



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
MENCIÓN ALIMENTOS**



TRABAJO DE GRADO

**“MICROBIOTA BACTERIANA HETERÓTROFA AEROBIA
MESÓFILA, PRESENTE EN LA LECHE CRUDA DEL ESTADO
MÉRIDA”.**

Farm. Alba Morillo S.

Tutor: Dr. Félix Andueza

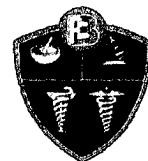


ENERO, 2014





**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
MENCIÓN ALIMENTOS**



X
QR121
M675

TRABAJO DE GRADO

**“MICROBIOTA BACTERIANA HETERÓTROFA AEROBIA
MESÓFILA, PRESENTE EN LA LECHE CRUDA DEL ESTADO
MÉRIDA”.**

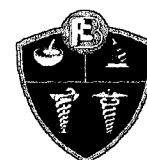
www.bdigital.ula.ve

Trabajo de Grado presentada como requisito
para optar al Título de Magister Scientiae en
Microbiología mención Alimentos
Autora: Farm. Alba Morillo S.
Tutor: Dr. Félix Andueza

ENERO, 2014



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
MENCIÓN ALIMENTOS



MICROBIOTA BACTERIANA HETERÓTROFA AEROBIA MESÓFILA PRESENTE EN LA LECHE CRUDA DEL ESTADO MÉRIDA

Autor: Farm. Alba Morillo
Tutor: Dr. Félix Andueza

RESUMEN

La microbiota bacteriana de la leche cruda se compone de aquellas bacterias que están presentes en la ubre y piel de la vaca, así como de aquellos que se van agregando al producto durante los procesos de manipulación, tratamiento o almacenamiento, debido a la contaminación de los utensilios y el medio ambiente de trabajo, o por transmisión a partir de los trabajadores y ordeñadores de los animales. La variación de la microbiota puede ser asociada a diferentes prácticas de producción. El objetivo de la investigación fue conocer y comparar cuantitativamente y cualitativamente la diversidad de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila presente en leche cruda bovina proveniente de fincas de las zonas altas y fincas de las zonas bajas del Estado Mérida en dos épocas diferentes del año, con el propósito de establecer atributos diferenciadores; basándonos en la hipótesis que las particularidades y características agroecológicas de las zonas altas y las zonas bajas productoras de leche del Estado Mérida establecen diferencias en la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila y ello determina cambios en la diversidad bacteriana y calidad microbiológica de la leche cruda y otros productos derivados de la leche que pueden ser utilizados como atributos diferenciadores, obteniendo como resultado que se observó poca variabilidad en los resultados obtenidos en las diferentes épocas del año. En cuanto al aislamiento la presencia de cocos Gram positivo fue mayor, mientras que los bacilos Gram negativo se presentaron en menos proporción, para la zona alta los géneros presentes fueron: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus* *Streptococcus*, *Leuconoctoc*, mientras que los bacilos Gram positivo fueron *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, para la zona baja *Staphylococcus*, *Enterococcus*; entre los Gram negativo encontramos *Enterobacter*, *Escherichia* *Proteus*, *Citrobacter* *Serratias*, *Klebsiella*, *Aeromonas*; predominando estos bacilos fermentadores sobre los no fermentadores, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*; la zona con mayor biodiversidad según el índice de Shannon es la zona baja, representando un potencial en cuanto a la industria láctea se refiere, ya que estos microorganismos podrían otorgar un valor agregado o diferenciador a los productos lácteos elaborados a partir de la leche producida en la zona.

Palabras claves: Microbiota, leche cruda, biodiversidad, denominación de origen.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTY OF PHARMACY AND BIOANALYSIS
GRADUATE STUDIES OF MICROBIOLOGY
MASTER'S DEGREE IN MICROBIOLOGY
MINOR IN FOOD



AEROBIC MESOPHILIC HETEROTROPHIC BACTERIAL MICROBIOTA PRESENT THE RAW MILK OF THE STATE OF MERIDA

Author: Alba Morillo, BSc in Pharmacy
Tutor: Dr. Félix Andueza

SUMMARY

The bacteria microbiota of raw milk is composed of those bacteria that are present in the cow's udder and skin as well as those that add to the product during the handling, treatment or storage processes due to the contamination of the utensils and the working environment, or by transmission from the workers and milkers of the animals. The variation of the microbiota can be associated to different practices of production. The objective of the research was to quantitatively and qualitatively know and compare the diversity of the aerobic mesophilic heterotrophic bacterial microbiota present in bovine raw milk coming from the farms in the high regions and farms in the low regions of the State of Mérida at two different times of the year, with the purpose of establishing differentiating attributes; based on the hypothesis that the agroecological particularities and characteristics of the high regions and low regions producers of milk in the State of Mérida establish differences in the qualitative and quantitative composition of the aerobic mesophilic heterotrophic bacterial microbiota and that determines changes in the bacterial diversity and microbiological quality of the raw milk and other products derived from milk that can be used as differentiating attributes, obtaining the result that little variability was observed in the results obtained in the different times of the year. Regarding the isolation of the presence of Gram positive coccus this was greater, while the Gram negative bacillus showed up in a lower proportion for the high area, the genus observed were: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus* *Streptococcus*, *Leuconoctoc*, while the Gram positive bacillus were *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* meanwhile for the low region they were *Staphylococcus*, *Enterococcus*; among the gram negative we find *Enterobacter*, *Escherichia* *Proteus*, *Citrobacter* *Serratias*, *Klebsiella*, *Aeromonas*; with these fermenter bacillus predominating over the non fermenters, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.; the area with the greatest biodiversity according to the Shannon index is the low region which represents a big potential regarding the dairy industry, as these microorganisms could give an added or differentiating value to the dairy products elaborated from the milk produced in that region.

Keywords: Microbiota, raw milk, biodiversity, denomination of origin.

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

A mi hija Angelé Mariana.

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso y a la virgen de Chiniquirá por darme fortaleza para continuar.

A la Ilustre Universidad de Los Andes por una vez más abrirme sus puertas para mi formación académica.

Al CDCHTA a través del financiamiento del proyecto: "Caracterización microbiológica de las leches crudas bovinas producidas en fincas del Estado Mérida". Proyecto financiado por el CDCHT-ULA. Código FA-431-B. Y el proyecto PEI-ONCTI No. 2011001283.

A mi Hija Angelé por ser mi vida, mi fuerza e impulsarme a llegar a las metas.

A Juan Carlos por estar en cada momento apoyándome y brindándome seguridad.

A mi familia por su apoyo incondicional, los amo infinitamente.

A mi tutor Prof. Félix Andueza por estar a mi lado cada momento librando esta batalla, gracias a Dios la ULA cuenta con profesores como usted.

A los jurados de mi tesis Prof. Ángela Lugo y Prof. Balmore González, gracias por su colaboración y apoyo.

A Judith Araque, gracias por tu apoyo sin tu ayuda nunca hubiera logrado realizar la parte experimental de la tesis.

A la Prof. Carmen Mercado, por su apoyo incondicional.

A todos aquellos que de una u otra forma me apoyaron para culminar esta meta.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
I. MARCO TEORICO	
I.1.1 Definición	10
I.1.2 Producción de la leche por los animales mamíferos	11
I.1.3 Constituyentes químicos de la leche de vaca	13
I.1.4 Propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca	16
I.2. Microbiología de la leche	16
I.2.1 Origen de los microorganismos en leche	16
I.2.2 Tipos de microorganismos presentes en leche	18
I.2.3 Microbiota heterótrofa aerobia de la leche de origen bovino	21
I.2.3.1 Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila patógena y enfermedades infecciosas transmitidas por la leche.	24
I.2.3.2 Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila alterante de la leche	27
I.2.3.3 Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila beneficiosa para la salud.	29
I.2.3.4 Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila de interés industrial	31
I.3. Control de calidad de la leche cruda	34
I.3.1 Buenas prácticas en la producción lechera	34
I.3.2 Indicadores de calidad sanitaria	35

v

I.3.2.1 Aerobios mesófilos	37
I.3.2.2 Coliformes	37
I.3.2.3 Enterococos	38
I.3.2.3 Mohos y levaduras	38
I.4. Biodiversidad	38
I.4.1 Biodiversidad bacteriana	39
I.4.2 Índice de Biodiversidad	41
I.5.Economía y producción de la leche, denominación de origen y su relación con la microbiota bacteriana	45
I.5.1 Economía de la producción lechera	45
I.5.2 Denominación de Origen	47
I.6. Perspectivas de producción lechera	50
Capítulo II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	
II.1. Antecedentes de la Hipótesis	52
II.2 .Hipótesis	61
II.3. Objetivo General	61
II.4. Objetivo Especifico	62
CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1 Selección de la zona y unidades de muestreo	63
III.1.1 Ubicación geográfica	63
III.1.2 Descripción de las unidades de muestreo	65
III.2 Toma de muestra	66
III.2.1 Selección de los envases para la recolección de las muestras	66
III.2.2 Esterilizado del material	67

III.2.3 Toma de muestra	67
III.2.4. Conservación de las muestras	67
III. 2.5. Transporte de las muestras	68
III. 3. identificación y preparación de las muestras	68
III. 3.1. Identificación de la muestras	68
III.3.2. Preparación de la muestra	68
III.4. Cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila	69
III.6. Discriminación de las colonias bacterianas aisladas en base a la tinción de Gram	71
III.7.1 Prueba de oxidasa	73
III.7.2 Prueba de Catalasa	74
III.7.3. Identificación de colonias bacterianas Gram negativas	74
III.7.3.1 Prueba de Hugh y Leifson (O/F)	75
III.7.3.2. Identificación de colonias bacterianas Gram negativas fermentadoras	76
III.7.3.2.1. Fermentación de la lactosa, glucosa y producción de H ₂ S	77
III.7.3.2.2. Producción de indol	78
III.7.3.2.3. Producción de acetil-metil carbinol	79
III.7.3.2.4. Prueba de rojo metilo	80
III.7.3.2.5. Prueba de utilización de citrato de Simons	81
III.7.3.2.6. Desanimación de la fenilalanina	82
III.7.3.2.7. Prueba de reducción de nitratos	83
III.7.3.2.8. Crecimiento en agar MacConkey	84

III.7.3.3. Identificación de colonias bacterianas Gram negativas no fermentadoras	85
III.7.3.3.1. Prueba de bilis-esculina	85
III.7.3.3.2. Producción de pigmentos	86
III.7.3.3.3. Crecimiento a 42 °C	86
III.7.3.3.4. Producción de ureasa	87
III.7.3.3.5. Desnitrificación de nitratos	87
III.7.4. Identificación de los cocos Gram positivos	87
III.7.4.1. Crecimiento en agar sangre	87
III.7.4.2. Hidrólisis del hipurato	88
III.7.4.3. Prueba de la coagulasa	88
III.7.4.4. Crecimiento en agar manitol salado	89
III.7.4.5. Prueba PYR	90
III.7.4.6. Prueba de crecimiento en presencia de NaCl al 6,5 %	90
III.7.5. Identificación de bacilos Gram positivos	91
III.7.5.1. Pruebas de hidrólisis de la gelatina	91
III.7.6. Sistemas miniaturizados API®	92
III.7.6.1. API® 20E	93
III.7.6.2. API® 20NE	93
III.7.6.3. API® STAPH	94
III.7.6.4. API® CORYNE	94
III.7.6.5. API® 50 CHL	94
III.7.6.6. Lectura e interpretación de los resultados obtenidos en los sistemas API®	95

III.9. análisis estadístico de los valores obtenidos	98
CAPITULO IV. RESULTADOS	99
IV.1. Cuantificación de la microbiota heterótrofa aeróbica mesófila viable	99
IV.2. Identificación de las colonias bacterianas	102
IV.3. Determinación del índice de Biodiversidad bacteriana	112
IV.4. Tratamiento estadístico de los valores obtenidos en la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila presente en las muestras de leche cruda bovina procedentes de las zonas altas y de las zonas bajas del Estado Mérida.	115
IV.5. Características de las especies bacterianas heterótrofa aeróbica mesófila presente en la leche cruda de origen bovino proveniente de fincas de las zonas altas y bajas del Estado Mérida, que pudiesen ser establecidos como atributos diferenciadores.	117
CAPITULO V DISCUSIÓN	121
CAPITULO VI. CONCLUSIÓN	140
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química general de la leche bovina	15
Tabla 2. Propiedades físico-químicas de le leche bovina	17
Tabla 4. Principales bacterias asociadas a enfermedades transmitidas por ingesta de leche cruda	25
Tabla 6. Microorganismos usados como prebióticos	30
Tabla 7. Fermentos Lácteos útiles para la elaboración de queso.	33
Tabla 8. Municipios del Estado Mérida seleccionados para la toma de muestra	64
Tabla 10. Lectura e interpretación de prueba de oxidasa	73
Tabla 11. Lectura e interpretación de prueba de catalasa	74
Tabla 12. Lectura e interpretación de resultados de prueba de Hugh y Leifson(O/F)	76
Tabla 13. Lectura e interpretación de resultados prueba de Indol	79
Tabla 14. Lectura e interpretación prueba de rojo de metilo	81
Tabla 15. Lectura e interpretación prueba de citrato de Simons	82
Tabla 16. Lectura e interpretación de resultados de prueba de desanimación de fenilalanina	83
Tabla 17. Lectura e interpretación prueba de reducción de nitratos	84
Tabla 18. Lectura e interpretación prueba de bilis de esculina	86
Tabla 19. Lectura e interpretación resultados prueba de coagulasa	89
Tabla 20. Interpretación de prueba de hidrólisis de gelatina	92

Tabla 21. Valores promedios de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica viable mesófila presente en leche cruda bovina procedentes de la zona alta del estado Mérida en época de verano e invierno. 100

Tabla 22. Valores promedios de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en leche cruda bovina procedentes de la zona baja del estado Mérida en época de verano e invierno. 101

Tabla. 23. Tipos de bacteria heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona alta y baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano. 103

Tabla 24. Géneros de bacteria heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en épocas de invierno y verano (% de géneros). 105

Tabla 25. Géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de géneros). 107

Tabla 26. Especies de bacterias Gram negativas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies). 109

Tabla 27. Especies de bacterias Gram positivas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies). 110

Tabla 28. Especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas Gram negativas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies). 111

Tabla 29. Especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas Gram positivas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies). 112

Tabla 30. Determinación del Índice de riqueza de especies bacterianas para la leche cruda bovina de las zonas altas y bajas del estado Mérida.	113
Tabla 31. Valores obtenidos en el índice de Shannon para la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila presente en la leche cruda de origen bovino producida en las zonas altas y bajas del Estado Mérida para la diversidad de especies de acuerdo al Índice de Shannon.	114
Tabla 32. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona alta del Estado Mérida en época de verano.	116
Tabla 33. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona alta del Estado Mérida en época de invierno.	116
Tabla 34. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona baja del Estado Mérida en época de verano.	116
Tabla 35. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona baja del Estado Mérida en época de invierno.	117
Tabla 36. Géneros y especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda producida en la zona alta del estado Mérida en época de invierno y verano, y su importancia.	118
Tabla 37. Géneros y especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda producida en la zona baja del estado Mérida en época de invierno y verano, y su importancia.	119

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipo de ordeño manual	13
Figura 2. Tipo de ordeño mecánico	13
Figura 3. Composición química de la leche bovina	15
Figura 4. Buenas prácticas de explotación lechera	36
Figura 5. Mapa del Estado Mérida	64
Figura 6. Esquema del sistema miniaturizado API 20E	96
Figura 7. Lectura interpretación de resultados API20E	96
Figura 8. Lectura interpretación de resultados API20NE	97
Figura 9. Lectura interpretación de resultados APIStaph	97
Figura 10. Lectura interpretación de resultados APICHL	97
Figura. 11. Valores promedios de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en leche cruda bovina procedentes de la zona alta del estado Mérida en época de verano e invierno.	100
Figura 12. Valores promedios de la Microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en leche cruda bovina procedentes de la zona baja del estado Mérida en época de verano e invierno.	101
Figura 13. Tipos de bacteria heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona alta y baja del Estado Mérida. Venezuela.	103
Figura 14. Géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aislados en leche cruda bovinas en época de invierno y verano de la zona alta del Estado Mérida. Venezuela (N° de géneros).	106
Figura 15. Géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela, durante la épocas de invierno y verano (N°de géneros).	108

INDICE DE ANEXO

Anexo 1. Entrevista	171
---------------------------	-----

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Venezuela, por su particularidad de país petrolero, viene presentando durante décadas problemas para la producción y el abastecimiento de rubros fundamentales en la alimentación del venezolano. La brecha que se presenta entre la producción nacional de alimentos y la demanda tradicionalmente se ha cubierto con importaciones cuyo volumen depende, en gran medida, de la disponibilidad de divisas provenientes de la renta petrolera y de la disponibilidad de alimentos en el mercado internacional que en los últimos años muestra fuertes fluctuaciones.

Por ello se hace cada vez más necesario revertir esta situación y que se logre estimular al agro venezolano para que progresivamente se vayan sustituyendo las importaciones de materia primas y alimentos procesados por alimentos producidos en el país.

Impulsar la producción agrícola y pecuaria del país con el fin de asegurar a la población alimentos suficientes en cantidad y calidad requiere de un gran esfuerzo en el diseño de políticas asertivas en lo científico, tecnológico y productivo dirigidas a aumentar la producción mediante la asistencia a los productores, su acceso a la tierra y a financiamiento oportuno, el desarrollo de insumos, maquinarias y equipos para la producción que se adapten a nuestros ecosistemas, la capacitación de los actores que participan en cada uno de los componentes del sistema de alimentos, y de investigación dirigida a resolver problemas específicos de cada una de las cadenas de producción de alimentos, entre ellas la de los lácteos, reconociendo la diversidad de estas cadenas según la región o zona productiva donde se desarrolla.

Si bien es cierto que hay que realizar un gran esfuerzo en producir más alimentos, esto no se puede hacer en detrimento del ambiente y de nuestros ecosistemas, y

de la calidad de los alimentos. De allí que la calidad cobra cada vez más importancia al momento de garantizar la seguridad y soberanía alimentaria del país.

La calidad de un producto es el resultado de su proceso de elaboración a lo largo de toda la cadena productiva y comercial. En el caso de un producto alimenticio esta cadena se resume comúnmente como *desde la granja hasta la mesa* (Ablan, 2000).

Un alimento para considerarse de calidad debería ser inocuo, nutritivo y poseer ciertos atributos que los diferencian de acuerdo a sus características organolépticas, de composición y a la satisfacción que se obtiene del acto de alimentarse ligada a tradiciones socio-culturales, educación y necesidad de convivencia (Oyarzún y Tartanac, 2002).

La inocuidad está indisolublemente ligada a la salud de los consumidores. No abordarla adecuadamente permitiría que al consumidor lleguen productos que pudiesen afectar su salud al presentar contaminación física, química o biológica, pudiendo llegar a convertirse en un problema de salud pública por ello la necesidad de garantizarla a todo lo largo de la cadena productiva, desde la producción primaria hasta la mesa del consumidor con un abordaje sistémico. Los otros atributos de la calidad como son los aportes nutricionales, las características de sabor, olor, apariencia, consistencia y lo que el consumidor está demandado del sistema de alimentos, complementados con la inocuidad conforman la calidad del alimento.

Garantizar el acceso de la población a alimentos sanos, inocuos y nutritivos es un objetivo, contemplado por el Estado venezolano en su carta magna, la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela, que en su artículo 305 establece que el Estado garantizará la seguridad alimentaria de la población y califica la producción de alimentos de interés nacional y fundamental para el desarrollo socioeconómico.

Para ello se ha desarrollado todo un cuerpo de leyes que abordan el tema, entre ellas la Ley Orgánica de Seguridad y Soberanía Agroalimentaria promulgada en julio de 2008 que en su exposición de motivos señala la necesidad de garantizar a los venezolanos, en la construcción de un Estado social de justicia y bienestar, el acceso oportuno a alimentos de calidad, con plena observancia de las características propias de geografía y cultura.

Teniendo la calidad de los alimentos rango constitucional, y siendo elemento fundamental de la seguridad y soberanía alimentaria (SSA), corresponde al Estado, la academia y centros de investigación, así como a los actores que participan directamente en el sistema de alimentos (producción primaria, transformación, distribución, elaboración y consumo), garantizarla de manera activa, solidaria y corresponsable.

La teoría económica indica que la producción se va adecuando o ajustando a lo que los consumidores demandan. En el caso de los alimentos se observa que desde hace algunas décadas los consumidores están cada vez más interesados en conocer no sólo lo qué comen sino también el origen y cómo se ha producido (tipo o modelo de agricultura), almacenado, procesado y comercializado el alimento y el impacto que estas actividades tienen en la salud y en el ambiente.

Esto ha implicado, en muchos casos, el reconocimiento de aquellos alimentos que se han producido y procesado con conocimientos y saberes tradicionales o ancestrales. Oyarzún y Tartanac (2002) señalan que la agricultura y la agroindustria latinoamericana produce y elabora una amplia variedad de productos que aún mantienen autenticidad y originalidad ligadas a las circunstancias sociales, culturales y de disponibilidad local de recursos naturales y que esos productos tienen un rol importante como eslabón integrador entre el sector agrícola y el mercado.

Para garantizar al consumidor que un alimento presente efectivamente uno o más atributos de valor diferenciadores, existen sistemas voluntarios de control que normalmente consisten en que una entidad independiente de la empresa (organismo certificador), verifica y controla que el producto responda a los atributos de valor que ostenta. La forma visible como el producto muestra que ha sido verificado, es mediante la presencia en la etiqueta de un sello, símbolo o logotipo de calidad. Por ello todos los sellos de calidad tienen en común que los productos que los ostentan, deben cumplir en forma comprobada con una serie de condiciones (Oyarzún y Tartanac, 2002).

Los beneficios de un sello de calidad son, entre otros, mejorar la diferenciación del producto en el punto de venta. Un atributo de calidad puede convertirse en una importante herramienta de comercialización, en beneficio de las pequeñas empresas agroindustriales, además de proporcionar confianza al consumidor y otorgarle una garantía de conformidad con estándares locales o internacionales.

El desarrollo de los sistemas de sellos de calidad relacionados con la agricultura y la agroindustria ha configurado tres tipos de atributos de calidad, generalmente aceptados: la *Denominación de Origen Protegida*, la *Especialidad Tradicional Garantizada* y la *Producción Orgánica*. Estos tres tipos de categorías de calidad coinciden con la necesidad de resguardar las tradiciones productivas y culinarias, de proteger la autenticidad de los productos y de privilegiar un tipo de agricultura respetuosa del medio ambiente. (Oyarzún y Tartanac, 2002).

El establecimiento de los parámetros específicos de calidad requiere de investigación y de conocimiento de las condiciones de producción del alimento y del alimento en sí mismo. Un aspecto a ser tomando en cuenta para establecer los parámetros de calidad al momento de trabajar en el diseño de sellos de calidad territorial es el estudio de la biodiversidad microbiana que hoy en día se ha convertido en una de las líneas de investigación más relevantes en el área de la microbiología, no sólo por su papel en el conocimiento de la función, estructura y

evolución de las poblaciones que componen una comunidad microbiana, sino como una fuente importante de investigación en salud, biotecnología y ecología microbiana, pero todavía queda multitud de incógnitas por resolver que hacen de esta disciplina una de las más fascinantes y de mayor expectativa en la actualidad (Acinas,2008).

Se entiende por biodiversidad, la variedad y variabilidad de todas las formas de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte. Dentro de este concepto se incluye la diversidad correspondiente a los microorganismos, la llamada biodiversidad microbiana, la cual se considera como la mayor de todas; de hecho, sólo se ha estudiado una parte de ella (Atlas y Bartha, 2005).

Los microorganismos incluyen un conjunto muy heterogéneo de seres vivos, virus, arqueos, bacterias, bacterias, cianobacterias, levaduras y mohos. Sin embargo, el mayor esfuerzo en la investigación en el campo de la microbiología de los alimentos se ha enfocado en el grupo de las bacterias, en principio por la influencia que ha tenido este grupo en la salud de los seres humanos.

Las bacterias son difíciles de investigar en la naturaleza, debido a su pequeño tamaño y su simplicidad morfológica. Esto ha llevado al uso del cultivo para estudiarlas y analizarlas, resultando que algunas bacterias han sido muy bien estudiadas, pero la gran mayoría no lo han sido aun. Los intentos actuales para describir y entender la diversidad bacteriana tienen como objetivo superar este sesgo para proveer una imagen más precisa de su función en los diferentes ecosistemas donde participan (Rondón y col., 1999).

El estudio de la diversidad bacteriana ha estado limitado por muchos años debido a las dificultades para caracterizar los microorganismos después de su aislamiento en cultivos puros y a la inhabilidad de aislar aquellas bacterias no cultivables. Estas limitaciones metodológicas han restringido el conocimiento sobre el

verdadero papel de la estructura de la comunidad bacteriana en la mayoría de los ecosistemas, entre ellos el de los alimentos, como es el caso de la leche de origen bovino (Madigan, 2004).

