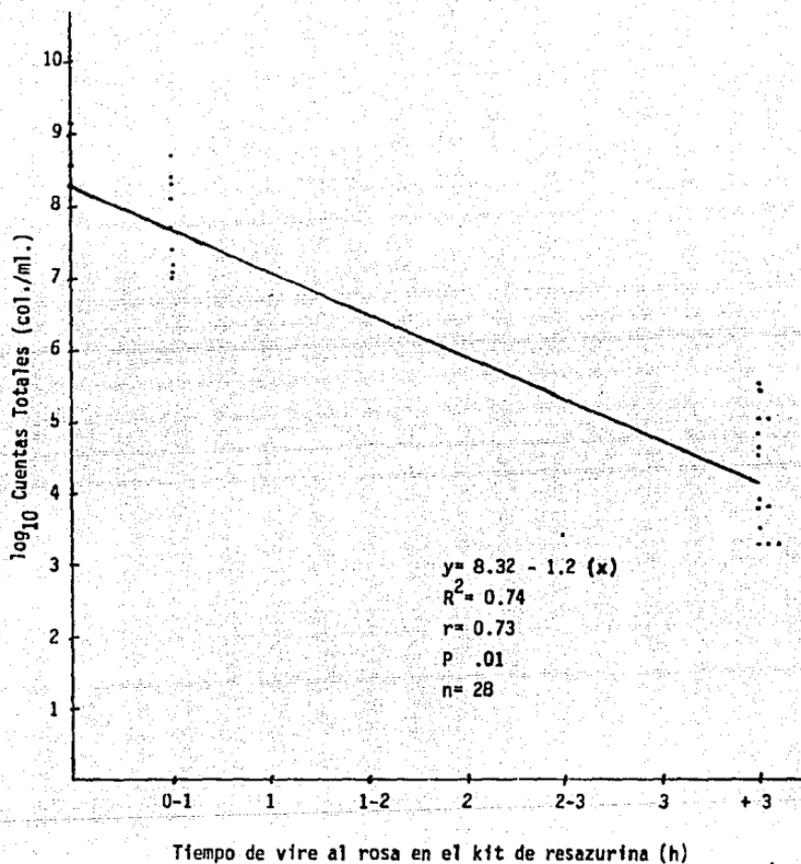


Gráfica 4. Tiempo de vire al rosa en la prueba de la resazurina y del kit de resazurina para las muestras de leche  $L_0$ ,  $LP_0TA$ ,  $T_R$ ;  $L_8$ ,  $LP_8TA$ ,  $T_R$ .