La leche es un alimento complejo, las características nutricionales que hacen de la leche un alimento idóneo para la dieta del ser humano, también lo hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de bacterias. Dependiendo de esta diversidad, podremos destinar la leche para su consumo o destinarla a algún proceso tecnológico que resulte en la producción de algún derivado lácteo (Miravet, 2003).

La microbiota bacteriana de la leche cruda se compone de aquellas bacterias que están presentes en la ubre y piel de la vaca, así como de aquellos que se van agregando al producto durante los procesos de manipulación, tratamiento o almacenamiento, debido a la contaminación de los utensilios y el medio ambiente de trabajo, o por transmisión a partir de los trabajadores y ordeñadores de los animales. La variación de la microbiota puede ser asociada a diferentes prácticas de producción (Verdier_Metz y col., 2009).

Existen diversos factores que influyen sobre la diversidad bacteriana presente en la leche, estos factores son de tipo ambiental, fisiológico y genético. Dentro de lo ambiental se reconoce la época del año y las temperaturas ambientales así como la alimentación del animal; en lo fisiológico encontramos, el ciclo de lactancia, enfermedades, específicamente mastitis, y los hábitos de ordeño; en cuanto a los factores genéticos se cita la raza y las características individuales del animal (Rojas y col., 2007).

Estudios sobre la microbiota bacteriana en la leche se han realizado en diferentes partes del mundo, en especial en los países desarrollados, siendo las bacterias heterótrofas las más estudiadas por la gran importancia que tienen, debido entre otras cosas, a que muchos de sus miembros forman parte de la llamada

microbiota bacteriana patógena, así como de la microbiota no patógena, la cual tiene gran importancia desde un punto de vista del beneficio para la salud de los consumidores (probióticos), por su utilización a nivel de la industria láctea (Iniciadores), por su capacidad descomponedora (alterantes) y por estar involucrada en una amplia variedad de procesos fundamentales en la transformación industrial de la leche (Miravet, 2003).

Las bacterias heterótrofas son el grupo de microorganismos más inestable ante los cambios y fluctuaciones de los factores abióticos de un sistema. La diversidad de las comunidades microbiológicas generalmente disminuye en respuesta a perturbaciones o estrés ambiental (Atlas y Barthan, 2005).

La composición estructural y funcional de las comunidades bacterianas es el principal índice del estado de los ecosistemas, y entendiendo la leche como un ecosistema muy particular, nos indica además su grado de contaminación, la alimentación de los rebaños, su estado fisiológico y de salud, así como su procedencia geográfica.

En los últimos años se han hecho esfuerzos para realizar investigaciones, que determinen y caractericen la población bacteriana de la leche cruda de distintos tipos de animales mamíferos, inclusive la de origen humana, que se produce en diversas regiones del planeta. Todo ello con la idea, no solo de prevenir enfermedades transmitidas por la leche, si no de tener una mejor comprensión de los factores biológicos que influyen en las propiedades organolépticas de este producto y de los derivados lácteos que se obtienen de la misma, y de manera de obtener un beneficio económico al poder contar con una denominación de origen que garantice su comercialización en el mundo, evitando falsificaciones (Jayarao y col., 2006; Fricker y col., 2011; Urbina y Álvarez, 2012; Fredricks, 2013; Neviani y col., 2013; Soggiu y col., 2013).

En Venezuela, los estudios sobre la microbiología de la leche cruda bovina, se han enfocado principalmente a la evaluación de los indicadores de calidad sanitaria y a la búsqueda de bacterias patógenas transmitidas por la leche, siendo muy escasos los orientados a conocer la composición y estructura de la microbiota existente (Boscan y col., 1992; Cammarata y Gutiérrez, 1994; Sánchez y col., 1996a; Sánchez y col., 1996b; Cermeño y Peña, 1998; Andueza, 2000; Román y col., 2003; Farias y col., 2005; Palma y col., 2007; Briñez y col., 2008; Guillen y Guerrero, 2009; Peña, 2009; Lugo y col, 2010; Luigi y col, 2013).

La importancia del estudio de la población bacteriana en la leche se puede resumir en tres aspectos fundamentales:

- a) La presencia de algunos tipos de bacterias en la leche pueden producir o aportar cambios favorables en las propiedades físico-químicas y organolépticas de la leche durante la elaboración de diversos productos lácteos, lo cual puede tener beneficios, tanto para la salud del público consumidor, como para la economía del productor.
- b) La leche puede llegar hacer un vehículo para la transmisión de bacterias patógenos causantes de enfermedades en el hombre y en los animales, pudiéndose constituir en un serio problema para la salud pública de una región.
- c) Existen bacterias que puede crear alteraciones en la leche y los subproductos lácteos haciéndolos inadecuados para el consumo o causando pérdidas económicas para los productores (Ogier, 2013).

Dada la importancia que presenta la determinación de la microbiota bacteriana heterótrofa en leche cruda de origen bovino, vista desde la perspectiva de la salud pública, lo tecnológico y económico, y siendo Mérida uno de los polos productores de leche de origen bovino a nivel nacional, se planteó el presente trabajo de investigación de manera de conocer y comparar la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila presente en leche cruda bovina en fincas de las zonas altas y bajas del Estado Mérida.

El estudio de la microbiota bacteriana heterótrofa mesófila presente en la leche cruda bovina de las zonas altas y bajas del estado, permitiría establecer la calidad sanitaria de la leche, la población bacteriana característica de cada zona y su biodiversidad, lo cual es muy importante al momento de querer establecer sellos de calidad territorial para los productos lácteos que se producen en la diversas zonas del estado Mérida, además de permitir la detección de cepas bacterianas con potencial biotecnológico para su utilización industrial no solo en la industria láctea sino en la industria de los alimentos y en la industria farmacéutica, ayudando al desarrollo tecnológico y económico de la zona.

Este aporte al conocimiento logrará abrir puertas que conlleven a evaluar estrategias de producción que vayan más allá de la reducción del peligro para la salud del consumidor, que representa el consumo de leche cruda y sus derivados. Adicionalmente los patrones de diversidad bacteriana podrán ser utilizados como indicadores en el monitoreo de las distintas fases de la producción y la predicción de los cambios que se pueden presentar según las variables ambientales.

El estudio de la microbiota de la leche abre diversas posibilidades para la mejora de la calidad de este producto en atributos como el valor nutricional, permitiendo, además, ofrecer nuevos productos desarrollados a partir del aislamiento y la identificación de bacterias con características favorables y que sean seguros y saludables. Esto se logrará evaluando la biodiversidad existente en las leches crudas, por lo que este trabajo ofrece la posibilidad de generar conocimiento útil a la producción primaria de la industria de alimentos.

CAPITULO I. MARCO TEORICO

I.1. GENERALIDADES SOBRE LA LECHE

I.1.1. Definiciones

La leche es considerada como el producto más noble de los alimentos, dada su composición peculiar rica en proteínas, grasas, carbohidratos, sales minerales y vitaminas; constituye un alimento esencial para el hombre y para todas las especies de mamíferos y las restricciones a su uso son limitadas a casos excepcionales (Spreer, 1991).

Mangariño (2001), define la leche como la secreción láctea de las glándulas mamarias de los mamíferos, la cual es un líquido de composición compleja, de color blanquecino y opaco, con un pH cercano a la neutralidad y de sabor dulce, su propósito natural es la alimentación de la cría en sus primeros meses de vida.

Por su parte Botero y col., (2012), indican que la leche es el líquido segregado por la glándula mamarias, pudiendo variar su composición entre diferentes especies por efectos de factores relacionados con la raza, intervalo de ordeño, cuartos de la ubre, estaciones climáticas, alimentación, enfermedades, temperatura ambiental, edad entre otros.

De acuerdo a la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) la leche cruda bovina sería el producto íntegro, normal y fresco obtenido del ordeño higiénico e interrumpido de vacas sanas (COVENIN 903-93). La cual debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. Se denomina “leche fría” a la leche cruda que inmediatamente después de su ordeño sea refrigerado a una temperatura inferior a 5°C y mantenida a una temperatura no mayor a 10°C durante su almacenamiento y transporte, se

considera leche caliente aquella que no ha sido refrigerada inmediatamente después de su ordeño.

2. La leche cruda debe ser limpia, libre de calostro y de material o sustancias ajenas a su naturaleza tales como: conservadores y colorantes.

3. La leche cruda debe presentar olor, calor, sabor y aspecto característica del producto

4. Microbiológicamente de acuerdo al recuento total en placas determinado según la norma, la leche cruda se clasifica en:

Categoría A Hasta 500.000 ufc/mL

Categoría B Desde 500001 hasta 1500000 ufc/mL

Categoría C Desde 1500001 hasta 5000000 ufc/mL

Sin clasificación más de 5000000 ufc/mL

5. Para efectos de compra y venta de la leche cruda se podría utilizar el tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) según Norma Venezolana COVENIN 939 de acuerdo a lo siguiente :

Clase I Leche fría con más de 4 horas de TRAM

Clase II Leche fría con 2 a 4 horas de TRAM

Clase III Leche caliente con 30 min, a 2 horas de TRAM.

I.1.2. Proceso de producción de leche por los animales mamíferos

La ubre de la vaca está diseñada para producir y ofrecer al ternero recién nacido un fácil acceso a la leche, se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen posterior del animal y no se encuentra soportada o protegida por ninguna estructura ósea. La ubre de la vaca está constituida por cuatro glándulas mamarias o "cuartos", cada cuarto es una unidad funcional en si misma que opera independiente y drena la leche por medio de su propio canal. Generalmente los cuartos posteriores más desarrollados producen más leche (60%), que los cuartos anteriores (40%) (Wattiaux, 2005).

La glándula mamaria de la vaca, está formada por alvéolos o *acini* reunidos en lobulillos que forman la membrana envolvente y están constituidos por racimos secretores, estos se encuentran en comunicación con los canales excretores que constituyen el órgano transportador, los que a su vez desembocan en una cisterna mamaria o *seno galactóforo* que puede contener hasta 400 mL de leche; ésta se comunica a su vez con la cisterna del pezón, formado en su parte final por un conducto papilar cerrado por un esfínter. Tras haber acumulado los materiales precursores de los constituyentes de la leche, las células de los *acini* hinchadas sufren una degeneración, su parte apical se rompe y cae acompañada de agua, en la cavidad de los acinis para formar la leche; este mecanismo de elaboración sin duda original, ha hecho decir que la leche no es una verdadera secreción sino más bien un producto patológico (alimentario para el ternero) procedente de la lisis de un tejido epitelial abundante cuyas células grasas mueren y son eliminadas (López, 2008).

El ternero al mamar utiliza vacío para extraer la leche desde la glándula mamaria y el canal del pezón, la leche sale cuando la presión interna en la ubre es menor a la presión externa de pezón. Existen dos mecanismos básicos para la obtención de leche de la glándula mamaria de un animal bovino, estos son el ordeño manual y mecánico.

Ordeñar manualmente (Figura 1) es extraer la leche contenida en la cisterna del pezón con las manos; el ordeñador presiona el pezón sin lastimarlo para la extracción de la leche (López y col., 2011).

El ordeño mecánico (Figura 2) se realiza con una máquina ordenadora que funciona mediante energía eléctrica o con un motor, la cual simula el amamantamiento del ternero, la máquina de ordeño también utiliza vacío para extraer la leche de la ubre, un equipo de ordeño bien diseñado y bien manejado debe lograr el ritmo de pulsaciones adecuadas para obtener el ordeño (López y col., 2011).



Fuente: www.es.dremstime.com/fotosderchivo/ordeñomanual

Figura No. 1. Tipo de ordeño manual



Fuente: www.freepik.esfoto-ordeño-mecánico_3444974.

Figura No. 2. Tipo de ordeño mecánico

I.1.3. Constituyentes químicos de la leche de vaca

La leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como alimento, ya que, constituye una fuente nutritiva, no superada por ninguna otra conocida por el ser humano. La confirmación de esta imagen nutritiva está en el uso extensivo que tiene la leche y sus derivados, como parte de la dieta diaria en los países desarrollados, a consecuencia de esto, estas sociedades gozan casi de una completa carencia de enfermedades nutricionales

en la población infantil y adultos jóvenes. En contraste, una elevada proporción de los bebés y niños en los países en desarrollo, donde el suministro de leche es mínimo o nulo, sufren deficiencias nutricionales (Jay, 1994).

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera e incluye sustancias definidas: agua, grasas, proteínas, lactosa, vitaminas, minerales, a la cual se les denominan extracto seco o sólidos totales (Tabla 1 y figura 3). Está compuesta principalmente por agua, materia grasa, proteínas, carbohidratos (lactosa, calcio, minerales y sal), contiene 87% de agua por lo que es una mezcla muy compleja y heterogénea en la cual los minerales y los carbohidratos se encuentran disueltos, las proteínas están en forma de suspensión y las grasas como pequeñas partículas insolubles en agua (Agudelo y col., 2005; Kirk y col., 2005).

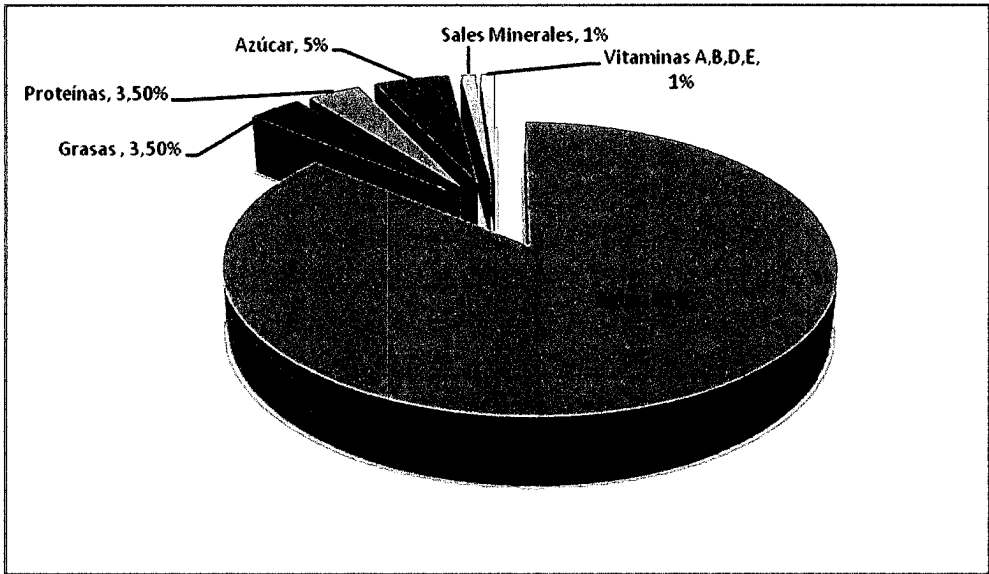
Los numerosos componentes de la leche le atribuyen el alto valor nutricional, las proteínas son de alto valor biológico, su grasa muy digestible rica en calcio, y fósforo, además aporta notables cantidades de vitaminas; la proteína láctea tiene un gran interés para la industria procesadora de queso, además de contener un gran número de aminoácidos esenciales para el hombre (Brinez y col., 2008).

La leche se considera un alimento completo ya que es una buena fuente de proteínas, grasas y minerales principales, datos demuestran que el contenido de los componentes varían considerablemente en su composición afectado por factores genéticos, físicos y ambientales; en términos de composición la leche es el producto alimenticio mas variante contiene más de veinte elementos diferentes, entre estos trazas de minerales como cobre, zinc, manganeso y hierro (Enb y col., 2009).

Tabla 1. Composición química general de la leche bovina

COMPOSICIÓN	SUSTANCIA	PORCENTAJE (%)
Mayoritarios	Agua	86,9
	Materia Grasa	3,9
	Proteínas y sustancias nitrogenada no proteicas	3,2
	Carbohidratos	5,1
	Sales	0,9
Minoritarios	Enzimas	
	Vitaminas	
	Pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina)	
	Células diversas (Células epiteliales, leucocitos, bacterias, levaduras, mohos.	
	Otros elementos (Dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno y otros gases.	
	Sustancias extrañas	

Fuente: Amiot, 1991



Fuente: Kairuz, 2002

Figura 3. Composición química de la leche bovina.

I.1.4 Propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca

Son numerosos los estudios sobre las propiedades físico-químicas de la leche, y los mismos determinan que existe una variación cuantitativa en ellas y en la composición química debido a diferentes factores como los genéticos (razas, especies, individuos), fisiológicos (etapa de lactancia, número de partos, gestación), ambientales (alimentación, clima), entre otros (Páez y col., 2002).

En la tabla 2 se presentan las principales propiedades físico-químicas de la leche bovina cruda y sus características.

I. MICROBIOLOGIA DE LA LECHE

I.2.1. Origen de los microorganismos en la leche

Como es bien sabido, los microorganismos son los seres más abundantes que existen en la tierra; son organismos ancestrales que han colonizado exitosamente cada nicho ecológico posible. Los microorganismos se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde los polos, en ambientes bajo el punto de congelación y muy secos, hasta los trópicos con temperatura alta y elevadas precipitaciones. Su presencia y actividad es esencial para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas (Olembo, 1991).

La microbiología está estrechamente relacionada con todos los sectores de la industria lechera. Los principios microbiológicos son la base de las técnicas de producción higiénica de la leche, dirigen muchos de los tratamientos para su transformación industrial y son el fundamento de los métodos de conservación de los productos lácteos. La calidad de la leche y sus productos lácteos dependen en gran parte de su microbiología y en su valoración oficial se incluyen siempre normas microbiológicas (Amiot, 1991).

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de la leche bovina

PROPIEDAD FÍSICO-QUÍMICA	CARACTERÍSTICA
Sabor	Normalmente un sabor suave, agradable y ligeramente dulce.
Color	Se considera indicativo de su riqueza en grasa, la reflexión de la luz sobre las partículas opacas en suspensión (micelas de caseína, glóbulos grasos, fosfatos y citratos de calcio) da a la leche su color blanco.
Acidez	La valoración de la acidez es un determinante analítico frecuente en tecnología lechera, el pH de la leche normalmente varía entre 6,2 y 6,8, la acidez de valoración global de la leche se expresa en % de ácido láctico, puede variar entre 0,10 a 0,30 %.
Punto de congelación	Es una de las constantes físicas más estables de la leche, ya que la presión osmótica de la leche se mantiene en equilibrio, el punto de congelación puede oscilar entre -0,52 y -0,56 °C.
Punto de ebullición	A la presión atmosférica normal, el punto de ebullición del agua es de 100°C y el de la leche a 100,5°C.
Densidad de la leche	La densidad media de la leche a 15°C/15°C es de 1,032 (1,028-1,035) es el resultado de la densidad intrínseca de cada uno de sus componentes.
Calor específico.	La leche tiene un valor de calor específico variable según su contenido de grasa, como término medio es de 0,93.
Tensión superficial	La tensión superficial de la leche desnatada a 0°C 55-60 dinas/cm; la de la leche entera es de 53 dinas/cm, esta diferencia se debe a que la grasa ejerce un efecto depresivo sobre la tensión superficial.
Viscosidad	Considerando que el agua a 20°C tiene una viscosidad de 1 centipoise, la viscosidad de la leche entera a la misma temperatura es de 2,1, parece que el grado de hidratación de las proteínas juega un importante papel en la viscosidad.
Conductividad eléctrica	En la leche normal, la conductividad eléctrica es del orden de 0,005 ohm ⁻¹ a 25°C.
Índice de refracción	El índice de refracción de la leche a 20°C es por término medio de 1,34209.
Presión osmótica	Es una constante de la leche que es función del número de partículas en solución o en suspensión.
Potencial oxido-reductor	El potencial medio de la leche es de ± 0,25 volt.

Fuente: Amiot, 1991

Se ha señalado que la leche presente en las células de la ubre de animales sanos es estéril (Toalle, 1980), pero que posteriormente al salir de este órgano, comienza a ser colonizada por diversos tipos de microorganismos provenientes de una gran variedad de fuentes, que incluyen la parte externa de la ubre, superficie de los pezones, manos de los ordeñadores, equipos de ordeño mecánico, utensilios empleados, agua utilizada, alimentos y tipo de alimentación suministrada, equipos de almacenamiento, así como del medio ambiente donde se encuentra (Coorevits y col., 2008; Lejeune y Rajala-Schultz, 2009; Vacheyrou y col., 2011).

Con respecto a los factores medioambientales se ha observado que los microorganismos presentes en la leche cruda bovina, dependen y difieren, de acuerdo al medio ambiente donde se ha realizado la alimentación del animal, es decir si la alimentación ha ocurrido a campo abierto o en sitios cerrados (Callan y col., 2007.).

En la tabla 3 se presenta un resumen de las principales fuentes y los tipos de microorganismos asociados a la misma, presentes en la leche cruda bovina.

1.2.2. Tipos de microorganismos presentes en la leche

La leche cruda de origen bovino posee el potencial para soportar y contener una diversa población de microorganismos, la cual en base a diversos estudios realizados, se ha observado está dominada por la presencia de una microbiota bacteriana abundante y biodiversa (Raats y col., 2011; Quigley y col., 2011; Vacheyrou y col., 2011).

Tabla 3. Procedencia de las bacterias asociadas a leche cruda bovina.

PROCEDENCIA	MICROORGANISMOS ASOCIADOS
Procedente del animal:	
Vaca sana	<i>Micrococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Corynebacterium</i> termolábiles.
Vaca enferma	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> y <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> , Levaduras, Mohos y Virus.
Procedencia del medio	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , Levaduras, Mohos y Virus.
Estiércol	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , Levaduras, Mohos.
Paja y ensilado	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i> . Levaduras y Mohos.
El ordeñador	<i>Corynebacterium dipteriae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enterica</i> .
El equipo lechero	<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , Levaduras, Mohos.

Fuente: Amiot, 1991

Dentro de la microbiota bacteriana observada en la leche cruda de origen bovino destacan los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Brucella*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Weissella*, entre otros (Verdier Metz y col., 2009; Raats y col., 2011; Quigley y col., 2011;

Vacheyrou y col., 2011; Mallet y col., 2012; Masoud y col., 2012; Quigley y col., 2013).

Las levaduras y los mohos son también una parte importante de la población microbiana presente en la leche cruda bovina. La composición de la microbiota fúngica de la leche cruda puede ser influenciada principalmente por el estado fisiológico de la vaca y por el tipo de alimentación que se le suministre al animal (Vacheyrou y col., 2011)

Mientras que un relativo bajo número de especies de levaduras están presentes en la leche cruda, ellas son persistentes y pueden alcanzar valores altos en el rango de 10^2 a 10^4 unidades formadoras de colonias por mililitro de leche (UFC/mL), lo cual generalmente afecta la calidad organoléptica del producto (Lagneau y col., 1996).

Entre las principales especies de levaduras que se han encontrado en la leche cruda de origen bovino tenemos: *Candida inconspicua*, *Candida parapsilosis*, *Candida sake*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus victoriae*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum catenulate*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon lactis* y *Yarrowia lipolytica* (Delavenne y col., 2011).

Los mohos están también presentes en la leche cruda bovina pero en menor cantidad y diversidad que las levaduras (Arora y col., 1991).

Los mohos tienen la habilidad de añadir sabores y aromas, así como modificar la estructura de la leche y de sus derivados, ello como consecuencia de su reconocida actividad proteolítica y lipolítica (Arora y col., 1991; Delavenne y col., 2011).

Se han observado en muestras de leche cruda diversas especies de mohos, entre los géneros más resaltantes se encuentran: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* y *Torrubiella* (Delavenne y col., 2011; Lavoie y col., 2012).

Los virus también se encuentran representados dentro del grupo de microorganismos presentes en la leche cruda de origen bovino. Dentro de este gran grupo de microorganismos resaltan los virus que atacan o conviven con las bacterias, los bacteriófagos o fagos (Marco y col., 2012).

Los bacteriófagos pueden llegar a la leche procedentes del ambiente, del personal, equipos y superficies de trabajo (Verreault y col., 2011). Estos microorganismos que atacan a las bacterias, entre ellas a las de mayor utilización en la industria láctea como lo son los *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, pueden sobrevivir a baja temperaturas o resistir diferentes tratamientos fisicoquímicos, entre ellos la pasteurización, pudiendo afectar negativamente la calidad, inocuidad y valor de la leche y de sus productos derivados (Madera y col., 2004; Verreault y col., 2011; Marco y col., 2012).

1.2.3. Microbiota bacteriana heterótrofa aerobia de la leche de origen bovino

La historia evolutiva y la fisiología de los microorganismos permiten comprender las condiciones que han dirigido el desarrollo de la amplia diversidad microbiana que existe en nuestros días. Para las formas heterotróficas, que fueron capaces de adaptarse a las condiciones de oxidación de la atmósfera, se abrieron nuevos y mucho más eficientes modos de utilización de sustratos, lo que dio lugar a una amplia diversidad fisiológica y metabólica (Madigan y col., 2004).

Dentro de esta diversidad fisiológica y metabólica, las bacterias heterótrofas son las más estudiadas por la gran importancia que tienen debido a su actividad descomponedora y también porque están involucradas en una amplia variedad de

procesos fundamentales en la estabilidad de los diferentes tipos de ecosistema, entre ellos el de los alimentos (Madigan y col., 2004).