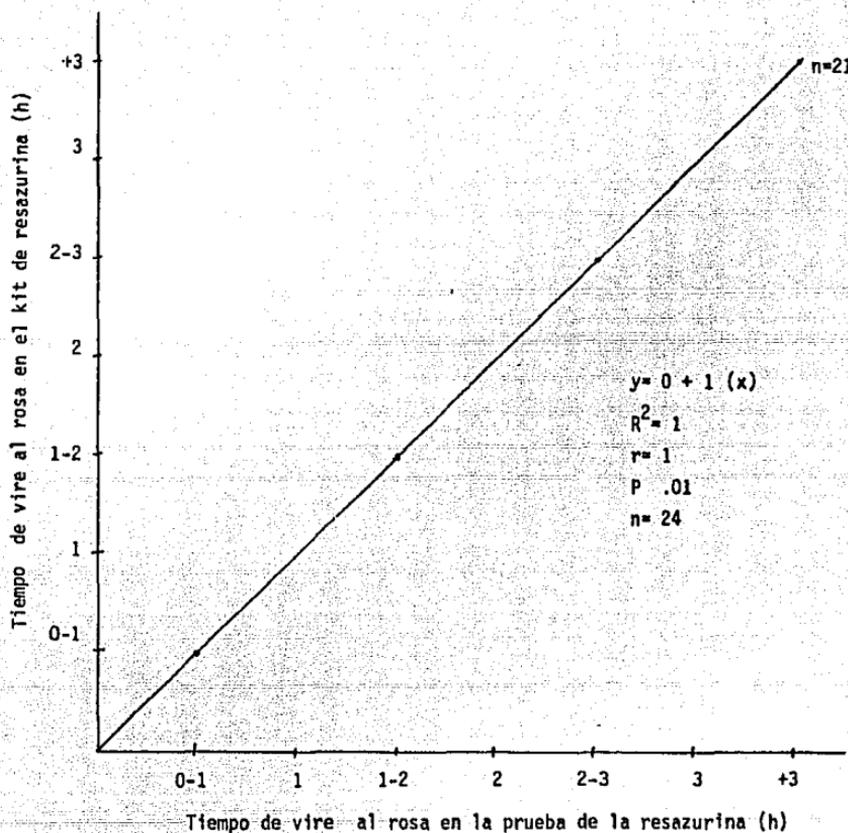




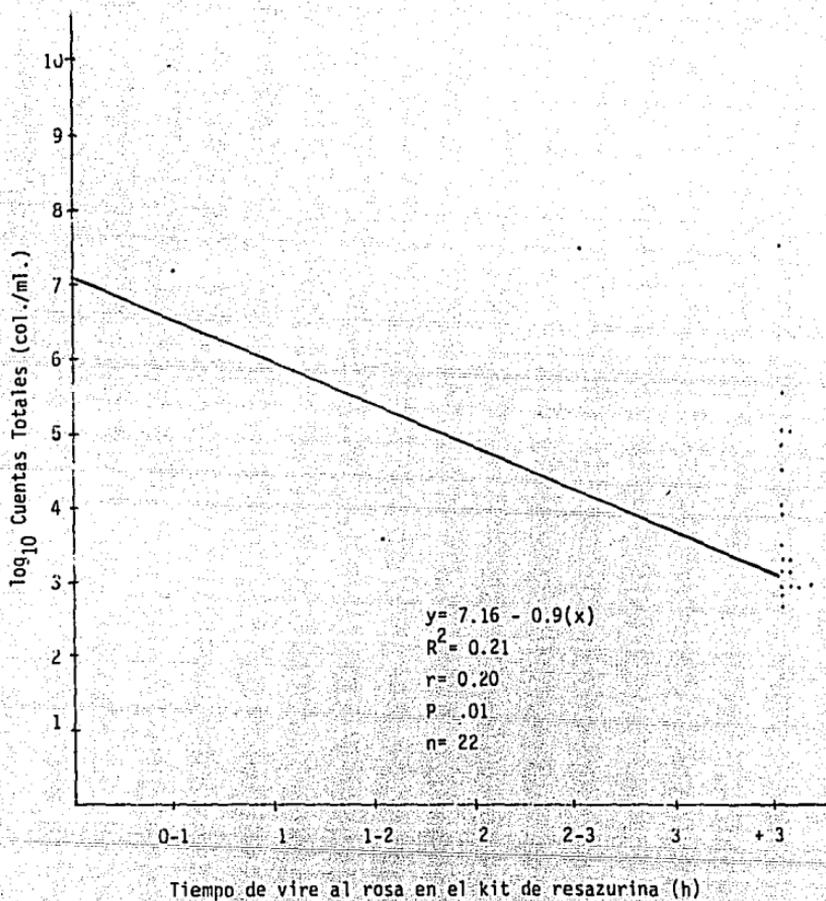
Gráfica 6. Tiempo de vire al rosa en la prueba de la resazurina y del kit de resazurina para las muestras de leche  $L_{16}$ ,  $LP_{16}T_A, T_R$ ;  $L_{24}$ ,  $LP_{24}T_A, T_R$ .



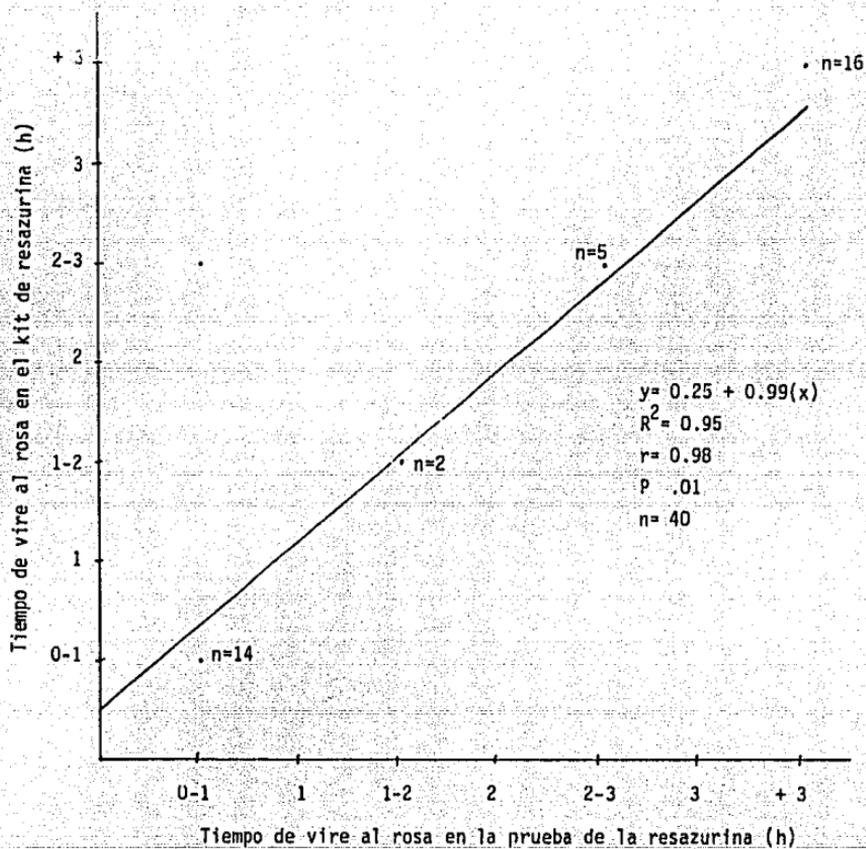
Gráfica 7. Tiempo de vire al rosa en el kit de resazurina y  $\log_{10}$  cuenta bacteriana para las muestras de leche  $L_{16}$ ,  $LP_{16}T_A$ ,  $T_R$ ,  $L_{24}$ ,  $LP_{24}T_A$ ,  $T_R$ .



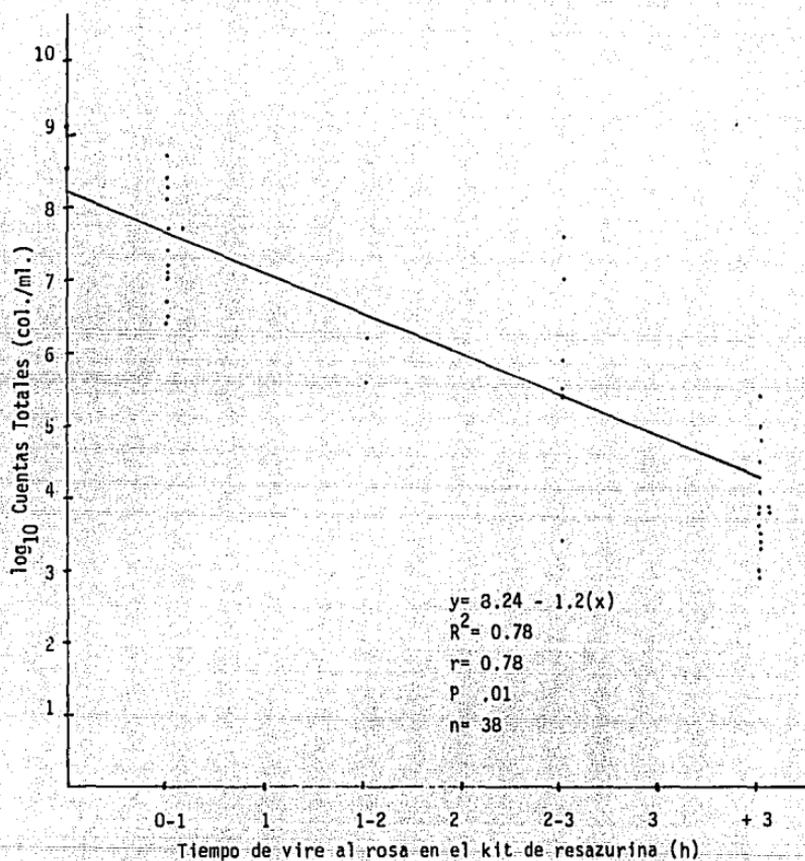
Gráfica 8. Tiempo de vire al rosa en la prueba de la resazurina y del kit de resazurina para las muestras de leche  $LP_0T_R$ ;  $LP_8T_R$ ;  $LP_{16}T_R$ ;  $LP_{24}T_R$ .



Gráfica 9. Tiempo de vire al rosa en el kit de resazurina y log<sub>10</sub> cuenta bacteriana para las muestras de leche LP<sub>0</sub>T<sub>R</sub>; LP<sub>8</sub>T<sub>R</sub>; LP<sub>16</sub>T<sub>R</sub>; LP<sub>24</sub>T<sub>R</sub>.