Siendo las bacterias heterótrofas u organótrofas aquellas que requieren de compuestos orgánicos como fuentes de carbono para su crecimiento, esto significa que el equipo metabólico es diferente a las bacterias autótrofas que requieren de agua, sales inorgánicas y CO₂ para su metabolismo; generalmente las bacterias heterótrofas se encuentran conviviendo con organismos superiores de donde obtienen los compuestos orgánicos, o bien, se encuentran en lugares o sustratos donde existen materiales orgánicos (Romero, 2007).

La microbiota bacteriana heterótrofa aerobia incluye una gran gama de bacterias que además de utilizar para su crecimiento sustancias orgánicas, lo hacen a través de un metabolismo aerobio o anaeróbico facultativo, pudiéndose diferenciarse en base a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias, en microbiota bacteriana heterótrofa aerobia psicrófila (12-15 °C), mesófila (30-40 °C) y termófila (55-75 °C) (Robinson, 1997).

Dentro de la industria de la leche y de los productos lácteos, tanto la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia psicrófila, como la mesófila y la termófila, tienen una gran importancia, puesto que todas ellas ocupan un nicho fisiológico, bioquímico y biológico, en los distintos procesos que tienen lugar en la leche y sus derivados, de manera de garantizar el desarrollo de las cualidades y propiedades organolépticas que define el producto en particular (Ercolini y col., 2009; De Jonghe y col., 2011; Quigley y col., 2011; Vacheyrou y col., 2011).

La leche cruda generalmente se almacena bajo refrigeración, lo cual reduce el crecimiento de la mayoría de bacterias, excepto de las psicrófilas y psicótrofas, siendo estas últimas bacterias mesófilas que pueden resistir bajas temperaturas y proliferar bajo estas condiciones (De Jonghe y col., 2011).

Las bacterias heterótrofas aerobias psicrófilas y psicótrofas presentes en la leche cruda, por lo general causan una alteración negativa de las propiedades organolépticas de la leche y de los derivados lácteos, como consecuencia de la producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas (Morchand y col., 2008; De Jonghe y col., 2011).

Entre las bacterias psicrófilas encontradas en la leche cruda de origen bovino destacan especies de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Lafarge y col., 2004; Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007; Hantsis-Zacharov y Halpern, 2008; Ercolini y col., 2009; Raas y col., 2011; Mallet y col., 2012).

Por otra parte, la microbiota heterótrofa termófila está constituida por aquellas especies bacterianas que son capaces de crecer a altas temperaturas o resisten las mismas, como es el caso de las termótrofas, que aunque presentan una temperatura óptima de crecimiento de mesófila, pueden soportar altas temperaturas (Caballero, 2008).

La mayoría de las especies bacterianas termófila o termótrofas se han asociado con el deterioro de la leche luego de su procesamiento térmico, así como con el desarrollo de aromas y sabores en los derivados lácteos (Smit y col., 2005; Fernández y col., 2013)

Entre el grupo de las bacterias termófila y termótrofas presentes en leche cruda encontramos especies de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Fernández y col., 2013; Neviani y col., 2013).

La microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila, considerado el grupo bacteriano más numeroso y predominante en la leche cruda, está conformada por una amplia variedad de géneros y especies de bacterias que incluyen tanto especies que causan alteraciones en la leche y los productos lácteos, la mayoría de bacterias que causan enfermedad en los humanos y su transmisión es a través del consumo de leche o productos lácteos contaminados, así como grupos bacterianos que tienen un usos industrial o medicinal (Ercolini y col., 2009)

1.2.3.1 Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila patógena y enfermedades infecciosas transmitidas por la leche

Muchas enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) están relacionadas a la ingesta de leches crudas contaminadas con bacterias heterótrofas mesófilas o sus productos metabólicos tóxicos. Las infecciones alimentarias conllevan la ingestión del patógeno, seguido del crecimiento del mismo por invasión de los tejidos, liberación de toxinas o ambos. De igual forma, la intoxicación alimentaria implica el consumo de toxinas previamente excretadas por la bacteria, en el producto alimenticio (Prescott y col., 1999).

Las enfermedades transmitidas por la leche cruda contaminada, la mayoría de las cuales son de origen bacteriano, constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. Los microorganismos indicadores que generalmente se cuantifican para determinar la calidad sanitaria de la leche son bacterias heterótrofas mesófilas e incluyen los grupos de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y enterococos, así como especies bacterianas tales como *Aeromonas hydrophilas*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* (Fuentes y col., 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha desarrollado una lista de patógenos que transmitidos por la leche pueden originar enfermedades en el hombre, entre estos se destacan: *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Coxiella*

burnetti, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, entre otras (Mangariños, 2000).

En la tabla 4 y 5 se presentan algunos microorganismos asociados a enfermedades transmitidas por la ingesta de leche cruda:

Tabla 4. Principales bacterias asociadas a enfermedades transmitidas por la ingesta de leche cruda.

MICROORGANISMO	TRASTORNO QUE OCASIONA	POSIBLE PRODUCTO PORTADOR
<i>Bacillus cereus</i>	Diarrea y vomito	Productos lácteos y carne
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarrea	Leche cruda, carne de aves, cerdo y res.
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea, colitis, hemorragias, síndrome hemolítico-urémico.	Leche cruda, carnes y derivados.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	Leche, queso, carnes, mariscos, ensaladas.
<i>Salmonella enterica</i>	Gastroenteritis	Leche cruda, carne de res, huevos.
<i>Shigella flexneri</i>	Disenteria bacilar, fiebre, calambres.	Leche cruda, aves, vegetales crudos.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicaciones	Leche y derivados
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniosis	Leche y agua.

Fuente: Rojas y col., 2006

La lucha contra los microorganismos patógenos, causantes de enfermedades transmitidas por la leche cruda, requiere de procedimientos adecuados de inspección sanitaria, lo que lleva al desarrollo de métodos cada vez mas rápidos y efectivos para la detección e identificación de bacterias nocivas para el ser humano; siendo estas una amenaza a la salud pública y son una causa importante de morbilidad en los países en desarrollo, aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales agudos tales como diarreas y vómitos, en algunas ocasiones es mucho más severa y peligrosa para la vida, especialmente en niños y ancianos (Roja y col., 2006).

Tabla 5. Características más resaltantes y principales afecciones producidas por bacterias patógenas transmitidas por consumo de leche cruda.

Bacteria patógena	Característica
<i>Shigella flexneri</i>	La Shigelosis (Disentería bacilar) es una infección alimentaria que puede ser transmitida por la leche, los brotes por lo general aparecen en instituciones y colectividades pequeñas, estas bacterias proceden de las manos de los operarios, agua o moscas presentes.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Los brotes de difteria se presentaron comúnmente en colectividades que consumen leche sin pasteurizar, este microorganismo suele encontrarse en la nasofaringe de los enfermos o portadores sanos y en heridas en los pezones de animal.
<i>Salmonella enterica</i>	Provoca la salmonelosis, la leche puede desempeñar un papel importante en la transmisión de esta enfermedad, ya que representa un buen medio de cultivo constituyendo un excelente vehículo en presencia de la combinación tiempo y temperatura, alcanzan con rapidez el número indicado para provocar una infección.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	El <i>Streptococcus</i> del grupo A puede provocar en el hombre diversas enfermedades agudas: anginas, otitis, escarlatina, erisipela, entre otras, la leche cruda puede llegar a ser un vehículo ideal de estos microorganismos para afectar al hombre; <i>Str. agalactiae</i> son causa corriente de mastitis pero su acción patógena en el hombre es poco causada, algunos <i>Streptococcus</i> no patógenos se utilizan en la elaboración de derivados lácteos
<i>Clostridium botulinum</i>	Causa el botulismo, raro que en la leche cruda y productos lácteos intervengan en la transmisión del botulismo; sin embargo este microorganismo tiene esporas resistentes que se encuentra en suelos y frecuentemente contamina la leche.
<i>Staphylococcus aureus</i>	El peligro mayor que tiene la contaminación de la leche con <i>Staphylococcus</i> reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre enfermedades.
<i>Escherichia coli</i>	La <i>Escherichia coli</i> de los grupos O, son causantes de la aparición de gastroenteritis agudas en niños, diarreas con sangrado y dolor abdominal, genera una potente toxina que puede causar síndrome urémico hemolítico.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacteria altamente patógena en leche cruda, causa en el hombre diarreas crónicas y septicemia.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Provocando la Listeriosis con síntomas leves intestinales similares a influenza, hasta el aborto en mujeres embarazadas y muerte en recién nacidos.

Fuente: Mangariño, 2000.

La leche cruda y los productos lácteos contaminados representan un importante vehículo de ETA en el mundo, de hecho la contaminación post-pasteurizada, la manipulación durante el proceso de fabricación, el equipamiento y el abuso de las condiciones de temperatura durante el transporte y almacenamiento puede resultar en altos niveles de microorganismos patógenos (Luigi y col., 2013).

La temperatura a la cual se encuentre la leche después del ordeño favorece la rápida multiplicación bacteriana, la mayor proporción de esta microbiota bacteriana son microorganismos mesófilos, es por ello fundamental la refrigeración inmediata de la leche después del ordeño para asegurar la calidad sanitaria (Pinzón, 2006).

1.2.3.2. Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila alterante de la leche

Se considera un alimento deteriorado microbiológicamente a aquel que sufre daños químicos o físicos por causa del crecimiento de agentes microbianos, de forma que es inaceptable para el consumo humano. Este tipo de actividad microbiana causa pérdidas importantes para el sector de la industria de los alimentos (Jay, 1994).

Normalmente los alimentos crudos contienen una gran variedad de bacterias, destacando entre ellas las bacterias heterótrofas mesófilas, que por su capacidad reproductiva pueden desarrollarse y crecer de forma excesiva, causando un biodeterioro del producto, a través de cambios en la composición química, color, olor y textura del mismo (Ray y Bhunia, 2010).

La descomposición microbiana de la leche cruda de origen bovino, potencialmente puede ser el resultado de la transformación por parte de las bacterias heterótrofas, de sustancias como la lactosa, proteínas y grasas presentes en la leche (Jay, 1994).

A temperatura entre 10 y 36°C en condiciones normales, la fermentación ácida es la que tiene más posibilidades de producirse, la molécula de lactosa se convierte casi exclusivamente en ácido láctico, por la vía homo fermentativa, la refrigeración a 4°C impide esta fermentación, en este tipo de alteración pueden intervenir especies de bacterias heterótrofas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, Enterobacterias, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Amiot, 1991).

Otra de las alteraciones posibles en la leche cruda por acción microbiana es la proteólisis, la cual puede tener dos orígenes: el primero mediante los microorganismos que pueden secretar proteasas exógenas resistentes al calor y muchas de ellas se desarrollan durante el almacenamiento en frío, el segundo está relacionado con el deterioro de la ubre enferma (Le Roux, 1995).

La proteólisis de la leche cruda son producidas por bacterias psicótrofas, en especial de género *Pseudomonas*, la proteólisis puede causar en la leche dos problemas: un decrecimiento en el rendimiento del queso y deterioro en la composición y calidad del mismo, sabor amargo en los productos lácteos (Guerrero y col, 2003).

La leche también puede producir una proteólisis neutra o alcalina, generalmente los microorganismos que la producen no fermentan la lactosa, las bacterias proteolíticas pertenecen a las especies *Alcaligenes*, *Pseudomonas*; *Proteus* y *Bacillus*. Algunos microorganismos termorresistente de los géneros *Bacillus* o *Clostridium* pueden producir proteólisis de los productos pasteurizados e incluso el *Bacillus cereus* sintetiza enzimas que tienen la acción similar a la del cuajo y puede coagular la leche sin producir acidificación, fenómeno conocido como coagulación dulce (Amiot, 1991).

Otra consideración a tomar en cuenta en el deterioro microbiano de la leche, es la lipólisis, definida como la ruptura de los triglicéridos de las grasas lácteas de los glóbulos grasos, por acción de la lipasa, responsable de esta degradación a

ácidos grasos libres, la cantidad de ácidos grasos libres totales es indicador de lipólisis y define sabores en la leche que pueden ser aceptables, desagradables o rechazados por el consumidor. Este tipo de alteraciones puede ser causada por especies de bacterias heterótrofas como *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Chávez y col, 2007).

También algunos tipos de bacterias heterótrofas pueden causar deterioro de la leche cruda, sobre todo cuando esta se encuentra almacenada bajo refrigeración, produciendo compuestos polisacáridos espesantes que cambian la viscosidad. Tal es el caso de las especies bacterianas de *Xantomonas*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Alais, 2003).

1.2.3.3. Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila beneficiosa para la salud

Los alimentos funcionales producen efectos beneficiosos a la salud superiores a los alimentos tradicionales, dentro de la gama de alimentos funcionales se encuentran los probióticos, los cuales son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorece el desarrollo de la microbiota bacteriana en el intestino, estimulando las funciones protectoras del sistema digestivo, también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolácticos (De las cagigas y col., 2002).

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que administrados en cantidades suficientes provocan efectos fisiológicos beneficiosos sobre el huésped, se le atribuye ayuda en la digestión de la lactosa, prevención de enfermedades intestinales, acción inmunomoduladora y prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares (Alvarado y col., 2009).

Para seleccionar las diferentes cepas de bacterias susceptibles de ser caracterizadas como probióticos se deben evaluar ciertos criterios que permitan asegurar las características funcionales una vez en el interior del organismo.

Estos criterios deben basarse, como es lógico, en su capacidad de llegar vivas al intestino por ello el primer criterio a evaluar es la resistencia a los ácidos estomacales y las sales biliares, además de la capacidad de adhesión al intestino, viabilidad durante el proceso y el almacenamiento en refrigeración, estos criterios garantizan la funcionabilidad del microorganismo con características probióticas (González y col., 2006).

En pocos años los probióticos han evolucionado desde especies pioneras como *Lactobacillus acidophilus*, hasta la gran variedad que existe actualmente con varios tipos de *Lactobacillus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, e incluso hongos y levaduras como *Aspergillus oryzea* y *Candida pintolopesli*, muy interesante parece también la idea de añadir al probiótico cepas no patógenas de *Escherichia coli* que compitan con su homólogos patógenos (Amores y col., 2004).

Tabla 6. Microorganismos usados como probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	Otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. coagulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetyllactis</i>				<i>Leuconostoc spp.</i>
<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>B. breve</i>					
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>					
<i>L. kéfir</i>	<i>B. adolescentis</i>					
<i>L. brevis</i>						
<i>L. reuteri</i>						
<i>L. helveticus</i>						
<i>L. plantarum</i>						
<i>L. johnsonii</i>						
<i>L. salivarius</i>						

Fuente: Alvarez y col., 2001

1.2.3.4. Microbiota bacteriana heterótrofa mesófila de interés industrial

Los microorganismos han sido utilizados por el hombre para obtener diversos productos desde la antigüedad, aun sin conocer el fundamento científico en el que se basan (Prescott y Dunn, 1962).

La industria química y farmacéutica utiliza los microorganismos como herramienta para la producción de compuestos de interés de diferente naturaleza. La aplicación más extendida en este ámbito es la producción de antibióticos. Además tienen importancia considerable en la producción de vitaminas, aminoácido, en la producción de vacunas y en la obtención de ciertos compuestos orgánicos como el etanol, la acetona y el vinagre (Ramírez y col., 2004).

Las enzimas o microorganismos son empleados como biocatalizadores en procesos industriales que requieren de condiciones fuertes. Estos biocatalizadores, llamado también extremoenzimas producida por microorganismos, son proteínas que funcionan en condiciones extremas. Debido a su extrema estabilidad, las extremoenzimas ofrecen nuevas oportunidades de biocatálisis y biotransformación. Ejemplos de extremoenzimas son: celulasas, amilasas, proteasas, las pectinasas, keratinases, lipasas, las esterases, catalasa, peroxidasa y las fitasas (Gómez y Steiner, 2004; Núñez y col., 2004).

Una aplicación biotecnológica de bacterias incluye también la construcción genética de súper cepas de microorganismos que realicen tareas particulares en el medio ambiente. Por ejemplo: las bacterias que son genéticamente diseñadas para degradar productos petrolíferos se utilizan en actividades de limpieza en derrames de petróleo (Todar, 2012).

Los cultivos de las bacterias heterótrofas de las especies de *Lactobacillus* y *Lactococcus lactis* se han utilizado para conferir aromas y para la producción de

ácido, el *Lactococcus lactis* subespecie de *diacetylactis* convierte el citrato de la leche a diáctilo, lo que proporciona un especial sabor mantecoso al producto acabado; el yogurt es producido por un cultivo iniciador especial en el que están dos bacterias principales en una proporción de 1:1, el *Streptococcus thermophilus* produce ácido y *Lactobacillus bulgaricus*, le da los componentes del aroma; la leche fermentada puede tener efecto beneficioso modificando la microbiota en la porción inferior del intestino, mejorando la salud en general (Prescott y col, 1999).

Otro grupo de interés es el de las bifidobacterias, el género *Bifidobacterium* contiene bacilos irregulares Gram positivos no esporulados, son inmóviles, anaeróbicas y fermentan la lactosa y otros azúcares a ácido acético y a ácido láctico, ayudan a mantener el equilibrio intestinal al tiempo de mejorar la tolerancia a la lactosa (Prescott y col, 1999).

Las bacterias ácido lácticas han sido importantes en los alimentos por siglos por su considerable contribución al valor de los productos. Debido a varias de sus propiedades metabólicas, las bacterias ácido lácticas desempeñan un papel relevante en la industria láctea, contribuyen significativamente al sabor, olor, textura, características sensoriales, propiedades terapéuticas y valor nutricional de los productos alimenticios, este grupo está compuesto por géneros incluyendo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Algunos de los metabolitos producidos por estas bacterias son ácidos orgánicos, sustancias preservantes, polisacáridos, vitaminas, endulzantes, olores y sabores entre otros (Parra, 2010).

La principal función de las bacterias lácticas (fermentos) en el queso, es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, el ácido láctico promueve la formación y desuerado de la cuajada, evitando el crecimiento de microorganismos no deseados debido a la disminución del pH, a demás de dar lugar a sustancias responsables del aroma, contribuyendo a la maduración mediante la proteólisis y

lipólisis (González, 2002), a continuación se presentan algunos fermentos lácteos utilizados en la industria quesera:

Tabla 7. Fermentos lácteos útiles para la elaboración de quesos.

Fermentos	Tipos de quesos
Fermentos mesófilos	
<i>Streptococcus cremoris</i>	Quesos duros (Cheddar)/ quesos blandos (Cottage)
<i>Streptococcus lactis</i>	Queso azul (Roquefort)
<i>Streptococcus lactis subesp. diacetylactis</i>	Quesos blancos (Camembert)
<i>Leuconostoc cremoris</i>	Quesos blandos no madurados.
Fermentos termófilos	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Quesos muy duros (parmesanos)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Quesos de pasta cocida (Emmental)
<i>Lactobacillus lactis</i>	

Fuente: González, 2002.

El desarrollo de técnicas de fermentación, la utilización y diseño de nuevos productos, conjuntamente con técnicas de ingeniería genética, han permitido la obtención de productos de un gran interés económico para la industria alimentaria, química y farmacéutica; un aspecto importante de la biotecnología está relacionado con obtener alimentos seguros, evitando las intoxicaciones producidas por ingestión de alimentos contaminados por agentes patógenos, como microorganismos o toxinas, la percepción pública respecto de estos productos biotecnológicos está asociada a los beneficios que estos reportan a los productores y al consumidor.

I.3. CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE CRUDA DE ORIGEN BOVINO

I.3.1. Buenas prácticas de producción lechera

Las exigencias que los consumidores imponen a la producción agropecuaria y que consecuentemente condiciona su éxito, son más diversas y complejas actualmente. De una etapa inicial donde las exigencias se centraban en la inocuidad alimentaria, se ha transmitido a requerimientos que se relacionan además, con la protección de los trabajadores, el resguardo de medio ambiente y en el caso de la producción pecuaria, con el bienestar animal. Esto ha llevado a los productores a establecer medidas que aseguren la aplicación de buenas prácticas en la producción pecuaria y agrícola

La producción de leche se realiza bajo una gran diversidad de sistemas productivos que se encuentran determinados, entre otros factores, por la variabilidad de alternativas tecnológicas que se utilizan, los ambientes en que se desarrollan, los objetivos económicos que buscan los productores, entre otros. Por las mismas razones la calidad higiénica y nutricional de la leche obtenida es muy variable (Herrera, 2012).

Para los productores de leche las buenas prácticas agrícolas consisten en implantar en sus explotaciones unas actividades labores racionales, colectivamente llamadas Buenas Prácticas en Explotación Lechera, estas serie de acciones deben garantizar que la leche y los productos lácteos producidos sean saludables y adecuados al uso para el que están previstos, y también que la explotación lechera sea viable de cara al futuro, desde la perspectiva económica, social y medioambiental. Los ganaderos están implicados en la producción de alimentos destinados al consumo humano, por lo que deben estar seguros de la calidad y salubridad de la leche que producen, las buenas prácticas en la explotación son la base de una producción de leche que cumpla con las

expectativas de calidad más altas de la industria alimentaria y de los consumidores.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) aseguran que diferentes estudios en países muestran que, implementar buenas prácticas de manufactura en la cadena productiva, minimiza los riesgos de contaminación de la leche por agentes químicos, físicos y biológicos, así como minimizan el impacto ambiental que genera la producción de leche, maximizando el bienestar laboral de los trabajadores y las condiciones de bienestar de los bovinos que son empleados para la producción lechera (Herrera, 2012).

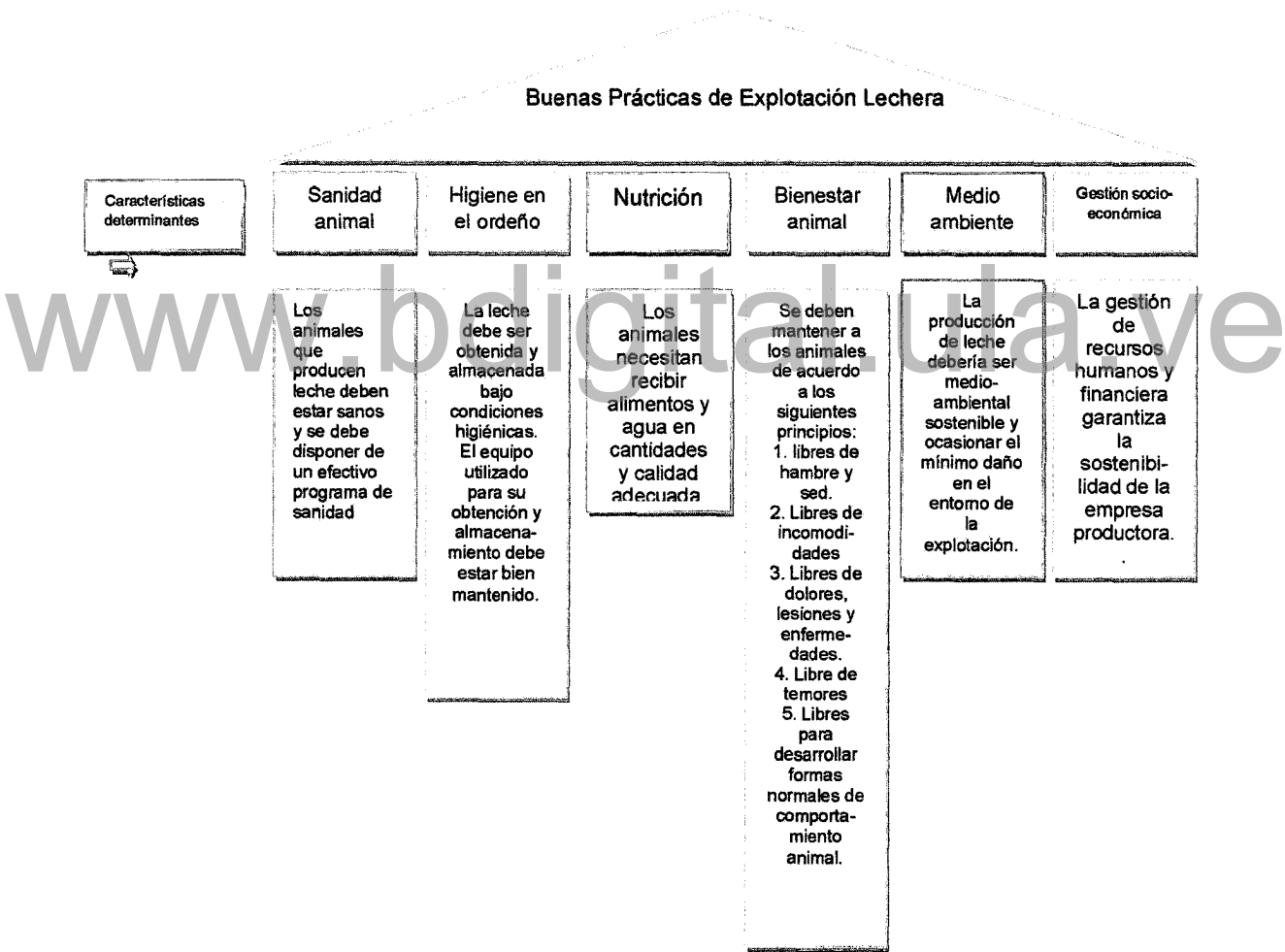
El marco internacional para garantizar que la leche y los productos lácteos sean saludables e idóneos, está contenido en el Codex Código Internacional de Prácticas Recomendadas (CAC/RCP, 2003) junto al código de Prácticas Higiénicas para la Leche y Productos Lácteos del Codex (CAC/RCP, 2004). Estas guías que se basan en principios referidos a la producción de leche en las unidades productivas, reconocen que la obtención de la leche es una parte integral de la cadena de producción en la que productores, transportistas, fabricantes de productos lácteos, distribuidores y consumidores deben formar parte del sistema integral de gestión para el aseguramiento de la calidad.