Gráfica 10. Tiempo de vire al rosa en la prueba de la resazurina y del kit de resazurina para las muestras de leche  $L_0$ ,  $LP_0T_A$ ;  $L_8$ ,  $LP_8T_A$ ;  $L_{16}$ ,  $LP_{16}T_A$ ;  $L_{24}$ ,  $LP_{24}T_A$ .



Gráfica 11. Tiempo de vire al rosa en el kit de resazurina y  $\log_{10}$  cuenta bacteriana para las muestras de leche  $L_0$ ,  $LP_0^{TA}$ ;  $L_8$ ,  $LP_8^{TA}$ ;  $L_{16}$ ,  $LP_{16}^{TA}$ ;  $L_{24}$ ,  $LP_{24}^{TA}$ .

## VI. Discusion

En la práctica se ha establecido que una leche que hace virar a la resazurina al color rosa en un periodo de tiempo menor a 2 horas es una leche de baja calidad, de la misma manera en nuestro estudio se consideró el tiempo de vire de la resazurina al rosa como el criterio semi-cuantitativo para establecer la calidad de la leche.

La correlación negativa obtenida entre el tiempo de vire al rosa de la resazurina en Kit y el número de colonias determinadas por el método de recuento en placas en todas las muestras, indica una relación inversa entre estos dos parámetros.

Esta relación refleja un fenómeno biológico conocido; es decir el tiempo necesario para reducir al colorante (resazurina), es una función de la fuerza o capacidad reductora de las bacterias y en menor grado por el número de éstas presentes (19).

En las respectivas gráficas se muestra como el tiempo de vire al rosa de la resazurina es menor mientras mayor es el número de colonias presentes en la muestra de leche. Gráficas 4,6,8 y 10).

La velocidad a la cual se lleva a cabo el vire del color, varia considerablemente y se halla en función de las especies de microorganismos presentes, sus velocidades de desarrollo y su metabolismo a diversas temperaturas. En particular los Streptococos y el grupo coli-aerogenes poseen una intensa fuerza reductora. (15)

El coeficiente de correlación entre los dos métodos basados en la reducción de la resazurina es elevado (entre 1 y 0.96), independientemente del tratamiento a que se asignaron las muestras. Esto se debe a que ambos métodos se fundamentan en la fuerza reductora determinada por la actividad bacteriana.

El coeficiente de correlación obtenido para el tiempo de vire al rosa de la resazurina en Kit y el número de colonias presentes en las muestras de leche LP T ,  
0 R(0,10,20,30)  
LP T , LP T , LP T ,  
8 R(0,10,20,30) 16 R(0,10,20,30) 24 R(0,10,20,30)  
es bajo ( $r = 0.17$ ). Lo anterior puede explicarse dado que la evolución bacteriana a temperaturas de refrigeración (4 °C) es inhibida y se requiere de un tiempo mayor a 3 horas para que la cuenta bacteriana alcance un número considerable; el cual pueda tener un potencial de reducción suficiente para originar la decoloración de la resazurina.

Efectivamente, la cuenta de colonias es baja (menor de  $1 \times 10^5$  n.o./ml) en 18 de las 22 muestras (gráfico 10), y sólo en 3 muestras hubo la aparición del color rosa en el kit de resazurina.

Estos resultados concuerdan con la experimentación realizada por Frayer (27) con muestras refrigeradas de leche de consumo, con las cuales determinó el tiempo de vire al rosa empleando el método de reducción de la resazurina normal.

Adicionalmente, existen microorganismos con débil fuerza reductora de colorantes y este factor explica la falta de correlación entre las cuentas de colonias y el tiempo de reducción de sustancias colorantes.

Debe recordarse que las prueba de reducción de la resazurina normal o en kit, no son métodos de cuantificación del contenido microbiano de una muestra de leche, sino métodos semi-cuantitativos que dan información sobre la actividad de la población bacteriana en un momento determinado.

Las ecuaciones de regresión, determinadas para cada grupo de muestras, son útiles para la predicción del número de colonias bacterianas en función del tiempo de vire al rosa de la resazurina en kit.

Las ecuaciones de regresión son altamente significativas  
(  $P < .01$  ) en cuatro de los cinco bloques de tratamientos.

En el presente estudio no se determinaron coeficientes de correlación entre el tiempo de vire de la resazurina normal y el log<sup>10</sup> de cuentas totales, dado que el objetivo no es comprobar la representatividad entre ambos métodos.