1.3.2. Indicadores de calidad sanitaria

Los indicadores de calidad sanitaria son aquellos grupos de microorganismos cuya presencia en los alimentos advierte sobre una inadecuada manipulación, la existencia de un peligro para la salud del consumidor (microorganismos, toxinas etc.) o una falla en los procesos destinados a su saneamiento. En el caso particular de la leche los microorganismos indicadores son útiles para juzgar el funcionamiento del establecimiento productor, la manipulación y el almacenamiento del producto, pues señalan la existencia de defectos de higiene

durante la cadena productiva de la leche, el incumplimiento de pautas higiénicas y permite inferir la vida útil y la inocuidad alimentaria (Signorini y col., 2008).

Entre los principales grupos microbianos utilizados como indicadores de calidad sanitaria de la leche se tienen bacterias heterótrofas, como las bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, coliformes fecales y los *Enterococcus*, así como otro grupo de microorganismos como los mohos y levaduras (Silva y col., 2004).



Fuente: Tomado y modificado de Guía de Buenas Prácticas en Explotación Lechera, FAO, 2012.

Figura 4. Buenas prácticas de explotación lechera.

I.3.2.1. Bacterias aerobias mesófilas

Comprende un grupo de especies bacterianas heterótrofas muy amplio que puede crecer en cualquier tipo de alimentos. Sus principales características son que presentan un metabolismo aerobio y una temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C. La determinación de este grupo microbiano indicador, puede señalar el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana, desde luego no es aplicable a alimentos fermentados, y puede dar información sobre el manejo del alimento. Este grupo de indicadores es importante en alimentos frescos, refrigerados, en lácteos y en alimentos listos para consumir (Silva y col., 2004).

I.3.2.2 Coliformes

La definición generalmente aceptada de coliformes describe a un grupo de bacterias heterótrofas, bacilos gran negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, cuando se incuban a una temperatura de 37 °C. De forma general se dividen en coliformes totales, los cuales incluyen bacterias del suelo, y del tracto digestivo, y coliformes fecales, que incluyen solo coliformes de origen fecal como es el caso de la especie *Escherichia coli*, la cual fermenta la lactosa con producción de gas cuando se incubaba a una temperatura de 44 °C. Los coliformes totales nos señalan el grado de higiene de un alimento o de los procesos de obtención del mismo. En el caso de los coliformes fecales, que incluye bacterias que pueden encontrarse en el tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados por las heces, por esta razón su presencia indica contaminación fecal (Camacho y col., 2009).

I.3.2.3. Enterococos

Es otro grupo microbiano indicador de calidad sanitaria. Se encuentra conformado por especies que antes se encontraban agrupadas en el género *Streptococcus*. Son bacterias heterótrofas Gram positivas, no formadoras de esporas, no móviles y anaerobios facultativos. Crecen en un rango de temperatura entre 10 y 45 °C. Se encuentran en el tracto intestinal de los seres humanos, animales de sangre caliente y aves. Las principales especies representantes de este grupo son *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus gallinarum*. Se les ha encontrado en alimentos como la leche cruda, productos lácteos, vegetales y en el agua. Su presencia es señal de malas prácticas de higiene y de contacto con material fecal (Camacho y col., 2009).

I.3.2.4. Mohos y Levaduras

Los mohos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, por lo que son frecuentes en la microbiota natural de muchos alimentos, se dispersan fácilmente en el aire; ciertas especies de mohos y levaduras son útiles en la elaboración de alimentos, sin embargo también pueden causar deterioro, debido a su crecimiento lento y su baja competitividad. Los mohos y las levaduras se manifiestan en los alimentos donde las condiciones no favorecen el crecimiento bacteriano y cuando están presentes en altas concentraciones señalan problemas con la higiene de la materia prima o de los equipos o ambientes de la fábrica, así como alimentos poco frescos (Stevens, 2003).

I.4. BIODIVERSIDAD

En ecología, el término biodiversidad, en general se refiere a la diversidad de especies de organismo, expresando el número de individuos de la población y su abundancia relativa. La idea de diversidad de especie, está basada en la suposición que las especies influyen unas sobre las otras y sobre el medio donde

se desenvuelven (Daniel, 1998). El termino diversidad es una condición de la variedad o diferencia entre miembros de una colección. Una población puede tener varias especies en su composición, en la estructura de edad, en el estadio de desarrollo y en la composición genética.

Los recientes progresos en ecología microbiana, muestran que el tamaño de la diversidad microbiana en la naturaleza es mucho mayor de lo que se pensaba, las bacterias son una de las formas de vida más diversas y pueden comprender hasta más de un millón de especies, sólo una fracción de estas especies han sido aisladas e identificadas, estimándose entre el 1-10% (Kennedy, 1999).

1.4.1. Biodiversidad bacteriana

Las bacterias son los organismos más abundantes de la tierra y son los encargados de mediar en una multitud de procesos críticos para el medio ambiente, el interés en estudiar el índice de biodiversidad bacteriana se fundamenta principalmente en la posibilidad de obtener individuos sujetos a experimentación (Alais, 2003).

Desde el punto de vista genético se debe tener en mente que cada secuencia de ADN, es única e irremplazable, esto es aplicable a todos los organismos vivos y por tanto también a los microorganismos, esto nos lleva hablar de biodiversidad, que es la variedad y variabilidad de todos los tipos de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte (Atlas y Bartha, 2005).

La diversidad bacteriana puede ser definida como el número de especies o biotipos y su abundancia relativa en un espacio y tiempo determinado dentro de una comunidad, o también, como la cantidad y distribución de información (genética, funcional) dentro de una comunidad, esto incluye la diversidad de genes, hábitat, nichos y la diversidad funcional de las poblaciones; de esta forma

la diversidad puede considerarse un atributo de la comunidad, relacionada con estabilidad, productividad y estructura (Yanine, 2010).

Los ecólogos microbianos a menudo utilizan la taxonomía numérica para determinar las especies bacterianas, presentes en una muestra, en la taxonomía numérica se determinan gran numero de características a menudo fenotípicas de organismos aislados de una muestra, y se realizan análisis de agrupación (*clusters*) para establecer las semejanzas entre los organismos. Se considera que organismos similares pertenecen a la misma especie (Atlas y Bartha, 2005).

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación, estos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observadas y sus propiedades fisiológicas y morfológicas. La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que se sabe que más del 90 % de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales; en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas debido al uso de métodos moleculares que no requieren el cultivo tradicional de microorganismos, estas técnicas moleculares han cambiado las perspectivas de la diversidad microbiana permitiendo describir, monitorear y controlar comunidades de microorganismos; en el caso específico de los alimentos, es esencial controlar esta información para poder obtener datos confiables sobre la diversidad y la identificación taxonómica de los microorganismos así como datos cuantitativos que describan cambios en la población, el impacto de los factores intrínsecos y extrínsecos y poder correlacionar el crecimiento y la actividad de los organismos individuales y la calidad y seguridad del producto (Dávila y Reyes., 2006).

En este sentido, y en relación con los microorganismos la leche, es un ecosistema de enorme riqueza microbiana y la misma definición de leche quedaría incompleta

si en ella no se considera la actividad de este componente, los estudios sobre la microbiología de la leche son numerosos, sin embargo a la fecha no existe ningún ejemplo de la determinación de la biodiversidad en muestras de leche producidas en una determinada zona (Alais, 2003).

Con el conocimiento actual se ha identificado el significado funcional de grupos particulares de microorganismos que afectan la productividad en la industria láctea. El aprovechamiento de la determinación del índice de diversidad bacteriana y su actividad de manera directa interviene en la productividad de la industria lechera y puede contribuir a apoyar el conocimiento en la búsqueda del reconocimiento como la denominación de origen en los derivados lácteos. (Chávez y col., 2007).

Los cultivos microbianos adquieren cada vez mayor importancia como mecanismos o vías para la conservación y la biodiversidad representando un importante elemento estratégico y económico para el desarrollo de las investigaciones científicas, con particularidad en las ramas de la biotecnología y la de la calidad.

1.4.2. Índices de biodiversidad

Los estudios de biodiversidad se basan en índices y modelos de diversidad diseñados para el estudio ecológico de comunidades de microorganismos, estos índices de valoración de la diversidad podemos dividirlos en tres grupos (Yanine, 2010):

- a) índice de riqueza de especies, como el índice de Shannon-Weaver índice de Margalef, estadística Q y estimado de la riqueza de OTU's.
- b) índice basados en abundancia proporcionales de especies (medidas de equitatividad /dominancia), como índice de equitatividad de Shannon, índice de Simpson, índice de Berger-Parker e índice de Loyd y Ghelardi.

c) modelo de abundancia de especies como el modelo serie log, modelo log normal, modelo de la “Broker stick” y modelo de nicho sobrelapante.

Algunos índices matemáticos describen la riqueza de especies en la comunidad, son los índices de diversidad de especies, y se utilizan para describir el conjunto de la población de una comunidad. Los índices de diversidad raramente se han aplicado a las comunidades microbianas debido a las dificultades técnicas para clasificar los numerosos microorganismos que requiere su utilización (Atlas y Bartha, 2005).

Los índices de diversidad relacionan el número de especies y la importancia relativa de las especies individuales, los dos principales componentes de la diversidad de especies son variedad y la uniformidad o equitabilidad. La riqueza de especies puede expresarse mediante relaciones simples entre el número total de especies y el número total de organismos. Es una medida del número de especies en la comunidad, pero no de cuantos individuos existen de una especie concreta (Atlas y Bartha, 2005).

La equitabilidad es una medida de la proporción de individuos dentro de cada especie e indica si existen poblaciones dominantes. Es difícil evaluar la diversidad de una comunidad a partir de una sola variable y pueden darse diferentes interpretaciones, que a menudo llevan a formularse la pregunta: ¿Qué significa biodiversidad? Para la mayoría los índices de biodiversidad reflejan la complejidad subyacente de la estructura de la comunidad (Atlas y Bartha, 2005).

Una medida de diversidad muy utilizada es el índice de Shannon–Weaver, también conocido sencillamente como índice de “Shannon”. Este índice general de biodiversidad es sensible a la riqueza y a la abundancia relativa de especie. El índice de Shannon–Weaver, debe interpretarse con precaución porque es sensible al tamaño de la muestra, especialmente en muestras pequeñas. La equitabilidad,

que es independiente del tamaño de la muestra se puede calcular a partir del índice de Shannon–Weaver, otra aproximación conocida como rarefacción, consiste en comparar el número de especies observadas con el número predicho por un modelo informático (Atlas y Bartha, 2005).

Este tipo de enfoque se ha aplicado a las comunidades microbianas. El principal problema de este tipo de enfoque es el nivel de semejanza utilizado para definir las especies microbianas. Para evitar este problema, (Watve y Gangal 1996) sugieren utilizar la distancia taxonómica media entre todos los pares de aislados como índice de la diversidad de la comunidad bacteriana. De acuerdo a esta medida, una comunidad bacteriana con pocas especies dominantes taxonómicamente distintas tendrían una gran media con una varianza, mientras que una comunidad bacteriana con un gran número de biotipos moderadamente diferentes tendría una gran media con una pequeña varianza (Atlas y Bartha, 2005).

Generalmente, la diversidad en comunidades estresadas es menor, por ejemplo; la diversidad calculada con el índice de Shannon–Weaver es más baja en las comunidades bacterianas de las superficies del agua del océano ártico que en el océano templado donde las bajas temperaturas y el hielo no causan el mismo estrés físicos. Se ha observado que algunas perturbaciones como la introducción de contaminantes en los ecosistemas acuáticos reduce la biodiversidad. La diversidad de las comunidades microbianas es un índice de contaminación sensible. Teóricamente las comunidades estresadas con una diversidad baja están menos adaptadas para enfrentarse a más fluctuaciones ambientales y al estrés que las comunidades biológicamente aceptables y con un grado de diversidad más alto (Atlas y Bartha, 2005).

Ejemplos de índices de diversidad de especies:

Riqueza de especies (d)

$$d = \frac{S - 1}{\log N}$$

Donde S = número de especies

N = número de individuos

Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H)

$$\bar{H} = \frac{C}{N} (N \log N - \sum n_i \log n_i)$$

Donde $C = 2,3$

N = número de individuos

n_i = número de individuos de la especie

Uniformidad (e)

$$e = \frac{\bar{H}}{\log S}$$

Donde $\bar{H}$ = índice de diversidad de Shannon-Weaver

S = número de especies

Estabilidad (J)

$$J = \frac{\bar{H}}{\bar{H}_{\max}} \text{ indii}$$

Donde $\bar{H}$ = índice de diversidad de Shannon – Weaver

S = valor máximo teórico del índice de diversidad de Shannon – Weaver para la población estudiada, suponiendo que cada especie tenga solamente un miembro

El resultado obtenido de la aplicación de la fórmula, es interpretado conociendo el grado de dificultad que se provee de antemano, en un muestreo valores altos del índice significan mayor grado de incertidumbre; ejemplo de esto: se poseen dos especies, especie a= posee 99 individuos, especie b= 1 individuo; el resultado es

igual a 1 se expresa como 1 bits/ind. La experiencia con el uso del índice de Shannon, dice que raramente los resultados son superiores a 5 bits/ind (Daniel, 1998).

La función del índice de Shannon se relaciona con dos componentes principales, esto es, el número de especies y la regularidad de los individuos en medio a las especies, esto significa que un gran número de especies, puede aumentar la medida de la diversidad H . (Daniel, 1998).

En la biodiversidad bacteriana existen tres componentes, a saber: riqueza, uniformidad y abundancia para describir una respuesta de la comunidad bacteriana, una comunidad natural se caracteriza por tener una alta diversidad o riqueza y un bajo número de individuos por especies, por el contrario, una comunidad bajo la presión de la contaminación, se caracteriza por poseer un bajo número de especies, pero muchos individuos por especies, esto lo provocan también condiciones naturales extremas; aunque el concepto de diversidad es muy atractivo en teoría, sus resultados pueden variar mucho con los métodos de muestreo, la naturaleza de la muestra y la época del año (Roldán, 1999).

I.5. ECONOMÍA DE LA PRODUCCION DE LECHE , DENOMINACION DE ORIGEN Y SU RELACION CON LA MICROBIOTA BACTERIANA

I.5.1 Economía en la producción lechera

El sector de producción lechera ha experimentado ciertos cambios a consecuencia de los nuevos hábitos y preferencias del consumidor (mayor énfasis relación calidad-precio, hábitos alimenticios, segmentación del consumo, entre otros), dinámica que ha contribuido a generar, por parte de las empresas industriales, una mayor oferta de productos produciéndose con ellos una desaceleración menos pronunciada del sector. En general el consumidor tiende a buscar ciertas características en los productos que incluye aspectos tales como: calidad,

presentación, atributos añadidos y durabilidad, así que las exigencias y necesidades del consumidor es un elemento importante en la actual dinámica de mercado lácteo.

La producción primaria de leche es un importante elemento para toda la cadena láctea, es el eslabón de la cadena de valor que tiene más participación: costos, recursos utilizados, la creación de emisiones, desafíos políticos, entre otros; es por esto, que desde hace mas de 10 años se concentran esfuerzos en mejorar la producción de leche en todo el mundo. La demanda de la leche se ve impulsada por el crecimiento demográfico, aumentos en el poder adquisitivo, los precios al consumidor y cambios en los hábitos de consumo, sólo el crecimiento previsto de la población produce una demanda creciente de la producción anual de leche; todo esto implica que la industria lechera crecerá en producción y elaboración de derivados lácteos en los próximos años, y las regiones lecheras que sean capaces de adaptarse más rápido ganarán participación, a través de creación de sistemas de producción competitivos, nuevos productos, creación de confianza en la cadena láctea mejorando sistemas de producción y garantizando inocuidad alimentaria (Olivares y col., 2010).

La producción de leche en Venezuela está estimada en un 90 % proveniente de ganado de doble propósito, esta producción es deficitaria para cubrir la demanda interna, el crecimiento interanual de la producción lechera en los últimos 25 años tiende a ser negativa, con la consecuencia sobre el consumo de productos lácteos *per capita*, la cual ha disminuido aproximadamente el 50% en el mismo periodo; la producción lechera en Venezuela es baja estimándose en 1773 L/vaca/año, entre las causas de la baja productividad se encuentra: poco potencial genético, problemas de manejo sanitario, reproducción y nutrición. En Venezuela es posible mejorar la productividad de los sistemas de producción lechera, con la incorporación de potenciales genéticos y tecnología alimentaria apropiadas (Padilla y col., 2007).

La leche se produce diariamente y por lo tanto puede proporcionar un ingreso en efectivo regular, el precio de la leche al productor se puede basar en su además de esto es un fuerte potencial en la producción de derivados, los cuales representan una economía en pequeña escala en productores que por lo general utilizan mano de obra familiar, por lo tanto el procesamiento de productos lácteos, al igual que la mayoría de las actividades posteriores ofrecen grandes posibilidades. (FAO, 2012).

1.5.2 Denominación de origen

En todas partes del mundo existen regiones o países que cuentan con características geográficas especiales y formas de elaboración tradicionales para ciertos productos, que lo hacen ser auténticos de la zona y permiten que los mismos ocupen un lugar especial en los gustos o preferencias de los consumidores facilitando con el tiempo la creación de ventajas competitivas en cuanto a precio y originalidad (Medina y col., 2012).

El interés del consumidor a una declaración geográfica confiable de la producción del alimento ha aumentado durante los años, esta demanda del consumidor para identificar geográficamente el producto ha conducido a establecer un etiquetado controlador de productos de alimentos como es la Denominación de Origen Protegido (DOP), esta información es considerada como una garantía adicional de calidad, autenticidad, tradición y seguridad (González y col., 2012).

Según Esquerre (2008) para evitar el manejo fraudulento del origen de los productos se ha creado las Denominaciones de Origen (D.O) y las Indicaciones Geográficas Protegidas que remontan su origen a Europa a partir del siglo XIX.

La denominación de origen nace de la voluntad de algunos países de proteger sus productos agrícolas y alimentarios por su origen geográfico, la distinción de calidad ligada al origen geográfico o a los procedimientos ecológicos en el proceso

de producción de los distintos alimentos, han sido algunas de las estrategias de diferenciación más desarrolladas durante la última década en el sector agroalimentario. La utilización del origen como elemento diferenciador de los productos agroalimentarios no es algo nuevo, la primera denominación de origen realmente protegida se ubica en Francia en el siglo XVII, con la declaración del Parlamento de Toulouse acerca de la exclusividad que tenía el queso que se curaba en la región de *Roquefort* (Gázquez y col., 2012).

El componente típico se constituye como un elemento que confiere a los productores una calidad determinada, de esta manera se vincula un producto con un lugar geográfico determinado, surgiendo en este momento el concepto de indicación geográfica. La vinculación de determinados productos surge desde el principio como realidades históricas, culturales, económicas y sociales que, aunque no hayan sido reconocidas desde el punto de vista legal, tienen una larga tradición (Cambra y col., 2009).

Otro aspecto a tomar en cuenta es el desarrollo del turismo gastronómico, una modalidad emergente de turismo muy demandada en la primera década del siglo XXI, en la que el turista busca degustar los productos alimenticios típicos de la zona geográfica que visita, conocer el proceso productivo y disfrutar del patrimonio cultural y culinario del lugar; la denominación de origen potenciaría el entorno rural promoviendo nuevas actividades económicas para mantener y mejorar las condiciones de vida de la población, su objetivo es lograr un producto capaz de integrar a mayor cantidad de actores, generar mayor actividad económica diversificando la producción (Millán y col., 2012).

Las denominaciones de orígenes protegidos, así como otros signos de distintivos de calidad diferencial, vinculan el desarrollo territorial con los agentes económicos, recreando el mercado de determinado bien en el etiquetado, lo que permite a los consumidores mostrar su disposición a pagar por determinado atributo, la Unión Europea es quien más a desarrollado en la última década la D.O.P en sus

productos potenciando el desarrollo económico de las zonas productoras (Pérez y col., 2013).

En Venezuela hay muchos alimentos ligados a una región productora (queso guayanés, chorizo carupanero, dulce de leche coriano, etc.) pero solo hay tres productos con denominación de origen respaldada legalmente: el ron de Venezuela, el cocuy de Pecaya y el cacao de Chuao, en cada caso ha sido gracias al esfuerzo y constancia de los productores que han logrado obtener este estatus. El “cacao de Chuao” es la primera denominación de origen registrada en Venezuela y en el mundo para el rubro de cacao, reconocimiento con el que se protege un producto cuya calidad y características responden especialmente al medio geográfico de la región, incluidos los factores naturales y humanos (Uzcátegui, 2008).

Venezuela presenta muy pocos productos con dicha distinción, lo cual hace necesario que se realicen esfuerzos mancomunados entre los productores artesanales, las universidades y los entes responsables del desarrollo económico del país para que se incentive y se promueva la creación de D.O para los productos nacionales como estrategia de diferenciación, y así lograr posicionar los productos en los mercados regionales, nacionales e internacionales, manteniendo la originalidad de las materias primas y los procesos artesanales (Medina y col., 2012).

En el caso de la leche y los productos lácteos, el conocer y caracterizar la microbiota microbiana asociada a estos productos, y tomando en consideración que la microbiota es una huella característica de un producto determinado, permitirá en un futuro poder desarrollar denominaciones de origen en Venezuela para la leche de una región o zona, o de los productos lácteos obtenidos del mismo, como lo ha sido en muchas partes del mundo (Duthoit y col., 2003; Mauriello y col., 2003; Alegria y col., 2009; Neviani y col., 2013)

I.6. PERSPECTIVAS EN LA PRODUCCIÓN LECHERA

Cuando se menciona soberanía alimentaria se hace referencia a la independencia que tiene un país de producir, abastecer y garantizar alimentos a su población. El progresivo y acelerado crecimiento de la población ha demandado día a día mayores volúmenes de alimentos, tanto de origen vegetal como animal, que satisfagan las necesidades nutricionales y alimenticias de la humanidad. Para Venezuela es impostergable e inaplazable implementar una profunda transformación económica y social que se oriente hacia la búsqueda de una producción agrícola y pecuaria endógena soberana y sostenible en el tiempo que satisfaga las necesidades nutricionales de las generaciones presentes, sin comprometer las capacidades del devenir de las futuras generaciones (Paredes, 2010).

La crítica situación que hoy vive la ganadería y exclusivamente la de leche en Venezuela, es digna de reflexión y análisis y exige enfáticamente del diseño de un programa que a mediano y largo plazo se oriente hacia la intensificación de la producción, para ello es necesario la conformación de un programa nacional que sea coherente y compatible armónicamente con sistemas diversos de ganadería de doble propósito sostenible. La intensificación de la ganadería de doble propósito conlleva conjuntamente varios aspectos desde la gerencia que ha de estar al frente de este complejo modelo productivo, pasando por el uso equitativo de los recursos tanto abióticos como los bióticos para incrementar la productividad física de los agro ecosistemas mediante la aplicación correcta de conocimientos y arreglos tecnológicos que muestren marcado impacto en la calidad productiva y que se refleje en su rentabilidad económica (Paredes, 2010).

De acuerdo a Ordóñez (2005), el diagnóstico de la situación de la producción de leche en Venezuela es ampliamente conocido, la producción de leche disminuye a ritmo acelerado, la escasez de leche cruda genera como es de esperar una demanda insatisfecha que promueve el alza de precios, los indicadores señalan

que la caída de la producción es resultado del efecto combinado en el número de proveedores que abandonan esta actividad por una más rentable y condiciones más seguras.

En la búsqueda de soluciones a los grandes problemas de la humanidad como son la obtención de formas no convencionales de energía, el saneamiento y la conservación del medio ambiente, la salud del hombre, la salud animal, la agricultura y la alimentación, el uso de los microorganismos ha sido fundamental y ha alcanzado un incremento considerable en el mundo entero (Smith, 2003).

La realización de estudios que promuevan el conocimiento y caracterización de la microbiota bacteriana de la leche, así como de los derivados lácteos obtenidos de la misma, como el caso de los quesos frescos y madurados, además de aportar soluciones para la obtención de productos de una mayor calidad sanitaria y nutricional, servirá para darle un valor agregado a los productos elaborados en el país, lo cual estimulará indudablemente al crecimiento y desarrollo de la producción de leche, así como al establecimiento de una industria Láctea fuerte y competente.

CAPITULO II. ANTECEDENTES DE LA HIPOTESIS, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Antecedentes de la hipótesis

Numerosos microorganismos, incluyendo bacterias, mohos y levaduras, están presentes en la leche cruda de origen bovino, de estos las bacterias heterótrofas son responsables de la mayor parte de las transformaciones físico-químicas y aromáticas que son intrínsecos en los procesos de transformación de los diferentes derivados lácteos; la identificación de estas bacterias, que constituyen el ecosistema de la leche, es esencial para la comprensión de sus constituyentes individuales y por ende para la comprensión de sus procesos de degradación o utilización de los potenciales tecnológicos de algunos de los microorganismos presentes (Ogier y col, 2013).

Quigley y col. (2013), estudiaron la microbiota bacteriana presentes en la leche cruda. Considerarán que la leche debido a su alto contenido de nutrientes puede alojar una amplia población de bacterias; las cuales consigue llegar a la leche por varias fuentes y una vez en la leche logran desempeñar una serie de funciones, entre las cuales esta actuar como facilitadores en la fermentación láctica (*Lactococcus*, *Lactobacillus*; *Streptococcus*, *Propionibacterium*), así como, poblaciones de bacterias que causan deterioro (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* y otros microorganismos que forman esporas) existen también microorganismos promotores de la salud (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) y causantes de enfermedades (*Listeria*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*). Al igual que evaluaron la presencia de residuos de antibióticos en la leche cruda, que conduce al desarrollo de resistencia en las bacterias patógenas, muchas de las cuales pueden transmitirse por el consumo de la leche cruda.

En cuanto a la presencia de bacterias patógenas en la leche cruda bovina almacenada en tanques de enfriamiento, Ruusune y col. (2013), realizaron una

investigación determinando la prevalencia de las mismas en leche cruda en Finlandia, observando la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa positiva*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus*. Por otra parte, la calidad higiénica se estudio mediante contenido de recuento total de bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas, concluyendo que en su totalidad en todas las muestras analizadas se obtuvieron presencia de patógenos, lo que sugiere que están presentes a pesar de aplicar excelentes condiciones higiénico-sanitarias. La concentración de bacterias patógenas en leche cruda fresca fue menor a la concentración de patógenos en leche refrigerada, por lo que algunas bacterias patógenas pueden multiplicarse a temperatura de refrigeración, por lo tanto concluyen estos investigadores que el consumo de leche cruda y productos de ésta, representa un riesgo potencial para la salud de la población.

Resultados de estudios muestran que la aparición de agentes patógenos tales como las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Salmonella enterica*; en leche cruda, es un problema común en las fincas productoras de leche, por lo que el control en la pasteurización antes del consumo sigue siendo primordial (Hill y col., 2012).

Por su parte, Garedea y col. (2012), identifican bacterias Gram negativas en el control de la leche de vaca consumida en Gondar, Etiopia, donde destacan que la leche es altamente propensa a la contaminación bacteriana y puede servir como un vehículo eficiente para la transmisión de patógenos a humanos. Indican que especialmente las bacterias Gram negativa, ya que estas se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. De igual forma, señalan que las condiciones higiénicas de pre-ordeño y la manipulación de la leche en el ordeño juegan un papel fundamental en la calidad de la misma; puesto que en el estudio lograron identificar 54 especies bacterianas diferentes, entre las cuales se encontraban cepas de las especies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Estos resultados destacan la necesidad de mantener

medidas sanitarias e higiénicas adecuadas en cada punto crítico de control, a fin de proteger al consumidor.

En muestras de leche cruda bovina analizadas por Kuang y col. (2009), en Hokkaido, Japón, estos autores logran identificar bacterias heterótrofas mesófilas como las especies *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; que representan la ecología microbiana y biodiversidad de la leche proveniente de bovinos de esa zona. Los autores realzan la limitación de las técnicas tradicionales de identificación y propone la caracterización de la microbiota bacteriana por técnicas moleculares de identificación como herramienta potencial para la industria láctea.

Según las investigaciones adelantadas por Sim Kheng y col. (2012), la variación de la población de bacterias heterótrofas en la leche cruda bovina puede estar asociada a las diferentes prácticas de producción y de ordeño aplicado en cada finca lechera. Estos estudios revelaron que la higiene personal de los manipuladores, así como la higiene en los utensilios empleados durante el proceso de ordeño, contribuyen a la diversidad de la población de bacterias heterótrofas.

Verdier-Metz y col. (2009), establecieron vínculos entre las prácticas de ordeño y la biodiversidad bacteriana de la leche cruda, en la zona de explotación lechera de Savoie, Francia. Estos investigadores evaluaron las prácticas de ordeño y los perfiles bacterianos, caracterizando en su mayoría bacterias heterótrofas aerobias mesófilas a pesar de la aplicación de un alto nivel de higiene en el ordeño, predominando la presencia de bacterias Gram negativas.

La población de bacterias heterótrofas de la leche cruda de origen bovino, puede provenir de diferentes fuentes dentro de las instalaciones de producción de leche, tales como ambiente, aire, equipos de ordeño, alimentación de animal, suelo, agua y medio ambiente, entre otros; conclusiones a los que llegaron en sus

investigaciones Coorevits y col. (2008). Estos especialistas realizaron un análisis comparativo de la diversidad de bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas en la explotación de leche cruda orgánica y convencional, así plantearon como hipótesis que la diferencia en la alimentación y estrategia de ordeño, así como el hábitat de las vacas, podían influir en la calidad microbiológica de la leche, esta hipótesis se investigó comparando las bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas, lográndose demostrar la misma.

Los microorganismos que generalmente se cuantifican en los alimentos, abarcando la leche cruda, son los indicadores de calidad sanitaria, incluyendo estos: bacterias aeróbicas mesófilas, mohos, levaduras, coliformes totales y fecales, sin embargo para la prevención y control de las enfermedades asociadas a alimentos la búsqueda de microorganismos patógenos es de relevante importancia (Fuentes y col., 2005).

Números estudios se han realizado para determinar la calidad microbiológica de la leche cruda, entre estos el realizado por Velásquez y col. (2012), quienes analizaron muestras de leche cruda bovina en dos épocas diferentes del año, donde lograron determinar un elevado recuento de bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas, superando lo establecido por la legislación, concluyendo que en época de verano, la mayor contaminación se debe a las altas temperaturas y exposición del pezón del animal a patógenos, desencadenando la inflamación y como consecuencia la aparición de mastitis sub-clínica.

De igual manera, estudios realizados por Moreno y col. (2007), en muestras de leche cruda de la Región de Chicamocha en Colombia, establecen que los altos recuentos de bacterias heterótrofas se ven influenciados por el régimen pluvial de la zona que constituye un factor predisponente para la proliferación bacteriana, concluyendo que los cambios en la población microbiana pueden ocurrir como respuesta a condiciones ambientales globales como lo son los cambios estacionales, luz, temperatura y lluvia.

Calderón y col. (2006), por su parte, analizaron muestras de leche cruda en diferentes regiones de Colombia, resultando que durante las épocas de calor las leches fueron asociadas a una menor calidad bacteriológica. Consideran estos autores que en las zonas frías las bajas temperaturas ambientales retardan el crecimiento bacteriano, sin embargo, un alto contejo de aeróbico mesófilos se encontraron también en las zonas con máximas precipitaciones fluviales, relacionando esto con las malas condiciones higiénicas de los establos, de los sitios de ordeño y de los operarios, así como la calidad bacteriológica del agua usada para la limpieza y desinfección de los pezones.

Así mismo, en los trabajos realizados por Cepero y col. (2005), se establece que el entorno influye notablemente en la calidad higiénica sanitaria de la leche cruda, predominando la población de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas.

Se debe considerar los estudios realizados por diferentes investigadores como Vásquez y col. (2012), Fuentes y col. (2012), Álvarez y col. (2012), Grandos y col. (2012), así como, Revelli y col. (2011), entre otros, quienes coinciden que altos contajes de bacterias heterótrofas, indicadoras de calidad sanitaria presente en las muestras, están relacionada directamente con las condiciones del entorno y con la presencia de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos, poniendo en riesgo la salud de la población.

Por otra parte, las enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas al consumo de leche cruda, son de relevante importancia en salud pública, en un estudio piloto realizado por Ricci y col. (2013), en Veneto, Italia, en fincas que producen leche para ser comercializada sin pasteurización, evaluaron los riesgos de la presencia de contaminación fecal en las muestras, lo que se correlacionaba directamente con la transferencia de estos patógenos al ser humano, lo cual parece ser modulado por la estructura de la finca y la salud del animal, tal método utilizado, conjuntamente con las evaluaciones microbiológicas, donde la prevalencia de leche con contaminación fecal fue evidente, prevé utilizar un

programa de vigilancia basado en la aplicación de medidas de control higiénico-sanitarias, reduciendo el riesgo para el consumidor. De igual manera lo plantearon Stephen y col. (2009), donde establecieron el riesgo que representa el consumo de leche cruda.

A nivel mundial existe la preocupación de que hasta la fecha alrededor de 250 enfermedades se han descrito cuya transmisión es por el consumo de alimentos contaminados, como la leche cruda, de las cuales las dos terceras partes implican al *Staphylococcus aureus* como agente causal (Le loir y col, 2003).

El estudio de la biodiversidad bacteriana en la leche cruda, no solo tiene importancia por la presencia de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica patógena que en ésta se puede encontrar, también es de gran importancia la presencia de una microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila capaces de aportar características resaltantes para la industria láctea y para el desarrollo tecnológico de productos derivados.

Los microorganismos son un componente esencial en la fabricación de derivados lácteos y juegan un papel importante tanto en la fabricación como en las características organolépticas que se esperan obtener, así, en la fabricación del queso, por ejemplo, la composición de la población microbiana bajo la influencia de los cambios continuos en las condiciones ambientales y la presencia de una microbiota bacteriana que interactúa durante la fabricación y la maduración, determinan las características del queso y la dinámica de su microflora. En el pasado el estudio de los microorganismos en alimentos dependía de técnicas clásicas, el desarrollo de nuevas tecnologías ha favorecido a la utilización de herramientas para observar la dinámica de las comunidades microbianas, aportando un avance importante en la comprensión de los ecosistemas microbianos y su aporte a la tecnología láctea (Neviani y col, 2013).

Rivano y col. (2013), realizaron un estudio sobre la biodiversidad y la caracterización de *Staphylococcus* coagulasa negativa en muestras de leche cruda y queso al norte de Italia, donde el objetivo fue identificar la biodiversidad del genero *Staphylococcus*, tratando aspectos de seguridad para el consumo y propiedades tecnológicas para la manufactura del queso de la zona.

Caro y col. (2013), caracterizaron la microbiota bacteriana del queso Oaxaca, con interés particular en cepas de *Lactobacillus*, el objetivo fue identificar y caracterizar las cepas de *Lactobacillus* del queso Oaxaca de México, mediante técnicas moleculares, logrando probar la capacidad de acidificar, resistencia a los antibióticos y la actividad contra los patógenos, el *Lactobacillus plantarum* fue el predominante, presentando resistencia contra *Staphylococcus aureus*, centrándose el estudio en el diseño de un cultivo para uso en la fabricación del queso.

Vendier-Metz y col. (2012), analizaron la influencia de la biodiversidad bacteriana presente en la piel del pezón de la vaca y su influencia en la preparación de queso madurado a través de métodos moleculares, este estudio pone en relevancia la gran diversidad bacteriana heterotrófica mesófila que puede encontrarse en la piel del pezón, donde el 79,8% de las cepas aisladas corresponden a especies no identificadas y el resto a especies identificadas comúnmente encontradas en leche entre estas: *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Enterobacter*, *Aerococcus* y *Staphylococcus*. Estos microorganismos pueden contribuir al desarrollo de las características sensoriales del queso durante la maduración, y por otra parte indican que el pezón del animal puede distinguirse como una fuente interesante de estudio de biodiversidad en leche.

En relación a la producción láctea, Walsh y col. (2012) estudiaron la biodiversidad en bacterias heterotróficas termodúricas aisladas en sueros en Irlanda, donde resaltan la importancia de la caracterización de microbiota bacteriana naturales en leche, queso, sueros y otros productos lácteos, las cuales son capaces de

sobrevivir a procesos de calor y pueden dar lugar a defectos de calidad y reducir considerablemente la vida útil del producto, particularmente en Irlanda los concentrados proteicos como el suero se ven afectados por la presencia de microorganismos que comúnmente se presentan en invierno, afectando negativamente la producción, concluyendo que la identificación de la biodiversidad bacteriana en distintas etapas de producción ayudará a tomar medidas que reduzcan o eliminen aquellos microorganismos capaces de alterar negativamente la producción y tomar ventaja de los que favorecen el desarrollo de nuevos productos.

Nero y col. (2008), estudiaron la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, en leche cruda producida en Brasil, evaluaron la interferencia de la microbiota bacteriana autóctona en los procedimientos de aislamiento, así como la frecuencia de las cepas originales de la leche y su actividad antagónica contra ambos patógenos, la mayoría de las cepas antagónicas aisladas son bacterias ácido lácticas principalmente *Lactococcus lactis subesp. Lactis* y *Enterococcus faecium*, conocidos por sus sustancias antimicrobianas.

En una investigación realizada por Signorini y col. (2012), utilizaron microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico sanitarias en la producción primaria de leche, estableciendo que los microorganismos marcadores en alimentos advierten sobre la manipulación inadecuada de la materia prima, la presencia de peligros para el consumo o deficiencias en los procesos destinados a saneamientos, estos marcadores son herramientas importantes para poder desarrollar registros microbiológicos históricos a partir de los cuales se pueden establecer factores de referencia, los que permitirán implementar sistemas que garanticen la inocuidad alimentaria, utilizaron como marcadores microorganismo psicotrópicos, mesófilos, termodúricos, mohos, levaduras y *Staphylococcus aureus*, así como *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. La información de cada uno de los marcadores permitió

evaluar las condiciones higiénicas sanitarias en la producción primaria de leche y generar registros que serán de utilidad para implementar el sistema de HACCP.

En Venezuela, los estudios sobre la microbiología de la leche cruda, se han enfocado principalmente a la evaluación de los indicadores de calidad sanitaria y a la búsqueda de ciertas bacterias patógenas (Camarata, 1993); entre estos podemos destacar el realizado por Sánchez y col. (1996), donde estudiaron las características físico-químicas y sanitarias de la leche del Estado Mérida, Venezuela, empleando métodos analíticos de COVENIN, AOAC y APHA; los resultados obtenidos presentaron conformidad con la norma COVENIN para los análisis físico-químicos mientras que se evidencio que la calidad sanitaria de la leche cruda es pobre, por debajo de la norma COVENIN.

Por su parte Román y col. (2003) evaluaron la calidad físico-química e higiénico-sanitaria de la leche cruda almacenada al frío en cuatro industrias lecheras en localidades del Zulia, Trujillo y Mérida, tomando un total de 107 muestras, realizando conteo de bacterias aerobias mesófilas, psicótrofos totales, psicótrofos proteolíticos y lipolíticos, así como recuento de células somáticas, obteniendo como resultado que la calidad higiénica sanitaria fue deficiente demostrado en un elevado conteo de mesófilos, psicótrofos totales y proteolíticos, sobre todo en muestras almacenadas por más de dos días antes de ser procesadas.

Palma y col. (2007) realizaron estudios al sur del Estado Aragua, en leche cruda de origen bovino, donde obtuvieron como resultado que no existe una buena práctica de ordeño o manejo de ordeño en las fincas estudiadas, presentando en las muestras analizadas más del 60 % bacterias heterótrofas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y diversas especies de *Pseudomonas*.

En el Estado Carabobo Luigi y col. (2013), realizaron una evaluación de la calidad higiénico sanitaria de leche cruda y pasteurizada proveniente de diversas zonas

del Estado, determinaron recuento de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, termo tolerantes (fecales) mohos y levaduras para la muestras de leche pasteurizada y recuento de bacterias aerobias mesófilas y prueba de TRAM para las muestras de leche cruda así como determinación de *Salmonella spp.*, según las pruebas del TRAM solo el 30% de las muestras analizadas se encontraron por encima de los valores permitidos por la norma COVENIN, sin embargo según el análisis de BAM sobrepasan los límites, no se encontró presencia de *Salmonella spp.* en ninguna de las muestras. Los resultados demuestran que es necesario que las autoridades de salud del país implementen medidas estrictas en el control sanitario desde la finca de ordeño hasta la industria láctea.

II.2. Hipótesis

Las particularidades y características agroecológicas de las zonas altas y las zonas bajas productoras de leche del Estado Mérida establecen diferencias en la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila y ello determina cambios en la diversidad bacteriana.

II.3. Objetivo general

Conocer y comparar cuantitativamente y cualitativamente la diversidad de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila presente en leche cruda bovina proveniente de fincas de las zonas altas y fincas de las zonas bajas del Estado Mérida en dos épocas diferentes del año, con el propósito de establecer atributos diferenciadores.

II.4. Objetivos específicos

1. Identificar y cuantificar la cantidad de bacterias heterótrofas aeróbicas mesófilas presentes en la leche cruda bovina proveniente de fincas de las zonas altas y bajas del Estado Mérida, en dos épocas del año.
2. Identificar las especies bacterianas de bacilos y cocos Gram positivo presentes en la leche cruda bovina proveniente de fincas de las zonas altas y bajas del Estado Mérida, en dos épocas del año.
3. Identificar las especies de bacilos Gram negativos presentes en la leche cruda bovina proveniente de fincas de las zonas altas y bajas del Estado Mérida, en dos épocas del año.
4. Comparar la microbiota bacteriana heterótrofa de la leche cruda de las zonas altas y de las zonas bajas del Estado Mérida.
5. Determinación de los índices de biodiversidad bacteriana heterotrófica mesófila de la leche cruda bovina de las dos zonas de estudio.

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Selección de las zonas y unidades de muestreo

III.1.1. Ubicación geográfica

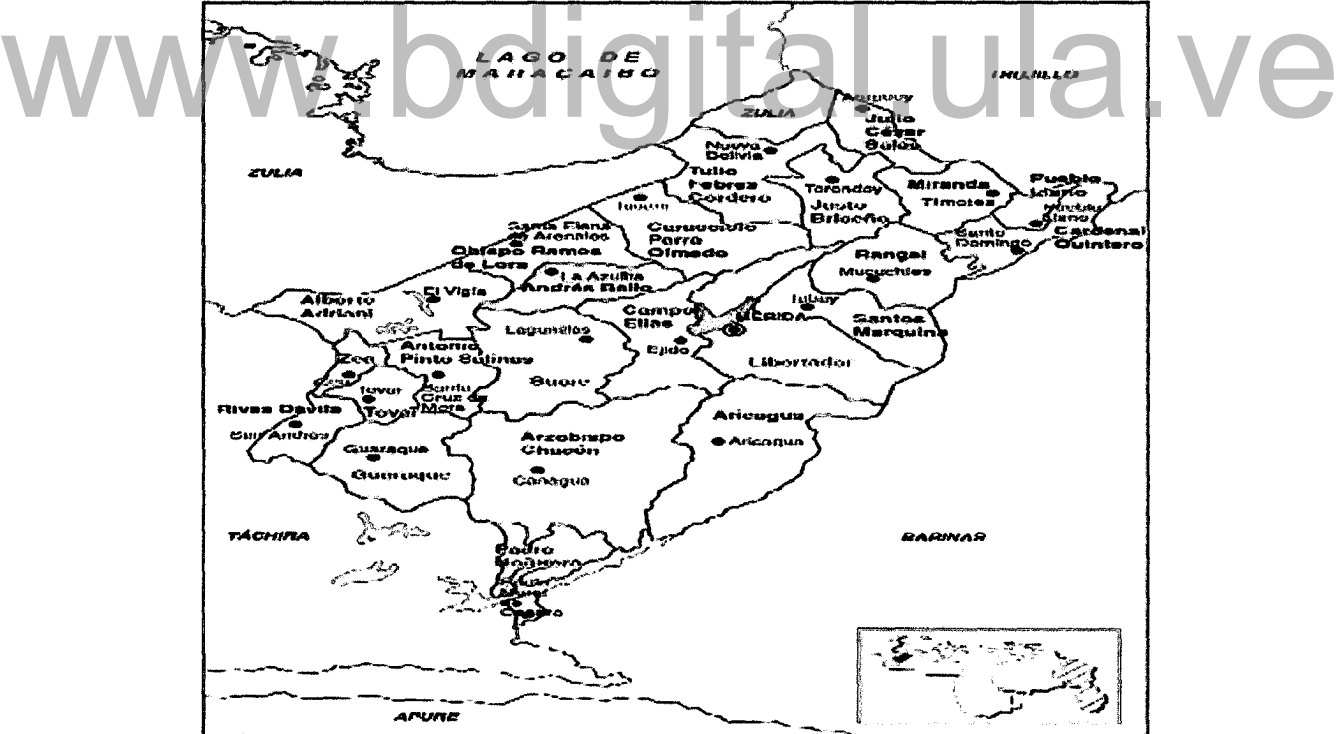
El estado Mérida, se encuentra ubicado al occidente de Venezuela, formando parte de la Cordillera de los Andes del continente sudamericano, presenta altitudes superiores a los 4.000 m.s.n.m, llegando a su punto más elevado a unos 4.970 m.s.n.m. Es uno de los estados con mayor diversidad geográfica, con zonas altas superiores a 4.000 m.s.n.m, zonas medias con elevaciones alrededor de 900 y 1600 m.s.n.m. y la zona Sur del Lago que es más próximas al nivel del mar estando por debajo de los 200 m.s.n.m. (Corpoandes, 2002).

La temperatura varía según las características de cada subregión pudiendo alcanzar los 32°C en la zona Sur del Lago, temperaturas menos cálidas se registran en la zona Metropolitana de la ciudad de Mérida con valores alrededor de 25°C; en la zona del valle de Mocotíes se presentan valores más templados entre 17°C y 22°C, y en los pueblos del páramo las temperaturas están por debajo de los 12 °C alcanzando incluso valores bajo 0°C. (Corpoandes, 2002).

El estado Mérida se destaca por su agricultura y la producción pecuaria, resaltando en ganadería bovina, considerado el tercer estado productor de leche de Venezuela, resaltando la producción de derivados lácteos como importante actividad económica (Corpoandes,2002).

Para la toma de muestras de leche cruda bovina se seleccionaron 6 Municipios, ubicados en las dos zonas geográficas productoras de leche del estado, la zona alta y la zona baja, con características geográficas climáticas y ecológicas diferentes (Tabla 8).

Municipio	Sector	Zona	Altura promedio msnm	Temperatura promedio °C
Libertador	El Valle	Alta	2000	17
Campo Elías	Jají	Alta	1789	18 - 23
Santos Marquina	Tabay	Alta	4300	17
Alberto Adriani	El Vigía	Baja	800	27,5
Obispo Ramos de Lora	Sta. Elena de Arenales	Baja	165	30 - 32
Caracciolo Parra y Olmedo	Tucaní	Baja	25	27,5 - 33



Financing of the Federal Reserve

III.1.2 Descripción de las unidades de muestreo

Para la selección de las fincas productoras de leche de origen bovino donde se realizaron los muestreos se consideraron aquellas donde se utiliza el ordeño mecánico como sistema de extracción de la leche, y donde una vez obtenido el producto, este pasa a ser almacenado en tanques de enfriamiento.

En este sentido, se seleccionaron al azar, utilizando una tabla de números aleatorios, un total de 05 fincas para cada una de las zonas objeto de estudio, de manera que se estudiaron un total de 10 fincas productoras de leche (Tabla 9).

Fundamentándonos en el hecho de que las condiciones ambientales influyen en el crecimiento bacteriano, las muestras fueron tomadas en dos épocas diferentes del año; se consideró la época de sequía y la de invierno.

Según la referencia del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH) del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, en Venezuela existen dos épocas de cambios climáticos significativos, definidas estas como verano o sequía entre los meses de enero a abril y lluvia o invierno, correspondientes a los meses de mayo a diciembre.

Tomando en consideración lo antes señalado, el número total de muestras en el estudio fue de 20 muestras de leche cruda de origen bovino.

Finalmente y de manera de evaluar las condiciones higiénico-sanitarias de cada una de las fincas seleccionadas, se realizó una entrevista a los ordeñadores y personal involucrado en el proceso productivo (Anexo 1).

Tabla 9. Fincas de producción de leche seleccionadas por zona de estudio

Fincas	Zona	Municipio
1	Alta	Libertador
2	Alta	Libertador
3	Alta	Campo Elías
4	Alta	Campo Elías
5	Alta	Santos Marquina
6	Baja	Alberto Adriani
7	Baja	Alberto Adriani
8	Baja	Obispo Ramos de Lora
9	Baja	Obispo Ramos de Lora
10	Baja	Caracciolo Parra y Olmedo

III. 2. TOMA DE MUESTRAS

Para la toma de muestra, se consideró la Norma Venezolana COVENIN 938:83

III. 2.1. Selección de los envases para la recolección de las muestras

Los materiales seleccionados para la toma y transporte de las muestras fueron envases de vidrio de 500 mililitros (ml), impermeable a los fluidos, insoluble, no absorbentes, impermeable a las grasas, no influyentes en el olor, color o composición de los productos lácteos, con cierres herméticos y esterilizados en autoclave. De igual forma, se emplearon utensilios auxiliares como cucharones de acero inoxidable, espátulas, tubos y placas de Petri, previamente esterilizados.