Sin embargo dada la elevada correlación entre tiempos de vire en el kit de resazurina y la prueba de resazurina normal podemos deducir que el comportamiento de esta última frente al log<sup>10</sup> de cuentas totales sería el mismo que el del kit de resazurina.

## VII. Conclusiones

- 1.- Los resultados obtenidos sugieren que es posible reemplazar el método de reducción de resazurina normal por el método del kit de resazurina para la evaluación semi-cuantitativa de la calidad microbiológica, tanto en leche cruda, como pasteurizada y almacenada a 4 °C ó 23 °C, sin alterar la precisión y reproducibilidad del método.
- 2.- El kit de resazurina puede ser utilizado en una gama amplia de condiciones que representan la realidad del manejo de la leche a partir de su obtención hasta su comercialización y consumo.
- 3.- El kit de resazurina es un método confiable ( $P < .01$ ) para determinar semi-cuantitativamente la calidad microbiológica de la leche con baja actividad bacteriana como es el caso de las muestras de los grupos L<sub>0</sub> y L<sub>8</sub> (gráfica 6), así como también lo es para leches con una intensa actividad bacteriana como sucede en las muestras de los grupos L<sub>16</sub> y L<sub>24</sub>  
Gráfica 8.

- 4.- Tal como se esperaba, se observó una relación inversa entre el tiempo de vire al rosa de la resazurina en Kit y la calidad microbiológica de la leche; es decir, cuanto mayor es el número de colonias en un volúmen determinado de leche, menor es el tiempo de vire al rosa en el Kit de resazurina.
- 5.- El Kit de resazurina es una práctica sencilla, rápida y confiable para la evaluación semi-cuantitativa de la calidad microbiológica de la leche. Esto permite que el productor, industrial y consumidor conozcan la calidad del producto vendido ó adquirido.
- 6.- El Kit de resazurina es un método que permite por sí mismo información completa de la higiene y capacidad de conservación de la leche fluida y de una manera ventajosa con respecto a los métodos comunmente usados, los cuales son lentos, dispensiosos y requieren de personal especializado.
- 7.- Las ventajas técnico-económicas que tiene el Kit con respecto a otros métodos de control de calidad son:

- No requiere de personal especializado (técnico o profesionalista) para realizar el control de calidad en la leche.
- No requiere de un laboratorio especial para análisis de alimentos.
- No requiere de material y equipo costoso como estufa, balanza analítica, incubadora, pipetas, matraces, tubos de ensayo, material de vidrio que se tenga que estar esterilizando, etc.
- La temperatura de incubación es de 37 °C, temperatura del cuerpo humano.
- Es desechable el material empleado para efectuar la prueba de calidad en la leche.

### Método para el uso del Kit de resazurina

- 1.- Se colocan 5 ml. de la leche problema en el Kit (llenar hasta la marca).
- 2.- Se tapa perfectamente bien.
- 3.- Se invierte el tubo 5 veces para incorporar la leche con el colorante.
- 4.- Se guarda el Kit en una bolsa pegada al cuerpo para que adquiera su temperatura (37 'C).
- 5.- Se registra el vire o cambio de color por un período de 3 horas.

### INTERPRETACION DE LA LECTURA DEL VIRE DE COLOR EN EL KIT DE RESAZURINA

| Color del vire/tiempo (h) | 0 - 1                                   | 1 - 2                                   | 2 - 3                                   | más de 3                                |
|---------------------------|---|---|---|---|
| Violeta                   | $1 \times 10^5 - 1 \times 10^9$ m.o./ml | $1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$ m.o./ml | $1 \times 10^2 - 1 \times 10^5$ m.o./ml | $1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$ m.o./ml |
| Rosa                      | $1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ m.o./ml | $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ m.o./ml | $1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$ m.o./ml | $1 \times 10^2 - 1 \times 10^5$ m.o./ml |
| Bianco                    | $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ m.o./ml | $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ m.o./ml | $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ m.o./ml | $1 \times 10^2 - 1 \times 10^7$ m.o./ml |

## VIII. Pre-factibilidad económica del proyecto.

### 8.1 Antecedentes

El control microbiológico de la leche que se produce y distribuye en el país, requiere de un método sencillo práctico y confiable. Este método debe ser igualmente accesible a pequeños productores, industriales y consumidores.

Debido a las múltiples formas de producción y manejo de la leche los problemas de sanidad son frecuentes. Esto conduce a una gran heterogeneidad en la calidad de la misma.