III. 2.2. Esterilizado del material

Los envases de vidrio fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 121°C, durante 20 min. y 15 PSI de presión. Los utensilios auxiliares fueron envueltos en papel bond y sometidos a exposición al aire caliente (horno) a una temperatura de 170°C durante una hora.

III. 2.3. Toma de muestra

Las muestras de leche cruda bovina se tomaron del tanque de enfriamiento. Previo a la toma de la muestra, la leche se mezcló homogéneamente, de forma mecánica con un agitador, para proceder inmediatamente recoger la muestra directamente de la llave de salida del tanque, en algunos casos se tomó utilizando un cucharón estéril, hasta completar la medida que ocupaba un volumen aproximado de $\frac{3}{4}$ partes del frasco de 500 ml, de manera de poder agitar bien en el momento del análisis.

III.2.4. Conservación de las muestras

Siguiendo lo establecido en la norma, a las muestras no se le añadió ningún tipo de conservante, manteniéndose a una temperatura de 0 a 5 °C, durante su transporte al laboratorio de prácticas y de preparación de medios de cultivo de la Cátedra de Microbiología Aplicada del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, donde se realizaron los estudios microbiológicos. Los análisis se realizaron en un tiempo inferior a las 24 horas luego de la toma de la muestra.

III. 2.5. Transporte de las muestras

Las muestras se transportaron al laboratorio en un tiempo menor a 24 horas. En el traslado se evito su exposición al sol y se realizo en cavas de anime refrigeradas con hielo seco.

III. 3. IDENTIFICACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la identificación y preparación de las muestras de leche cruda obtenidas se siguió lo expuesto en la norma venezolana COVENIN 1126:89

III. 3.1. Identificación de la muestras

Al tomar cada una de las muestras de leche cruda bovina en los envases estériles, se procedió a la debida identificación anotando la fecha y se le asigno un código. Una vez en el laboratorio cada muestra fue examinada observando las siguientes características:

III.3.1.1.1 Aspecto externo del envase (roto, destapado, cierre no hermético, etc.)

III.3.1.1.2 Aspecto externo del producto.

III.3.1.1.3 Origen de la muestra.

III.3.2. Preparación de la muestra

Tratándose de un alimento liquido de libre fluidez en el recipiente, se procedió a agitar 25 veces haciendo un ángulo de 45° con el brazo, hasta que el contenido estuviese homogéneo.

Con una pipeta estéril se tomaron de cada una de las muestras de leche cruda bovina, un volumen de 10 ml y se transfirió a un frasco estéril contentivo de 90ml

de agua peptonada al 0,1 %. Se agitó la muestra 25 veces con un ángulo de 45° con el brazo, correspondiendo esta a la primera dilución (10^{-1}).

A partir de la primera dilución, se procedió a preparar diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-6} . Se midió 1ml de la dilución 10^{-1} y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 ml del diluyente, se agitó el tubo 25 veces con movimiento del brazo de 45°. Para las siguientes diluciones se procedió de la misma manera hasta alcanzar la dilución 10^{-6} .

III.4. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA HETERÓTROFA AERÓBICA MESÓFILA

Una vez obtenidas las diluciones seriadas de cada una de las muestras analizadas, se procedió según lo indicado en la norma venezolana COVENIN 902:87, la cual establece el método para la determinación cuantitativa de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas mediante la utilización de placas de Petri y medios de cultivos apropiados.

III.4.1. Fundamentos del método

El método empleado fue el de siembra en profundidad que consistió en mezclar un volumen dado de la muestra o dilución respectiva (1 ml) y homogenizarla con un medio de cultivo determinado contenido en placas de Petri. Después del periodo de incubación, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de las bacterias mediante un contador de colonias.

III.4.2. Medios de cultivo

Los agares seleccionados para el recuento de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila fueron: agar Plate Count, agar Eosina Azul de Metileno, agar

para Enterococos, agar Baird Parker, Agar MacConkey, agar *Salmonella-Shigella*, agar Bismuto –Sulfito, agar Verde Brillante y agar Infusión-Cerebro-Corazón.

Los ingredientes se disolvieron en el agua por calentamiento. Ajustando el pH a $7 \pm 0,2$. Seguidamente se distribuyó en matraces y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez enfriado a 45°C , se procedió a distribuir en tubos estériles a razón de 20 ml.

III.4.3. Procedimiento analítico

1. Se procedió a identificar las placas según la dilución y por duplicado
2. En condiciones asépticas se colocó 1 ml de la muestra de leche cruda diluida en la placa de Petri por duplicado.
3. Se añadió a cada placa de Petri entre 15 y 20 ml de agar previamente fundido y templado de 45°C a 50°C mezclado con movimientos circulares sobre el mesón, no dejando transcurrir más de 20 minutos desde el momento de la preparación de las diluciones hasta el agregado del medio.
4. Una vez solidificado el medio, se procedió a invertir las placas y a llevarlas a una temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un tiempo aproximado de 24 a 48 horas.
5. Una vez culminado el periodo de incubación, se seleccionaron las placas cuyas colonias estaban en un número entre 25 y 250, con la ayuda de un cuenta colonia se contaron todas las colonias incluyendo aquellas que se observaron como pequeños puntos, anotando la dilución correspondiente.
6. El número de colonias promedio de las dos placas de la misma dilución se multiplicó por la dilución correspondiente, para obtener el resultado final.
7. Aquellas placas cuyo número de colonias superaban las 300, fueron consideradas incontables.

III.4.4 Expresión de resultados

1. Los resultados se expresaron como recuento estándar por mililitro.

2. El número de colonias obtenido se multiplica por la dilución correspondiente y se expresó como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra de leche (UFC/ml de leche).

III.5. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS COLONIAS BACTERIANAS CRECIDAS

A partir de las placas de Petri con colonias contables, se procedió a seleccionar aquellas colonias que manifestaron características morfológicas fenotípicas distintas, de manera que por cada fenotipo observado se aislaron dos colonias, siendo éstas purificadas en agar TSA, por la técnica de siembra por agotamiento de acuerdo a lo señalado por Ramírez y col. (2006), para su posterior identificación.

III.6. DISCRIMINACIÓN DE LAS COLONIAS BACTERIANAS AISLADAS EN BASE A LA TINCIÓN DE GRAM

III.6.1. Fundamento

En 1884, el físico danés Hans Chistian Gram desarrollo una tinción compuesta, que es probablemente la más importante en la microbiología, sobre la base de esta coloración las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos, las bacterias Gram positivas y las Gram negativas; durante este procedimiento, una vez fijada a muestra al portaobjeto, se añade una solución de violeta de genciana o cristal violeta (colorante primario) que penetra todas las bacterias de la preparación, luego se agrega solución de lugol (mordiente), el yodo entra a la célula y forma un complejo insoluble con la violeta de genciana, posteriormente se procede a la decoloración con una mezcla de alcohol-acetona; las bacterias cuya pared celular es más densa, constituida principalmente por peptidoglicano (Gram positiva) se deshidrata y cierra los poros de la pared impidiendo la salida del complejo violeta de genciana-yodo, por lo tanto, estas bacterias permanecen de

color púrpura; mientras que las bacterias Gram negativa debido a su alto contenido de lípidos, al decolorar quedan poros en la pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana-yodo y al adicionarle el colorante de contraste (safranina) estas toman dicho colorante por lo que se observan de color rosado (Ramírez y col., 2006).

III.6.2. Técnica de coloración de Gram

Una vez extendida la muestra sobre la lámina del portaobjeto, la cual previamente estaba limpia y seca, se procedió de la siguiente manera:

1. Se fijó el extendido por calor pasando el portaobjeto a través de la llama del mechero con un movimiento rápido (3 veces).
2. Se aplicó el colorante primario violeta de genciana, por un minuto.
3. Se lavó con agua corriente.
4. Se aplicó el mordiente, lugol, por un minuto.
5. Se lavó con agua corriente.
6. Se procedió a aplicar el decolorante, alcohol-acetona, durante 10 segundos.
7. Se lavó con agua corriente.
8. Se aplicó el colorante secundario, safranina, por 30 segundos.
9. Se lavó con agua corriente, secando al aire y observando al microscopio.

III.7. IDENTIFICACION FENOTIPICA DE LAS COLONIAS AISLADAS, PURIFICADAS

Una vez clasificadas las bacterias como Gram positiva o Gram negativa, cocos y/o bacilos, se procedió a realizar la prueba de oxidasa y catalasa, permitiendo clasificar en una primera instancia, las bacterias como bacilos o cocos oxidasa negativo u oxidasa positivo (Ramírez y col., 2006).

Posteriormente se realizó la identificación taxonómica de los aislados, por medio de la observación y comprobación de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, de acuerdo con los esquemas de identificación bacteriana señalados por MacFaddin (2003) y siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemas Bacteriology (ICSB) publicadas en el internacional Journal of systematic Bacteriology (Sneath y col, 1986; Holt y col., 1994; Garrity y col., 2005).

III.7.1 Prueba de oxidasa

Esta prueba se basa en la producción bacteriana de una enzima citocromo oxidasa intercelular, la cual transfiere electrones al oxígeno, aceptor final en la cadena transportadora de electrones de ciertos microorganismos, el dihidrocloruro de tetra metil-p-fenilendiamina al 1 % es el colorante utilizado en la prueba y actúa como sustituto del oxígeno, es decir, como aceptor artificial de electrones, en su estado reducido el reactivo es incoloro, en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico, el reactivo es oxidado a azul de indo fenol que es un compuesto coloreado (púrpura) lo cual indica una reacción positiva (Ramírez y col., 2006).

En un papel de filtro colocado sobre una placa de Petri, se procedió a colocar masa bacteriana con un asa de platino, posterior a esto se colocó una gota del reactivo. La lectura e interpretación de la prueba se realizó de acuerdo a lo indicado en la tabla 13.

Tabla 10. Lectura e interpretación de prueba de la oxidasa

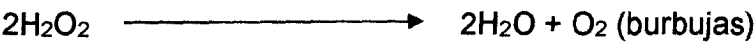
Lectura	Interpretación
Color negro purpúreo=positivo	La bacteria posee la enzima citocromo oxidasa
Incoloro= negativo	La bacteria no posee la enzima citocromo oxidasa.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.2 Prueba de Catalasa

El peróxido de hidrogeno constituye uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los carbohidratos, su acumulación en las células bacterianas puede ser letal para las mismas por lo que su descomposición y eliminación es vital para muchos microorganismos, los cuales producen la enzima catalasa (hemoproteína) que descompone el peróxido de hidrogeno (H2O2) en oxígeno y agua. La liberación de oxígeno se evidencia por la rápida y vigorosa aparición de burbujas lo cual se interpreta como una prueba positiva (Ramírez y col., 2006).

La reacción de descomposición por la enzima catalasa se muestra a continuación:



Para realizar la prueba se colocó masa bacteriana con la ayuda de un asa de platino, posteriormente se agregó una gota de agua oxigenada 10 volúmenes con una pipeta Pasteur, detectando la formación o no de burbujas. La lectura e interpretación de la prueba se realizó de acuerdo a lo indicado en la tabla 14.

Tabla 11. Interpretación de resultados prueba de catalasa.

Lectura	Interpretación
Burbujas (positiva)	El microorganismo posee la enzima catalasa.
Sin Burbuja (negativa)	El microorganismo no posee la enzima catalasa.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3. Identificación de colonias bacterianas Gram negativas

Las colonias bacterianas que resultaron ser Gram negativa, a demás del test de oxidasa y catalasa, se les realizó las pruebas de oxidación y fermentación de la glucosa, así como las sugeridas por los esquemas de identificación de MacFadden (2003), de acuerdo a los procedimientos indicados por Ramírez y col., (2006).

III.7.3.1 Prueba de Hugh y Leifson (O/F)

Esta prueba determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización, lo cual ayuda a la identificación de las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, tales como bacilos Gram negativo no fermentadores y de otros microorganismos (Ramírez y col, 2006).

Las bacterias utilizan los hidratos de carbono por uno de dos procesos metabólicos, fermentativo y el oxidativo, la principal diferencia entre el metabolismo fermentativo y el oxidativo de un hidrato de carbono es el requerimiento de oxígeno atmosférico y la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso anaeróbico que requiere de la fosforilación inicial de la glucosa antes de la degradación a una mezcla de ácidos relativamente fuertes, mientras que la oxidación, en ausencia de compuestos inorgánicos como el nitrato y el sulfato, es un proceso aeróbico estricto que involucra la oxidación directa de una molécula no fosforilada de glucosa (inicialmente). Los productos finales de la fermentación son ácidos relativamente fuertes que pueden ser detectados en un medio convencional como los caldos con rojo fenol, sin embargo, los ácidos formados durante el metabolismo oxidativo de la glucosa son extremadamente débiles para ser detectados por métodos convencionales, por lo que para su detección se hace necesario utilizar otros medios, como el de Hugh y Leifson (O/F) (Ramírez y col., 2006).

Las bacterias, al utilizar el carbohidrato por cualquiera de los dos metabolismos, produce ácido que disminuye el pH del medio por lo cual el indicador (azul de bromotimol) vira de verde a amarillo. La baja proporción de peptona reduce la formación de aminas alcalinas que pudieran neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos débiles formados durante el metabolismo oxidativo. Las grandes cantidades de glucosa permiten la formación de mayor cantidad de ácidos. La consistencia semisólida de agar permite que el ácido producido permanezca concentrado (Ramírez y col., 2006).

La prueba de oxidación/fermentación se realizo de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a. La prueba de O/F se realizó por duplicado en tubos con 10 ml del medio Hugh y Leifson.
- b. La inoculación se realizó con asa en aguja, no llegando a tocar el fondo del tubo.
- c. Luego de la inoculación uno de los tubos fue cubierto con una capa de 1,0 cm de parafina líquida estéril, para así generar las condiciones de anaerobiosis necesarias para el metabolismo fermentativo, el otro tubo se mantuvo sin parafina (aerobiosis).
- d. La incubación fue a 35 °C durante 48 h.
- e. Luego del tiempo de incubación se procedió a la lectura de los resultados de acuerdo a lo indicado en la tabla 15.

Tabla 12. Interpretación de resultados Prueba de Hugh y Leifson (O/F)

Lectura		Interpretación
Tubo sin parafina	Tubo con parafina	
Verde	Amarillo	El microorganismo no es capaz de oxidar pero si fermentar el carbohidrato
Amarillo	Verde	El microorganismo es capaz de oxidar pero no fermentar e carbohidrato
Amarillo	Amarillo	El microorganismo es capaz de oxidar y fermentar el carbohidrato
Verde o azul	Verde	El microorganismo no es capaz de oxidar ni d fermentar el carbohidrato.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.2. Identificación de colonias bacterianas Gram negativas fermentadoras

Las colonias que resultaron ser fermentadoras se les examinó la capacidad de fermentación de la lactosa, producción de acido sulfhídrico, producción de indol,

producción de acetil-metil carbinol, rojo de metilo, utilización de citrato, desaminación de la fenilalanina, reducción de nitratos, producción de gas a partir de la lactosa, hidrólisis de la esculina y crecimiento en agar MacConkey, según lo descrito por Barrow y Feltham (2004), complementadas con las pruebas bioquímicas contenidas en las galerías API 20E (BioMérieux).

III.7.3.2.1. Fermentación de la lactosa, glucosa y producción de H₂S

Esta prueba es utilizada para identificación de bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, tales como enterobacterias y otros bacilos entéricos. El agar Kliger utilizado en esta prueba es un medio diferencial en tubo que cumple un doble propósito, la determinación de la fermentación de hidratos de carbono (glucosa y lactosa) y la determinación de la producción de H₂S, los principios bioquímicos en los que se basa la reacción son los siguientes:

- a. Ausencia de fermentación de lactosa y de la glucosa: dado que el microorganismo no es capaz de utilizar los hidratos de carbono presentes en el medio, depende de la peptona, las cuales son degradadas en forma aeróbica dando lugar a la producción de aminas que aumentan el pH del medio y el indicador rojo de fenol vira a rojo intenso.
- b. Fermentación sólo de glucosa: se produce pequeñas cantidades de ácido, ya que este azúcar está en baja concentración, inicialmente esta pequeña cantidad de ácido será suficiente para que baje el pH del medio y vire el indicador rojo de fenol a amarillo, por lo tanto el bisel y el taco se verán amarillos.
- c. Fermentación de glucosa y lactosa: las bacterias comienzan a utilizar la glucosa presente en el medio, sin embargo, la fermentación continúa ya que el microorganismo es capaz de utilizar la lactosa, como consecuencia se produce grandes cantidades de ácido que los álcalis resultantes de la descarboxilación oxidativa no pueden contrarrestar por lo que el tubo (bisel y taco) será amarillo.
- d. Producción de H₂S: existen dos indicadores para la detección de H₂S que son el tiosulfato de sodio y una sal de hierro como sulfato ferroso o citrato férrico amoniacal y el resultado final es la presencia de un precipitado negro de sulfuro

ferroso (Ramírez y col., 2006).

El procedimiento utilizado para este ensayo fue el siguiente:

1. La inoculación en el medio Kliger se realizó con asa de aguja por punción y estría.
2. Incubación se realizó a 37°C durante 24 horas.
3. Los resultados se leyeron de forma estándar primero el bisel, luego taco y finalmente la producción de gas, en base al cambio del color del agar de amarillo a rojo, producto de la producción de la fermentación del azúcar, y la formación de un precipitado negro para la formación de H₂S.

III.7.3.2.2. Producción de indol

El indol, un benzilpirrol, es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido triptófano, las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amonio. Esta prueba está basada en la formación de un complejo color fucsia cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminabenzaldehído; esta es una sustancia química activa en las soluciones más utilizadas como el reactivo de Kovacs (alcohol amílico + p-dimetilaminabenzaldehído) y el reactivo de Ehrlich (alcohol etílico + p-dimetilaminabenzaldehído) este último es más sensible, se sugiere en anaerobios y bacilos no fermentadores cuya producción de indol es mínima, debe usarse medio rico en triptófano (Ramírez y col., 2006).

Para realizar la prueba se inoculó una asada de la colonia en caldo triptófano contenido en tubos estériles con asa de aro, incubando en condiciones de aerobiosis, luego se precedió a agregar el reactivo de Kovacs que indicó si la reacción resultó positiva o negativa de acuerdo a lo expresado en la tabla 16.

Tabla 13. Lectura e interpretación de resultados prueba de producción de indol.

Lectura	Interpretación
Anillo rojo (fucsia brillante) =Positiva	El microorganismo posee la enzima triptofanasa y degradó el triptófano hasta indol.
No hay desarrollo de color o aparece anillo turbio color amarillo= negativo	El microorganismo no posee la triptofanasa y no degradó el triptófano presente en el medio.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.2.3. Producción de acetil-metil carbinol

Algunas bacterias por ejemplo, *Enterobacter* pueden fermentar la glucosa y producir acetil-metil-carbinol, o acetoína precursor del 2,2-butanodiol, la acetoína puede detectarse en el caldo MR-VP, mediante extracción con α -naftol y subsiguiente oxidación hasta diacetilo debido a la acción del KOH y oxígeno atmosférico (Ramírez y col., 2006).

La acetoína es una molécula que se emplea como almacén natural de energía en las funciones metabólicas de algunas bacterias fermentativas. La acetoína se sintetiza mediante la descarboxilación de la alfa-acetolactato, un precursor común en la biosíntesis de algunos aminoácidos ramificados. Debido a su naturaleza, la producción y excreción de acetoína durante el crecimiento exponencial previene la sobre acidificación del citoplasma, así como del medio envolvente que resulta de la acumulación de productos metabólicos ácidos, como pueden ser los acetatos y los citratos. Una vez que las moléculas de mayor número de carbonos se han extinguido en el metabolismo, y los cultivos han entrado en una fase estacionaria, la acetoína se emplea como alimento capaz de mantener la densidad de cepas

estacionaria (Ramírez y col., 2006).

Para la realización de esta prueba se inocularon contentivos del caldo MR-VP y se incubaron a 37 °C, durante 24 horas. Posteriormente se leyeron los resultados. La aparición de un color rojo brillante, represento una prueba positiva, donde el microorganismo utiliza la glucosa por vía de butilenglicol; por el contrario un color amarillo fue indicativo de una reacción negativa, y el microorganismo no utiliza la glucosa por la vía del butilenglicol. (Ramírez y col., 2006).

III.7.3.2.4. Prueba de rojo metilo

En la degradación fermentativa de la glucosa, la molécula de ácido pirúvico que se forma en la glicólisis, puede ser metabolizada a otros productos por diferentes vías metabólicas según el sistema enzimático que posea la bacteria. Dos de esas vías son, la que conduce a la formación de mezclas de ácidos orgánicos (láctico, fórmico, acético) y la que genera 2,3-butanodiol como producto final, la primera se conoce con el nombre de la vía de los ácidos mixtos y es característica de bacterias como *Escherichia coli* y otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*; mientras que la segunda se denomina vía del 2,3-butanodiol o del butilenglicol y la encontramos en grupo de *Klebsiellas- Enterobacter*. La prueba del rojo de metilo es una prueba cuantitativa basada en el uso de un indicador de pH rojo de metilo, para determinar la concentración de un ion hidrógeno cuando un microorganismo fermenta la glucosa (Ramírez y col., 2006).

El rojo de metilo es un indicador de pH con un rango entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), el pH en el cual el rojo de metilo detecta el ácido es considerablemente inferior que en otros indicadores de pH usados en medios de cultivos microbiológicos, así para producir un cambio de color, el organismo debe producir grandes cantidades de ácido a partir de la glucosa, los microorganismo que utilizan la vía de los ácidos mixtos para el metabolismo fermentativo de la glucosa producen suficientes cantidades de ácido como para mantener el pH del medio por debajo de 4,4, por lo que al adicionar el indicador rojo de metilo se mantendrá de

color rojo (reacción positiva), si por el contrario, el microorganismo que está siendo ensayado no utiliza esta vía, no habrá suficiente ácido para mantener el pH y el indicador rojo de metilo mostrará un color amarillo (reacción negativa) (Ramírez y col., 2006).

La prueba se realizó inoculando tubos de caldo de glucosa, incubando por un tiempo entre 48-72 horas, agregando al final de este tiempo, 5 gotas de reactivo de rojo de metilo, directamente en el caldo. La interpretación de los resultados se realizo de acuerdo a lo indicado en la tabla 17.

Tabla 14. Lectura e interpretación prueba de rojo de metilo

Lectura	Interpretación
Anillo rojo brillante (positivo)	El microorganismo utiliza la glucosa por la vía de los ácidos mixtos y ellos vencen el sistema buffer fosfato y mantienen la acidez del medio.
Anillo amarillo (negativo)	El microorganismo no utiliza la glucosa por la vía de los ácidos mixtos por lo cual los ácidos producidos no vencen el sistema buffer fosfato (pH 6).

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.2.5. Prueba de utilización de citrato de Simons

El citrato de sodio es una sal de ácido cítrico, un compuesto simple que es uno de los metabolitos producidos en el ciclo de Krebs, algunas bacterias pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento; generalmente los medios de cultivo empleados para la prueba de citrato de sodio como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno, las bacterias que pueden utilizar el citrato pueden también utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, lo que resulta en la producción de amoníaco (NH_3^+) y la alcalinización del medio debido a la conversión de NH_3^+ en hidróxido de amonio (NH_4OH), produciéndose un viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul, lo que

indica una reacción positiva, si el microorganismo no utiliza el citrato no se produce cambio en el medio, es decir, permanece verde (Ramírez y col., 2006).

Para realizar esta prueba se tomo una muestra de la colonia a identificar por medio de un asa en aguja, y se procedió a inocular el medio de citrato de Simons, incubándose por 24 horas a 37°C. La interpretación de los resultados se realizo de acuerdo a lo expresado en la tabla 18.

Tabla 15. Lectura e interpretación de resultados prueba de citrato de Simons

Lectura	Interpretación
Verde (Negativo)	La bacteria no utiliza el citrato como fuente de carbono.
Azul o verde con crecimiento (Positivo)	La bacteria utiliza el citrato como fuente de carbono.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.2.6. Desanimación de la fenilalanina

La fenilalanina es un aminoácido que puede ser desaminado de forma oxidativa por algunas bacterias debido a su capacidad para producir la enzima fenilalanina desaminasa con producción de un cetoácido llamado ácido fenilpirúvico, el cual se detecta al añadir una solución de cloruro ferrico al 10 %(FeCl_3) desarrollándose un color verde por la quelación entre ambos compuestos, lo que indica una reacción positiva, mientras que si el microorganismo no es capaz de desaminar el aminoácido el FeCl_3 permanece de su color original (amarillo ocre) (Ramírez y col., 2008).

Se procedió a inocular los cultivos puros, por la técnica de estría, incubando a 37°C por 18 a 24 horas, se agrego directamente el reactivo al tubo rotando el reactivo con suavidad por la cuña del tubo, leyendo los resultados en los siguientes cinco minutos. La lectura e interpretación de los resultados se realizo de

acuerdo a lo expresado en la tabla 19.