No obstante, las alternativas disponibles no son métodos sencillos y rápidos para clasificar la leche en función de su calidad y aceptabilidad.

### 8.2 Mercado potencial

La producción de leche en nuestro país es de 19,653 mil litros diarios; de los cuales 4,324 mil litros son pasteurizados.

La producción diaria de leche pasteurizada, está integrada por cerca de 4,324 productores, considerando que cada uno contribuye con 1000 litros diarios aproximadamente. El resto de la leche es producida por pequeños productores y distribuida generalmente como leche cruda.

Nuestro mercado potencial lo consideramos tomando en cuenta la participación relativa de los diferentes sectores.

Los sectores considerados en orden de importancia son los grandes productores, pequeños productores y empresas transformadoras de leche.

En base a la información recabada sobre las estadísticas de la industria lechera en México se puede apreciar que existe un alto porcentaje de grandes y pequeños productores de leche susceptibles de utilizar el kit de resazurina.

Nuestro plan de ventas prevee comercializar 25 000 kits mensuales en el primer año, 50 000 kits en el segundo año y 75 000 kits en el tercero, cuarto y quinto año.

El estudio de pre-factibilidad económica está basado en la Formulación para la Evaluación de Proyectos del Banco Mundial, tomando como referencia cotizaciones del mes de Febrero de 1988.

**CUADRO 1**  
**INVERSION TOTAL REQUERIDA**  
**PARA EL PROYECTO**  
**(DOLARES)**  
**SIN FINANCIAMIENTO**

| CONCEPTO                     | M O N T O     |
|------------------------------|---------------|
| <b>1. INVERSION FIJA</b>     | <b>23,609</b> |
| - MAQUINARIA Y EQUIPO,       | 10,065        |
| - INSTALACIONES (2)          | 1,935         |
| - OTROS EQUIPOS              | 0             |
| - TERRENO                    | 6,261         |
| - MOBILIARIO Y EQUIPO        | 1,304         |
| - OBRA CIVIL                 | 2,957         |
| - IMPREVISTOS (1)            | 1,087         |
| <b>2. INVERSION DIFERIDA</b> | <b>3,714</b>  |
| - INGENIERIA BASICA          | 1,451         |
| - PUESTA EN MARCHA           | 2,263         |
| <b>3. CAPITAL DE TRABAJO</b> | <b>15,072</b> |
| - CAJA Y BANCOS              | 6,292         |
| - INVENTARIOS                | 8,730         |
| - CUENTAS POR COBRAR         | 0             |
| - CUENTAS POR PAGAR          | 0             |
| <b>T O T A L</b>             | <b>42,395</b> |

(1) EQUIVALENTES AL 10% DE LA INVERSION TOTAL

(2) EQUIVALENTES AL 15% DE LA MAQUINARIA

**CUADRO 2**  
**CAPITAL DE TRABAJO REQUERIDO**  
**PARA EL PROYECTO**  
**(DOLARES)**  
**SIN FINANCIAMIENTO**

| CONCEPTO              | : | INICIAL       | TAJOS 1 A 10  |
|-----------------------|---|---------------|---------------|
| 1. CAJA Y BANCOS      | : | 6,292         | 6,292         |
|                       | : | :             | :             |
| 2. INVENTARIOS        | : | 8,780         | 8,780         |
| - MATERIA PRIMA       | : | 2,487         | 2,487         |
| - ENVASE              | : | 6,292         | 6,292         |
| - TAPON DE HULE       | : | 0             | 0             |
| - EMPAQUE             | : | 0             | 0             |
| 3. CUENTAS POR COBRAR | : | 0             | 0             |
|                       | : | :             | :             |
| 4. SUMA               | : | 15,072        | 15,072        |
|                       | : | :             | :             |
| 5. CUENTAS POR PAGAR  | : | 0             | 0             |
|                       | : | :             | :             |
| <b>TOTAL</b>          | : | <b>15,072</b> | <b>15,072</b> |

CUADRO 3  
CAPITAL DE TRABAJO  
BASES DE CALCULO  
(DOLARES)

| CONCEPTO                 | BASES                                      | MONTO<br>INICIAL | MONTO<br>AJOS 1 10 |
|--------------------------|--|------------------|--------------------|
| 1. CAJA Y BANCOS         | 10 DIAS DE PRODUCCION<br>A PRECIO DE VENTA | 6,292            | 6,292              |
| 2. INVENTARIOS           | REQUERIMIENTOS PARA                        | 8,780            | 8,780              |
| A) MATERIALES E INSUMOS  | 10 DIAS DE PRODUCCION                      | 2,487            | 2,487              |
| B) PRODUCTO TERMINADO 1/ |  | 6,292            | 6,292              |
| 3. CUENTAS POR COBRAR    |  | 0                | 0                  |
| 4. CUENTAS POR PAGAR     |  | 0                | 0                  |