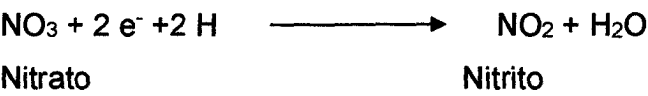
Tabla 16. Lectura e interpretación de resultados de la prueba de desanimación de la fenilalanina.

Lectura	Interpretación
Desarrollo de color verde en la cuña del tubo después de agregar FeCl ₃ (positivo)	El microorganismo produce fenilalanina desaminasa
Sin cambio de color, permanece amarillo debido al color del reactivo (negativa)	El microorganismo no produce fenilalanina desaminasa

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.2.7. Prueba de reducción de nitratos

Los microorganismos reductores del nitrato tienen la capacidad de utilizar este compuesto como aceptor de electrones, la ecuación química de la reducción de nitratos a nitritos es:



La presencia de nitrito en el medio de cultivo es detectada agregando los reactivos α -naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un compuesto de color rojo denominado α -sulfobenconoazo- α -naftilaminico. El desarrollo del color rojo 30 segundo después de haber agregado estos reactivos indica la presencia de nitritos en el medio y constituye un resultado positivo para la reacción de reducción de nitritos, si por el contrario no hay desarrollo de color después de agregar el reactivo, puede haber ocurrido dos cosas: que el nitrato no haya sido reducido a nitrito y en este caso estaríamos en presencia de un resultado negativo, o que el nitrato haya sido reducido a otros compuestos diferentes, tales como amoníaco (NH₃), nitrógeno molecular (N₂), óxido nítrico (NO) u óxido nitroso (N₂O), lo que podría llevarnos a medir esta prueba como falso negativo; es importante entonces

agregar una pequeña cantidad de polvo de zinc a todos los tubo que arrojen resultado negativo, si hay nitrato en el medio, el polvo de zinc lo reducirá a nitritos y se desarrollará el color rojo lo que confirma el resultado negativo, por su parte si hay una reducción de nitrato de nitrógeno molecular observáramos desplazamiento del liquido en el tubo de Durham (Ramírez y col., 2006).

Para realizar esta prueba se siguió el procedimiento donde con la ayuda de una pipeta Pasteur se procedió a inocular el medio, posteriormente se incubó a 35°C por 24 horas, posterior a esto se procedió a agregar los reactivos para confirmar las pruebas. Los resultados se interpretaron de acuerdo a lo expresado en la tabla 20.

Tabla 17. Lectura e interpretación de resultados de la prueba de reducción de nitratos

Lectura	Interpretación
Color rojo al agregar los reactivos, sin cambio al agregar polvo de zinc =positivo	La bacteria posee la enzima nitrato reductasa.
Burbujas en el tubo de Durham= positivo	La bacteria posee la enzima nitrato reductasa y reduce el nitrato hasta N ₂ molecular.
Color rojo al agregar polvo de zinc= negativo	La bacteria no posee la enzima nitrato reductasa.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.2.8. Crecimiento en agar MacConkey

El agar MacConkey es un medio selectivo diferencial, es un medio complejo al que se ha agregado una sustancia nutritiva adicional para hacerlo selectivo, en este caso el agente selectivo son sales biliares (0,15%) y cristal violeta, utilizando como indicador rojo neutro e ingrediente diferencial la lactosa (Ramírez y col., 2006).

El procedimiento que se siguió para realizar esta prueba fue sembrar por estría una muestra de cada una de las colonias aisladas y purificadas. Se incubó a 37 °C durante 24 a 48 horas. Posterior a la incubación se observó el crecimiento en la superficie del agar.

III.7.3.3. Identificación de colonias bacterianas Gram negativas no fermentadoras

Para la identificación de las colonias que resultaron ser no fermentadoras se midió la capacidad de hidrólisis de la esculina, crecimiento a 42° C, producción de pigmentos, producción de ureasa, desnitrificación de nitratos y las pruebas contenidas en las galerías API 20NE (BioMérieux).

III.7.3.3.1. Prueba de bilis-esculina

Las bacterias que resultan positivas a estas pruebas deben ser capaces de desarrollarse en presencia de sales biliares y producir la enzima esculinasa, que produce la hidrólisis de la esculina dando como resultado la formación de glucosa y un compuesto denominado esculetina, el que a su vez reacciona con los iones férricos (aportados por el citrato férrico), para formar un complejo fenólico férrico de color castaño oscuro o negro que se difunde, lo cual se interpreta como una reacción positiva, mientras que si el microorganismo no produce la enzima esculinasa, no se produce alteración del medio (Ramírez y col., 2006).

Para la realización del ensayo a partir de las colonias aisladas se hicieron siembras por estrías en la superficie del agar esculina. Se incubó a 30 °C durante 24 a 48 horas. Se consideró positiva la prueba cuando, por desdoblamiento de la esculina en glucosa y esculetina, apareció una coloración parda oscura, debido a la reacción del hierro con la esculetina (Barrow y Feltham, 2004). La lectura e interpretación de los resultados se realizaron de acuerdo a lo señalado en la tabla

21

Tabla 18.lectura e interpretación de la prueba de bilis-esculina

Lectura	Interpretación
Color castaño oscuro a negro= positivo	El microorganismo crece en presencia de bilis y posee la enzima esculinasa
Sin cambio= negativo	El microorganismo no posee la enzima esculinasa.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.3.3.2. Producción de pigmentos

Los pigmentos pueden dividirse en dos tipos básico: los solubles en aguas y los insolubles. Si un pigmento es insoluble en agua, como es el caso de la mayoría de las bacterias cromogénicas, dicho pigmentos no difundirá fuera del microorganismo, en consecuencia las colonias serán pigmentadas pero el agar mantendrá su color original, en este caso hablamos de un pigmento no difusible; si por el contrario el pigmento es soluble en agua (*Pseudomonas aeruginosa*) el mismo difundirá fuera del microorganismo y tanto las colonias como él serán pigmentados, en este caso hablamos de exopigmentación (Ramírez y col., 2006).

Para la realización de esta prueba se sembró por estría sobre la superficie de los medios agar King A y B, cada una de las colonias a ser identificadas. Se incubó a 30 °C durante 24 horas. La presencia de pigmento verde fluorescente (fluoresceína) se observó en el agar King B y el pigmento azul (piocianina) en el agar King A (Barrow y Feltham, 2004).

III.7.3.3.3. Crecimiento a 42 °C

Para realizar esta prueba se sembró la colonia bacteriana en caldo nutritivo. Se incubó a 42° C durante 48 horas. Se observó la presencia o ausencia de

crecimiento (Barrow y Feltham, 2004).

III.7.3.3.4. Producción de ureasa

Se sembraron las colonias aisladas por estría en tubo de agar urea de Christensen. Se incubaron a 30° C durante 24 horas. La presencia de ureasa se evidencio por la presencia de un color rojo cereza. Se consideró negativa al ocurrir un cambio de color a amarillo debido a la producción de sustancias ácidas a partir de la glucosa (Barrow y Feltham, 2004).

III.7.3.3.5. Desnitrificación de nitratos

Se realizó de igual forma que los nitratos, indicado en el apartado III.7.3.2.7., empleando el mismo medio pero introduciendo en los tubos una campana de Durham para observar la formación de gas, nitrógeno o amoníaco. Se incubó a 30° C de 2 a 7 días (Barrow y Feltham, 2004).

III.7.4. Identificación de los cocos Gram positivos

Las colonias bacterianas que resultaron ser cocos Gram positivos, a demás del test de oxidasa y catalasa, se les realizó las pruebas de hemólisis, hidrólisis del hipurato, bilis-esculina, coagulasa, fermentación del manitol, crecimiento en presencia de NaCl al 6,5 %, así como otras sugeridas por los esquemas de identificación de MacFadden (2003), de acuerdo a los procedimientos indicados por Ramírez y col., (2006) y Barrow y Feltham, (2004).

III.7.4.1. Crecimiento en agar sangre

Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes. Para esta prueba se utilizo agar sangre. Cada una de las colonias a identificar se sembró por agotamiento en estría en

placas de agar sangre incubándose a 37 °C, durante 24 a 48 horas. Al observar un halo de color verde alrededor de la zona de siembra se considero como hemólisis alfa y cuando se evidencio un halo trasparente alrededor de la colonia, como hemólisis beta (Ramírez y col., 2006)

III.7.4.2. Hidrólisis del hipurato

El hipurato es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato y glicina. Para realizar esta prueba se sembró una suspensión de cada una de las colonias aisladas en una solución de hipurato y se incubo por 2 horas a 37 °C. Finalizada la incubación se le añadió dos gotas del reactivo de nihidrina. Se considero como reacción positiva cuando aparece un color púrpura producto de la reacción de la glicina producida enzimáticamente con la nihidrina. La reacción es negativa cuando no hay cambio de color (Barrow y Feltham, 2004).

III.7.4.3. Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una enzima que posee actividad similar a la de la protrombina y es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina lo cual resulta de la formación de un coágulo visible a simple vista, la enzima presente en los microorganismos puede encontrarse de dos maneras diferentes, la forma libre y la ligada, teniendo cada una de ellas propiedades diferentes por lo que su detección requiere de distintos procedimientos, la coagulasa ligada se detecta por el método del portaobjeto esta enzima está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivo, cuando las células bacterianas son resuspendidas en una porción de plasma, las fibrillas de fibrina que se forman entre las células provoca la aglutinación de las mismas lo que resulta en la aparición de agregados visibles a simple vista, la coagulasa libre está presente en los filtrados de cultivos y se detecta por el método del tubo de ensayo. Para esta prueba se tomo un tubo de hemólisis contentivo de 2 ml de plasma citratado al cual se le añadió una

suspensión del cultivo bacteriano a identificar (Ramírez y col, 2008). Se incubó por dos horas a 37 °C, después de la incubación se observó la formación de un coágulo y se interpretó de acuerdo a lo indicado en la tabla 22.

Tabla 19. Lectura e interpretación de resultados en la prueba de coagulasa

Lectura	Interpretación
Malla o Coágulo (positivo)	El microorganismo posee enzima coagulasa.
Sin malla o coágulo (negativo)	El microorganismo no posee la enzima coagulasa.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.4.4. Crecimiento en agar manitol salado

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Para realizar esta prueba se sembró por agotamiento en el agar manitol salado cada una de las colonias bacterianas objeto de la Identificación. Se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Los estafilococos coagulasa positiva que fermentaron el manitol se visualizaron como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. Los estafilococos que no fermentaron el manitol, se visualizaron como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura (Ramírez y col, 2008).

III.7.4.5. Prueba PYR

Prueba rápida y simple utilizada fundamentalmente para la identificación de *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus spp.* Permite la caracterización preliminar de *Streptococcus*, *Enterococcus* y de microorganismos similares *Estreptococos*. La prueba del “PYR” permite la identificación presuntiva de ciertas bacterias en base a la actividad enzimática l-pirrolidonilarilamidasa (PYRasa). Los microorganismos que contienen esta enzima hidrolizan en forma rápida el sustrato presente en los discos y liberan un grupo pirrólico que reacciona con el reactivo cinamaldehído originándose un compuesto de color rosado-rojizo.

A partir de un cultivo puro en agar sangre del microorganismo en estudio, del cual se ha identificado que son cocos Gram positivos catalasa negativa, se hizo una suspensión en 50 µl de solución fisiológica estéril, y agregó un disco de PYR-A-Enterococos, la incubación se realizó en aerobiosis, a 35-37 °C durante 30 minutos. Cuando se utiliza para diferenciar *Staphylococcus*, la incubación se realizó, en aerobiosis, a 35-37 °C durante 2 horas. Se agregó dos gotas de reactivo cinamaldehído y se dejó a temperatura ambiente hasta 5 minutos. Se observó el color desarrollado: Positivo: presencia de actividad enzimática pirrolidonilarilamidasa: disco color rosado a rojo. negativo: ausencia de actividad enzimática pirrolidonilarilamidasa: disco y/o solución color amarillo o incoloro (Macfaddin, 2003).

III.7.4.6. Prueba de crecimiento en presencia de NaCl al 6,5 %

Esta prueba permite determinar la resistencia de las bacterias a l sal, consiste en añadir NaCl al 6,5 % a un caldo de infusión de cerebro corazón desarrollándose, enturbando el caldo de cultivo y algunas veces cambiando el color del indicador de púrpura de bromocresol presente en el medio de cultivo. La prueba se realizó sobre placas de agar que contengan la misma concentración de sal y con el mismo indicador, se incubó las cepas de *Streptococcus* sobre la superficie del medio, se incubó en 36% de CO₂ (jarra con vela) por 24 -48 horas. La prueba fue

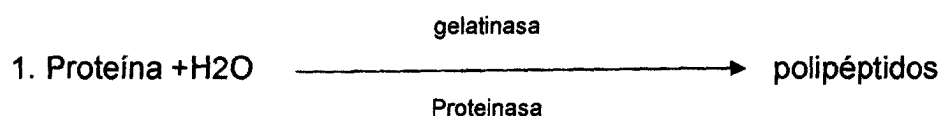
positiva cuando el crecimiento fué visible sobre la superficie del agar. Si no hay crecimiento después de 48 –72 horas, la prueba se consideró NEGATIVA (Carvajal, 2011).

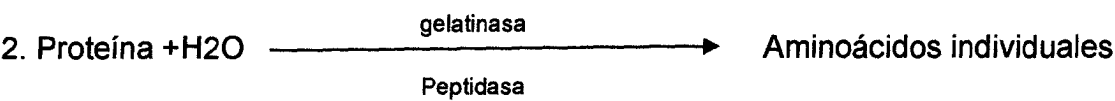
III.7.5. Identificación de bacilos Gram positivos

En el caso de los bacilos Gram positivos se realizaron observaciones microscópicas para determinar la presencia y localización de esporas, las pruebas de hidrólisis del almidón y gelatina, así como las pruebas bioquímicas contenidas en las galerías API 50 CH (BioMérieux). Para los bacilos irregulares además de las observaciones microscópicas se utilizó las pruebas bioquímicas contenidas en las galerías API Coryne (BioMérieux).

III.7.5.1. Pruebas de hidrólisis de la gelatina

La gelatina, una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteínasa) detectadas por digestión y licuefacción de la gelatina. A estas enzimas se les denominan gelatinasa y a menudo son importantes factores de virulencia en algunos microorganismos. El catabolismo de las proteínas por parte de la gelatinasa es un proceso de dos pasos; el resultado final es una mezcla de aminoácidos aislados:





La gelatina es hidrolizada por la gelatinaza en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes, básicamente hay cinco métodos para su detección, uno de los más utilizados es el medio gelatina nutriente en placa, en este medio si el microorganismo ha producido la enzima, se va a observar una precipitación de color blanco representando una reacción positiva (Ramírez y col., 2006).

Para la realización de esta prueba se procedió a inocular en placas de agar gelatina, colonias aisladas, de manera de observar mejor la reacción positiva, incubando a temperatura de 37 °C por 48 horas. La lectura e interpretación de los resultados se realizo según lo indicado en la tabla 23 (Ramírez y col., 2006).

Tabla 20. Interpretación de resultados prueba de hidrólisis de la gelatina

Lectura	Interpretación
Turbidez en la zona del desarrollo (Licuefacción positiva)	El microorganismo sintetiza la gelatinaza
Ningún cambio en el medio (reacción negativa)	El microorganismo no sintetiza la gelatinaza.

Fuente: Ramírez y col., 2006.

III.7.6. Sistemas miniaturizados API®

Según la información suministrada por el manual Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux. 2010, los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismo a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios

microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la gelatina, entre otras.

En el mercado existe una variedad de galerías para ser utilizados en la identificación de diferentes tipos de microorganismos, por ello aunque todos estos sistemas tienen el mismo fundamento, difieren en el número y tipo de pruebas que permiten realizar, ya que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar.

III.7.6.1. API® 20E

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram negativo. Es una galería conformada por 20 microtúbulos.

Cada microtubos del sistema se incubó con una suspensión de solución salina al 0,85% a partir de un cultivo puro de microorganismo, en algunos casos estos tubos se llenaron completamente con la suspensión, mientras que en otros casos se requirió de añadir parafina líquida estéril, para proporcionar condiciones de anaerobiosis. Para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada microtubos se siguieron las especificaciones indicadas en el manual instructivo del fabricante (Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux, 2010)

III.7.6.2. API® 20NE

Permite la identificación de bacilos gran negativo no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como por ejemplo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*; *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros.

Cada microtubos del sistema se incubó con una suspensión de solución salina al 0,85% a partir de un cultivo puro de microorganismo, en algunos casos estos tubos se llenaron completamente con la suspensión, mientras que en otros casos se requirió de añadir parafina líquida estéril, para proporcionar condiciones de anaerobiosis. Para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada microtubos se siguieron las especificaciones indicadas en el manual instructivo del fabricante (Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux, 2010)

III.7.6.3. API® STAPH

Este sistema permite la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*.

Cada microtubos del sistema se incubó con una suspensión de solución salina al 0,85% a partir de un cultivo puro de microorganismo, en algunos casos estos tubos se llenaron completamente con la suspensión, mientras que en otros casos se requirió de añadir parafina líquida estéril, para proporcionar condiciones de anaerobiosis. Para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada microtubos se siguieron las especificaciones indicadas en el manual instructivo del fabricante (Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux, 2010)

III.7.6.4. API® CORYNE

Utilizado para la identificación de especies del grupo *Corynebacterium*.

Cada microtubos del sistema se incubó con una suspensión de solución salina al 0,85% a partir de un cultivo puro de microorganismo, en algunos casos estos tubos se llenaron completamente con la suspensión, mientras que en otros casos se requirió de añadir parafina líquida estéril, para proporcionar condiciones de anaerobiosis. Para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación

de cada microtubos se siguieron las especificaciones indicadas en el manual instructivo del fabricante (Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux, 2010)

III.7.6.5. API® 50 CHL

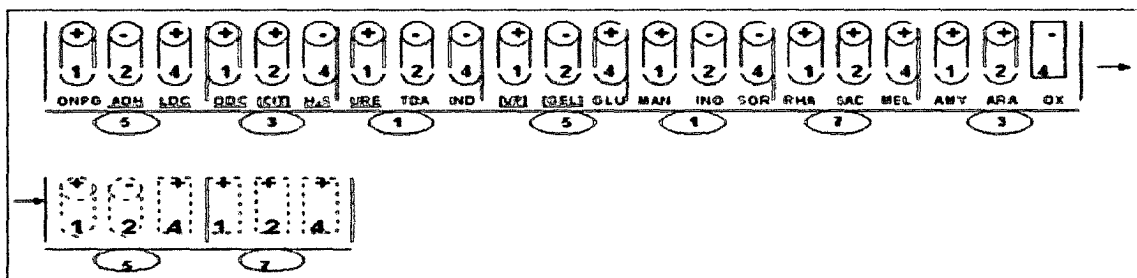
Utilizado para la identificación de Lactobacilos, esta galería comprende 50 microtubos.

Cada microtubos del sistema se incubó con una suspensión de solución salina al 0,85% a partir de un cultivo puro de microorganismo, en algunos casos estos tubos se llenaron completamente con la suspensión, mientras que en otros casos se requirió de añadir parafina líquida estéril, para proporcionar condiciones de anaerobiosis. Para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada microtubos se siguieron las especificaciones indicadas en el manual instructivo del fabricante (Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux, 2010)

III.7.6.6. Lectura e interpretación de los resultados obtenidos en los sistemas API®

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionó con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollaron en las mismas coloraciones que se aparecieron en forma espontánea o luego del agregado de algún reactivo para su revelación.

La interpretación de los resultados se basó en la observación de las coloraciones desarrolladas, esto se llevó a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el mostrado en la carta de colores, de acuerdo a esta interpretación se establecieron los resultados positivo (+) o negativo (-).

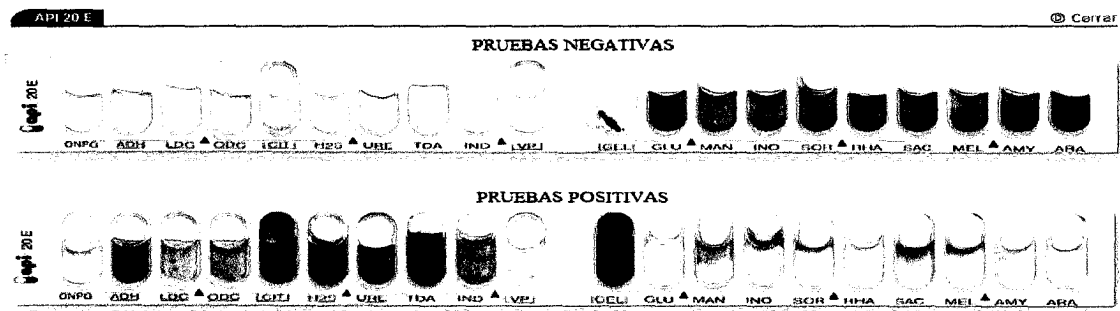


Fuente: Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux.2010.

Figura 6. Esquema del sistema miniaturizado API®20E

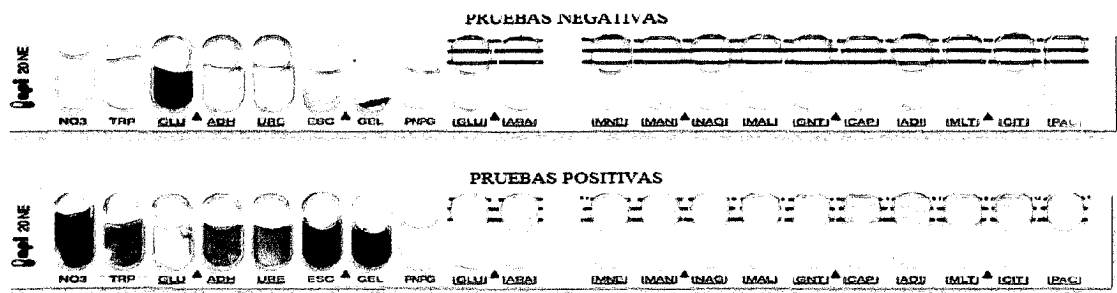
Después del periodo de incubación y comparación de la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo se colocaron en la hoja de cálculo que suministra el fabricante, los datos así obtenidos se transformaron en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resultado de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignadas previamente a la planilla, este código obtenido correspondió a la determinación del género o especie de acuerdo a la información contenida en la base de datos suministrada por el fabricante electrónicamente.

A continuación se presentan algunos ejemplos de lectura e interpretación de resultados de pruebas miniaturizadas API®



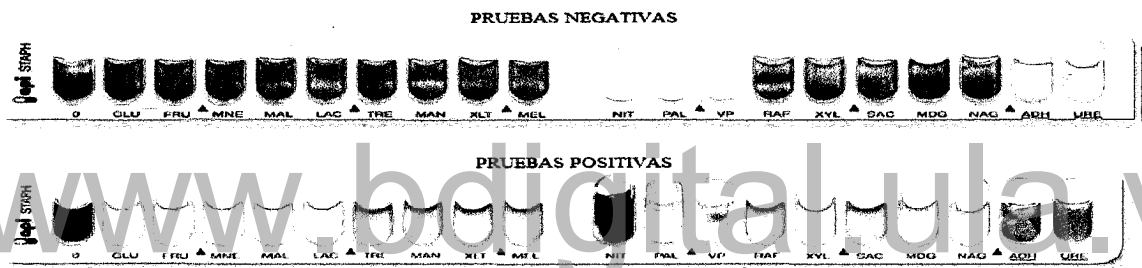
Fuente: Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux.2010.

Figura 7. Lectura e interpretación API® 20E



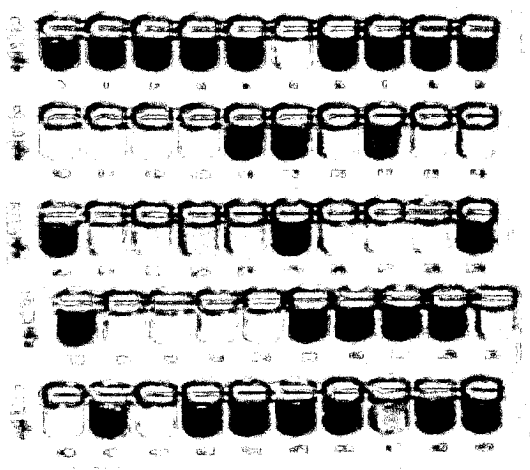
Fuente: Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux.2010.

Figura 8. Lectura e interpretación API® 20NE



Fuente: Apiweb® [CD-ROM] Biomérieux.2010.

Figura 9. Lectura e interpretación API® STAPH



Fuente: Api web® [CD-ROM] Biomérieux.2010.

Figura 10. Lectura e interpretación API® CHL

III.8. DETERMINACIÓN DEL INDICE DE BIODIVERSIDAD BACTERIANA DE CADA ZONA GANADERA ESTUDIADA DEL ESTADO MÉRIDA.