1/ CONSIDERADAS A PRECIO DE VENTA

**CUADRO 4**  
**DETALLE DE AMORTIZACIONES Y DEPRECIACIONES**  
**CONSIDERADAS PARA EL PROYECTO**  
**(DOLARES)**

| CONCEPTO               | INVERSION | TASA(%) | AZOS | MONTO |
|------------------------|-----------|---------|------|-------|
| 1. INVERSION FIJA      | 23,609    |         |      | 1,238 |
| - MAQ. Y EQ. DE PROC.  | 10,065    | 8       | 12.5 | 805   |
| - INSTALACIONES        | 1,935     | 8       | 12.5 | 155   |
| - OTROS EQUIPOS        | 0         | 8       | 12.5 | 0     |
| - TERRENO              | 6,261     | 0       | 0    | 0     |
| - MOBIL.Y EQUIPO OFMA. | 1,304     | 10      | 10   | 130   |
| - OBRA CIVIL           | 2,957     | 5       | 20   | 148   |
| - IMPREVISTOS          | 1,087     |         |      |       |
| 2. INVERSION DIFERIDA  | 3,714     |         |      | 371   |
| - INGENIERIA BASICA    | 1,451     | 10      | 10   | 145   |
| - PUESTA EN MARCHA     | 2,263     | 10      | 10   | 226   |



CUADRO 5A  
COSTOS DE OPERACION

|                                 |   | DIARIO (M.N.) | MENSUAL (M.N.) | ANUAL (M.N.) | ANUAL (DLS) |
|---------------------------------|---|---------------|----------------|--------------|-------------|
| 1. MATERIALES E INSUMOS         | 1 TURNO DE OPERACION                    | 483,707       | 10,641,554     | 127,698,648  | 55,521      |
| a)                              | AMPOLLETAS \$55.00/ampolleta X 70708    | 176,770       |                |              |             |
| b)                              | TAPON DE HULE \$36.00/tapon X 70708     | 115,704       |                |              |             |
| c)                              | RESAZURINA \$16.00/kit X 70708          | 51,424        |                |              |             |
| d)                              | ETIQUETAS \$40.00/etiqueta X 70708      | 128,560       |                |              |             |
| e)                              | CAJAS PARA EMPAQUE \$35.00/kit X 707.08 | 11,249        |                |              |             |
| 3. MANO DE OBRA DIRECTA         |   |               | 600,000        | 7,200,000    | 3,130       |
| a)                              | 2 TECNICOS \$300,000.00/TECNICO         | 600,000       |                |              |             |
| 4. MANO DE OBRA INDIRECTA       |   | 1,550,000     | 1,550,000      | 18,600,000   | 8,087       |
| a)                              | 1 GERENTE \$850,000.00                  | 850,000       |                |              |             |
| b)                              | 1 CONTADOR (BUFETE) \$400,000.00        | 400,000       |                |              |             |
| c)                              | 1 VENDEDOR \$300,000.00                 | 300,000       |                |              |             |
| 5. GASTOS ADMINISTRATIVOS       |   | 400,000       | 400,000        | 4,800,000    | 2,087       |
| 6. MANTENIMIENTO Y REPARACIONES |   | 350,000       | 350,000        | 4,200,000    | 1,826       |
| 7. GASTOS DE VENTA              |   | 150,000       | 150,000        | 1,800,000    | 783         |
| T O T A L                       |   |               | 13,691,554     | 164,298,648  | 71,434      |

CUADRO 6  
ESTADO DE RESULTADOS PROFORMA  
(DOLARES)

| CONCEPTO                  | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1. INGRESOS POR VENTAS 1/ | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 | 176,181 |
| 2. COSTOS DE PRODUCCION   | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  | 70,326  |
| - COSTOS DIRECTOS         | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  | 58,652  |
| - COSTOS INDIRECTOS       | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  | 11,675  |
| 3. UTILIDAD BRUTA         | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 | 105,854 |
| 4. GASTOS ADMINISTRACION  | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   | 2,087   |
| 5. GASTOS DE VENTAS       | 783     | 783     | 783     | 783     | 783     | 783     | 783     | 783     | 783     | 783     |
| 6. GASTOS FINANCIEROS     |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| 7. UTILIDAD DE OPERACION  | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 | 102,985 |
| 8. I.S.R. Y R.U. 2/       | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  | 53,552  |
| 9. UTILIDAD NETA          | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  | 49,433  |

1/ CONSIDERA UN TURNO POR DIA Y 280 DIAS HABILES

2/ APLICANDO 10% PARA REPARTO DE UTILIDADES Y 42% DE IMPUESTOS



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dunkley and Pelissier. (1981).  
Journal of Dairy Science. 64 (6) : 975-979
- 2.- Alimentos. Ciencia, Tecnología, Industria. (1985).  
Panorámica de la Producción de Leche en el Mundo,  
10 (3) : 58-59
- 3.- Tablas Estadísticas de la Secretaría de Agricultura y  
Recursos Hidráulicos (SARH). (1986).
- 4.- Dirección General de Econotécnica Agrícola (DGEA).  
1983.
- 5.- Baker, S. K. (1983).  
The Keeping Quality of Refrigerated Pasteurized Milk.  
The Australian Journal of Dairy Technology. 38 (3) :  
124-127
- 6.- Swartling, P. (1968).  
Milk and Dairy Industry. 21 : 87-102.
- 7.- Kandler, G. (1960).  
Milchwissenschaft. 16 :165-171 (citado en ref. 13).

- 8.- Busse, M. (1975).  
Deutsche Milchwirtschaft. 26 (8) : 225-230 (citado en ref. 13).
- 9.- Vögele, P. (1978).  
Die Molkerei - Zeitung Welt der Milch. 32 (48) : 1544-1548. (citado en ref.13).
- 10.- Kessler Gerhard, Heinz. (1981).  
Food Engineering and Dairy Technology. Verlag, A Kessler, Alemania.
- 11.- Badui Dergal, Salvador. (1981).  
Química de los Alimentos. Alhambra, Mexicana., p.375-399.
- 12.- Harvey Clunie, Wm., Hill Harry. (1967).  
Leche, Producción y Control. Academia, España.
- 13.- Demeter, Karl J. (1969).  
Lactobacteriología. Acribia, Zaragoza, España.
- 14.- Burgwarth, Davis. (1950).  
Dictionary of Dairying, 1. Aufl.: 471-473.
- 15.- Jensen, O. (1957).  
Zbl.,F. Bakt. II, 96 : 110-138 (citado en ref.13).

- 16.- Burgworth, Davis., Rowlands and Watson. (1951).  
Dairy Industry. 5 : 1421-1422.
- 17.- Kandler, O. (1962).  
Dtsch. Milk - Ztg. 80 : 1959-1962. (citado en ref.12).
- 18.- Walser y Bohl. (1964).  
Schweiz. Melchztg. 90. Wiss Beil. 101, 102 : 801-808,  
809-811. (citado en ref. 13).
- 19.- Veisseyre, R. (1980).  
Lactología Técnica. Acribia, Zaragoza, España.
- 20.- Pesch y Simmert. (1929).  
Milchw. Forsch. 8 : 568-575. (citado en ref. 12).
- 21.- Thorton, H, R., and E. G. Hastings (1928).  
Journal Bacteriology. 15 (1) : 2.
- 22.- García Rivas, L. M. (1985).  
Estudio de la determinación de la carga máxima de  
bacterias psicrófilas psicrotrofas en leche que pueden  
destruirse por el proceso de pasteurización  
tradicional. Tesis. Universidad Iberoamericana.

- 23.- Galicia Guerra, Esther. (1986).  
Influencia de la contaminación post-pasteurización del  
envasado de la leche. Tesis. Universidad Nacional  
Autónoma de México.
- 24.- Verna, C. (1975).  
Técnicas Generales de Experimentación Bacteriológica.  
El Ateneo. Buenos Aires, p.83.
- 25.- SPSS, Statical Packege for the Social Sciences. (1979).  
A guide for analysis., Mc. Graw-Hill.  
New York, N.Y.
- 26.- Little M. T. and Hills F. J. ( 1978).  
Agricultural Experimentation. Designand Analysis.  
John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y.
- 27.- Frayer, J. M. (1938).  
The resazurin test. A preliminary study. Vermont Agric.  
Exp. Sta. Bull. 435. 1-16.