La diversidad microbiana en cada una de las zonas ganaderas estudiadas se calculó a través de la riqueza específica de especies(S) y el índice de Shannon (H), de acuerdo a lo indicado por Krebs (1994) y Moreno (2001)

III.9. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS VALORES OBTENIDOS

A los valores numéricos obtenidos en la cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas se les sacó un promedio por finca. A todos los resultados se les realizó un análisis de varianza ANOVA de una sola vía con test de Newman Keuls. Se asumió significancia estadística si el valor de $p < 0,05$. Utilizando el Programa Stargratics Centurium XV.

CAPITULO IV. RESULTADOS

IV.1. CUANTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA HETERÓTROFA AERÓBICA MESÓFILA VIABLE

En la tabla 21 y figura 11 se presentan los valores promedios de las unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/ml), obtenidos en la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viables presente en las muestras de leche cruda bovina, procedentes de la zona alta del Estado Mérida, tanto en épocas de invierno como de verano.

Se puede apreciar que los mismos estuvieron comprendidos entre valores promedios de $1,7 \times 10^5$ UFC/ml y $2,4 \times 10^5$ UFC/ml, observándose los valores más altos en los meses de invierno.

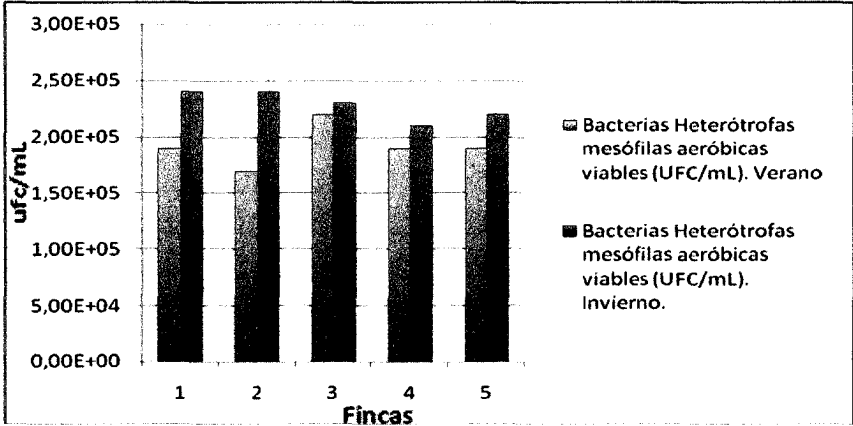
En la tabla 22 y figura 12, se presentan los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en la leche cruda bovina procedente de la zona baja del estado en épocas de verano como de invierno.

Se puede indicar que los mismos fluctuaron con valores promedios entre $2,1 \times 10^5$ UFC/ml y $2,4 \times 10^6$ UFC/ml, correspondiendo los mayores valores a los meses de verano.

Tabla 21. Valores promedios de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica viable mesófila presente en leche cruda bovina procedentes de la zona alta del estado Mérida en época de verano e invierno.

Fincas	Bacterias Heterótrofas mesófilas aeróbicas viables (Valores promedios en UFC/ml).	Bacterias Heterótrofas mesófilas aeróbicas viables (Valores promedios en UFC/ml).
	Verano	Invierno.
1	1,9x10 ⁵	2,4x10 ⁵
2	1,7 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵
3	2,2x10 ⁵	2,3x10 ⁵
4	1,9x10 ⁵	2,1x10 ⁵
5	1,9x10 ⁵	2,2x10 ⁵

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro



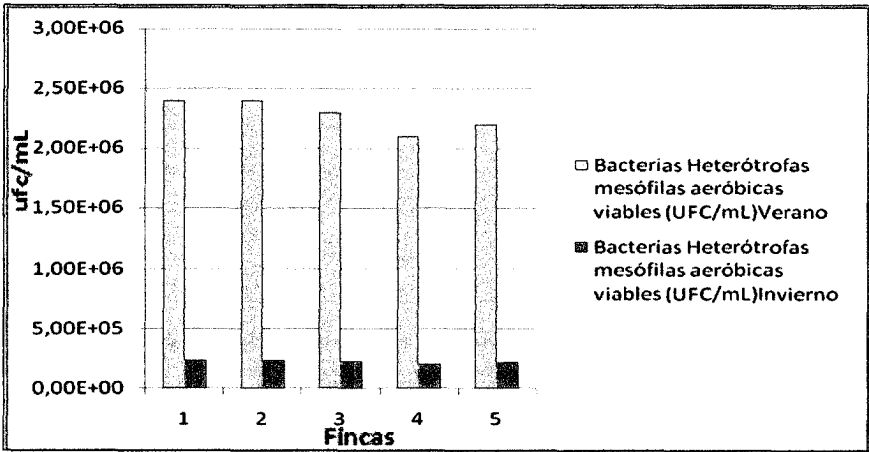
UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

Figura. 11. Valores promedios de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en leche cruda bovina procedentes de la zona alta del estado Mérida en época de verano e invierno.

Tabla 22. Valores promedios de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en leche cruda bovina procedentes de la zona baja del estado Mérida en época de verano e invierno.

Fincas	Bacterias heterótrofas mesófilas aeróbicas viables (Valores promedios de UFC/ml)	Bacterias heterótrofas mesófilas aeróbicas viables (Valores promedios de UFC/ml)
	Verano	Invierno
1	2,4x10 ⁶	2,4x10 ⁵
2	2,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁵
3	2,3x10 ⁶	2,3x10 ⁵
4	2,1x10 ⁶	2,1x10 ⁵
5	2,2x10 ⁶	2,2x10 ⁵

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro



UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

Figura 12. Valores promedios de la Microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable presente en leche cruda bovina procedentes de la zona baja del estado Mérida en época de verano e invierno.

IV.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS BACTERIANAS

Se logró aislar y purificar un total de 400 colonias bacterianas. Los resultados se resumen en la tabla 23 y figura 13.

Del análisis de los datos se puede establecer que se obtuvo una mayor frecuencia de aislamiento de colonias bacterianas Gram positivas que bacterias Gram negativas. Además que las colonias bacterianas Gram positivas prevalecieron en las muestras provenientes de la zona alta y las Gram negativas en las muestras provenientes de la zona baja del Estado Mérida (Tabla 23 y figura 13).

De igual forma, la frecuencia de aislamiento de colonias de bacterias Gram positivas fue mayor en la época de invierno que en la época de verano, tanto en las muestras provenientes de las zonas altas, como de las obtenidas de las zonas bajas del estado Mérida, mientras que la situación fue diferente para las colonias bacterianas Gram negativas, las cuales prevalecieron en la época de verano en ambas zonas de estudio (Tabla 23 y figura 13).

De acuerdo a los resultados que se indican en la tabla 23, en la zona alta para la época de invierno, del total de cepas bacterianas Gram negativas aisladas, se detectó la presencia de 17 cepas de bacterias Gram negativas fermentadoras que representan un 4,24% del total de las muestras analizadas. En la misma zona en época de verano se obtuvo un total de 25 cepas de bacterias Gram negativas fermentadoras, lo cual equivale a 6,25% del total. En esta zona no hubo presencia de bacterias Gram negativas no fermentadoras en ninguna de las dos épocas del año analizadas.

Por su parte, en la zona baja se detectaron 31 colonias de bacterias Gram negativas fermentadoras en la época de invierno, y 78 colonias bacterianas en la época de verano, equivalentes al 9,5% y 19,5%, respectivamente del total aislado. En esta zona la frecuencia de aislamiento de bacterias Gram negativa no

fermentadoras fue muy baja, lográndose aislar en la época de invierno solo 1 colonia bacterianas (0,25%) y en la época de verano 4 (1%) colonias bacterianas.

Tabla. 23. Tipos de bacteria heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona alta y baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano.

Tipos de bacteria	Zona alta		Zona baja		Total
	invierno	verano	invierno	verano	
	N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)	
Bacilos Gram Negativo					
Fermentadores	17(4,24)	25(6,25)	38(9,5)	78(19,5)	158(39,5)
No fermentadores	0	0	1(0,25)	4(1)	5(1,25)
Bacterias Gram positiva					
Cocos Gram positivo	69(17,25)	63(15,75)	31(7,75)	37(9,25)	200(50)
Bacilos Gram positivo	14(3,5)	12(3)	11(2,75)	0	37(9,25)
TOTAL	100	100	81	119	400

N°=Número de cepas aisladas, % = Porcentaje presente.

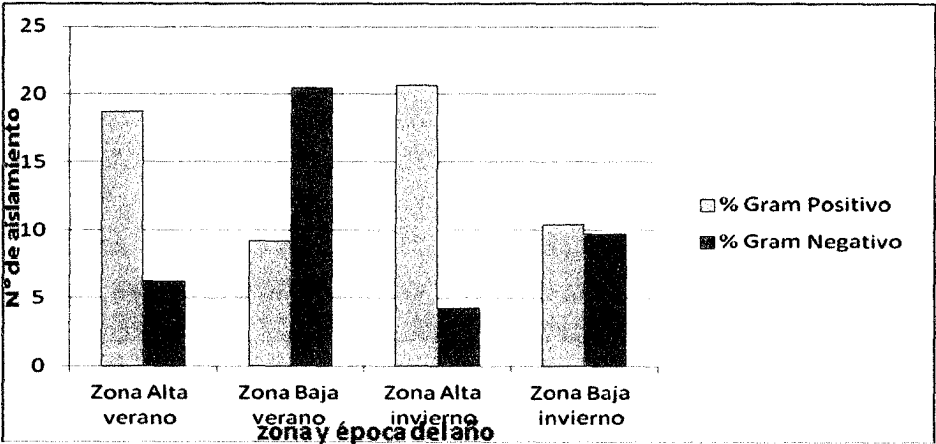


Figura 13. Tipos de bacteria heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona alta y baja del Estado Mérida. Venezuela.

Los resultados obtenidos en la identificación bacteriana a nivel de género, luego de la aplicación de las diferentes pruebas bioquímicas y fisiológicas a cada una de las colonias aisladas y purificadas, se resumen en las tablas 24 y 25 y las figuras 14 y 15.

En lo que respecta a las muestras de leche cruda provenientes de fincas ubicadas en la zona alta del estado Mérida, se observa el predominio en las cepas identificadas, de bacterias Gram positivas del genero *Staphylococcus*, tanto en la época de invierno como la de verano. De igual forma, destacan dentro de las colonias bacterianas identificadas para la zona alta, los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Enterococcus* y *Bacillus* (Tabla 24 y figura 14).

En el caso de las muestras de leche cruda procedentes de la zona baja del Estado Mérida, prevalece de igual forma que para la zona alta, las cepas bacterianas del genero *Staphylococcus*, seguido de los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* y *Bacillus* (Tabla 25 y figura 15).

En la tabla 24, se muestran las colonias bacterianas identificadas a nivel de especie, provenientes de las muestras analizadas de la zona alta del estado Mérida, tanto en la época de invierno como en la de verano.

Al observar los resultados resumidos se puede indicar que las especies bacterianas predominantes en la zona alta del Estado Mérida, tanto en la época de invierno como la de verano, fueron *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Destaca también en la zona alta, tanto en la época de invierno como de verano, la presencia de colonias bacterianas de las especies *Streptococcus bovis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes*.

Tabla 24. Géneros de bacteria heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en épocas de invierno y verano (% de géneros).

Tipos de bacteria	Zona Alta	
	Invierno	Verano
	Nº (%)	Nº (%)
Bacilos Gram Negativos	14 (4,50)	24 (6,00)
Fermentadores		
Enterobacter	9 (3,25)	18 (4,50)
Proteus	2 (0,50)	3 (0,75)
Citrobacter	1 (0,25)	3 (0,75)
Serratias	2 (0,50)	0
No fermentadores	0	0
Bacterias Gram positiva	83 (20,75)	63 (18,75)
Cocos Gram positivo		
Staphylococcus	49 (12,25)	51(12,75)
Enterococcus	10 (2,50)	7 (1,75)
Micrococcus	6 (1,50)	3 (0,75)
Lactococcus	4 (1,00)	2 (0,50)
Bacilos Gram positivo		
Lactobacillus	1 (0,25)	2 (0,50)
Bacillus	8 (2,00)	6 (1,50)
Corynebacterium	5 (1,25)	4 (1,00)
Total	101 (25,25)	99 (24,75)

Nº= Número de cepas aisladas % = Porcentaje presente.

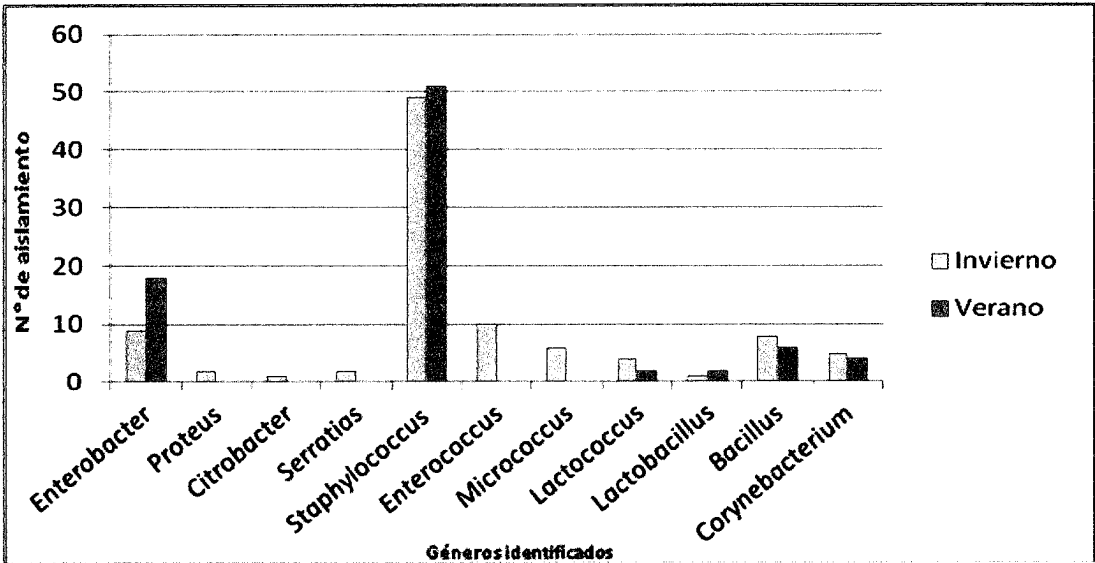


Figura 14. Géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aislados en leche cruda bovinas en época de invierno y verano de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela (N° de géneros).

Tabla 25. Géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de géneros).

Tipos de bacteria	Zona Baja	
	Invierno	Verano
	N° (%)	N° (%)
Bacilos Gram Negativos	39 (9,75)	76 (20,50)
Fermentadores		
Enterobacter	17 (4,25)	27 (6,75)
Escherichia	9 (2,25)	13 (3,25)
Proteus	7 (1,75)	16 (4,00)
Citrobacter	1 (0,25)	4 (1,00)
Serratia	2 (0,50)	6 (1,50)
Klebsiella	2 (0,50)	7 (1,75)
Aeromonas		5 (1,25)

No fermentadores		
<i>Pseudomonas</i>	1 (0,25)	2 (0,50)
<i>Acinetobacter</i>	0	2 (0,50)
Bacterias Gram positiva		
	42 (10,50)	37 (9,25)
Cocos Gram positivo		
<i>Staphylococcus</i>	25 (6,25)	24 (6,00)
<i>Streptococcus</i>	2 (0,50)	7 (1,75)
<i>Enterococcus</i>	3 (0,75)	5 (1,25)
<i>Leuconoctoc</i>	1 (0,25)	1 (0,25)
Bacilos Gram positivo		
<i>Bacillus</i>	11 (2,75)	0
Total	81 (20,25)	119 (29,75)

N°= Número de cepas aisladas. % = Porcentaje presente

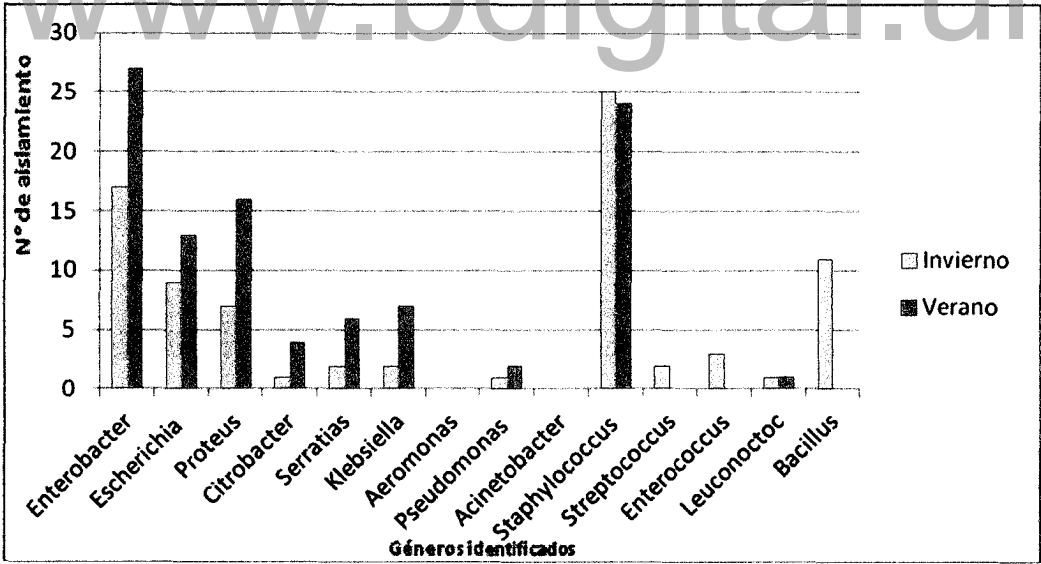


Figura 15. Géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela, durante la épocas de invierno y verano (N°de géneros).

En la tabla 26 se indican las especies bacterianas Gram negativas, identificadas presentes en la zona alta del Estado Mérida, tanto en la época de verano, como la de invierno.

Asi mismo se observa en la tabla 27 as especies Gram positivas identificadas presentes en la zona alta del estado Mérida en épocas de verano e invierno.

Al observar los resultados se puede señalar que las especies bacterianas identificadas con mayor frecuencia en la zona alta del estado Mérida fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*, tanto en la época de invierno como de verano.

Tabla 26. Especies de bacterias Gram negativas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies).

www.bdigital.ula.ve

Tipos de bacteria	Zona Alta	
	Invierno N° (%)	Verano N° (%)
Bacilos Gram Negativos	18 (4,50)	24 (6,00)
Fermentadores		
Enterobacter		
E. aerogenes	6 (1,50)	4 (1,00)
E. cloacae	4 (1,00)	2 (0,50)
Escherichia coli	3 (0,75)	12 (3,00)
Proteus		
P. mirabilis	2 (0,50)	3 (0,75)
Citrobacter		
C. freundii	1 (0,25)	3 (0,75)
Serratia		
S. marcescens	2 (0,50)	0
No fermentadores	0	0

N° = Número de cepas aisladas. %= Porcentaje presente.

Tabla 27. Especies de bacterias Gram positivas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies).

Tipos de bacteria	Zona Alta	
	Invierno N° (%)	Verano N° (%)
Bacterias Gram positiva	83 (17,25)	75 (18,25)
Cocos Gram positivo		
Staphylococcus		
<i>S. aureus</i>	23 (5,75)	27 (6,75)
<i>S. epidermidis</i>	9 (2,25)	12 (3,00)
<i>S. haemolyticus</i>	2 (0,50)	3 (0,75)
<i>S. hyicus</i>	2 (0,50)	0
<i>S. intermudius</i>	1 (0,25)	0
Streptococcus		
<i>S. bovis</i>	12 (3,00)	9 (2,25)
Enterococcus		
<i>E. faecium</i>	4 (1,00)	2 (0,50)
<i>E. faecalis</i>	6 (1,50)	5 (1,25)
Micrococcus		
<i>M. luteus</i>	6 (1,50)	3 (0,75)
Lactococcus		
<i>L. lactis</i>	4 (1,00)	2 (0,50)
Bacilos Gram positivo		
Lactobacillus		
<i>L. acidophilus</i>	1 (0,25)	2 (0,50)
Bacillus		
<i>B. cereus</i>	2 (0,50)	4 (1,00)
<i>B. subtilis</i>	6 (1,50)	2 (0,50)
Corynebacterium		
<i>C. bovis</i>	3 (0,75)	3 (0,75)
<i>C. glutamicum</i>	2 (0,50)	1 (0,25)

N°= Número de cepas aisladas. %= Porcentaje presente.

De igual forma, destacan en la zona baja la identificación de las especies de bacterias Gram negativas *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus mirabilis* (Tabla 28). Así como el predominio de la presencia de *S. aureus* en las especies de bacterias heterótrofas aerobias mesofilas Gram positivo aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida.

Tabla 28. Especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas Gram negativas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies).

Tipos de bacteria	Zona	Baja
	Invierno N° (%)	Verano N° (%)
Bacilos Gram Negativos	39 (9,25)	72 (19,50)
Fermentadores		
Enterobacter		
E. aerogenes	8 (2,00)	12 (3,00)
E. cloacae	5 (1,25)	9 (2,25)
E. sakazakii	2 (0,50)	4 (1,00)
E. agglomerans	2 (0,50)	2 (0,50)
Escherichia		
E. coli	9 (2,25)	13 (3,25)
Proteus		
P. mirabilis	5 (1,25)	8 (2,00)
P. vulgaris	2 (0,5%)	8 (2,00)
Citrobacter		
C. freundii	1 (0,25)	4 (1,00)
Serratias		
S. ficaria	1 (0,25)	4 (1,00)
S. marcescens	1 (0,25)	2 (0,50)
Klebsiella		
K. oxytoca	2 (0,50)	6 (1,50)
K. pneumoniae	0	1 (0,25)
Aeromonas		
A. hydrophila	0	5 (1,25)
No fermentadores		
Pseudomonas		

<i>P. aeruginosa</i>	1 (0,25)	2 (0,50)
<i>Acinetobacter</i>		
<i>Ac. Baumannii</i>	0	2 (0,50)

Nº= Número de cepas aisladas. %= Porcentaje presente.

Tabla 29. Especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas Gram positivas aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano (% de especies).

Tipos de bacteria	Zona Invierno Nº (%)	Baja Verano Nº (%)
Bacterias Gram positiva		
Cocos Gram positivo		
<i>Staphylococcus</i>		
<i>S. aureus</i>	12 (3,00)	15 (3,75)
<i>S. epidermidis</i>	13 (3,25)	9 (2,25)
<i>Streptococcus</i>		
<i>S. bovis</i>	2 (0,50)	3 (0,75)
<i>S. mitis</i>	0	3 (0,75)
<i>S. equinus</i>	0	1 (0,25)
<i>Enterococcus</i>		
<i>E. faecium</i>	1 (0,25)	3 (0,75)
<i>E. faecalis</i>	2 (0,50)	1 (0,25)
<i>E. solitarius</i>	0	1 (0,25)
<i>Leuconoctoc</i>		
<i>L. mesenteroides</i>	1 (0,25)	1 (0,25)
Bacilos Gram positivo		
<i>Bacillus</i>		
<i>B. cereus</i>	3 (0,75)	0
<i>B. subtilis</i>	8 (2,00)	0

Nº= Número de cepas aisladas. %= Porcentaje presente.

IV.3. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE BIODIVERSIDAD BACTERIANA

La diversidad bacteriana en la leche cruda bovina obtenida de fincas, en cada una de las zonas ganaderas del estado Mérida estudiadas, se calculó a través de la riqueza específica de especies (S) y el Índice de Shannon (H) (Krebs, 1994; Moreno, 2001).

Definiendo la riqueza de especies bacterianas mediante la ecuación:

Riqueza de especies (d)

$$d = \frac{S - 1}{\text{Log } N}$$

*Donde S = número de especies
N = número de individuos*

Los resultados de la riqueza de especies bacterianas se resumen en la tabla 33.

Al observar los resultados de la tabla 30 se puede observar una mayor riqueza de especies bacterianas en la zona baja (d = 10,8) que la correspondiente a la zona alta (D = 8,70).

Tabla 30. Determinación del Índice de riqueza de especies bacterianas para la leche cruda bovina de las zonas altas y bajas del estado Mérida.

Zona	S	N	d
Alta	21	200	8,70
Baja	26	200	10,8

S = Numero de especies bacterianas. N = Numero de individuos d = Índice de riqueza de especies

Otro de los índices utilizados para estudiar la biodiversidad bacteriana fue el índice de Shannon-Weaver, definiendo dicho índice mediante la ecuación:

Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H)

$$\bar{H} = \frac{C}{N} (N \log N - \sum ni \cdot \log ni)$$

Donde C = 2,3
N = número de individuos
ni = número de individuos de la especie

$$H = - \sum (Pi \cdot \log pi)$$

Donde

$$Pi = \frac{ni}{N}$$

Se logró determinar los índices de Shannon para la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila presente en las zonas alta y baja del estado Mérida. Los resultados de estas determinaciones se resumen en la tabla 31.

Al observar los resultados de la tabla 31, podemos indicar que el índice de Shannon fue mayor para la zona baja (1,1832), indicando nuevamente, al igual que la riqueza de especies, que la biodiversidad de la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila fue mayor en la zona baja del Estado Mérida.

Tabla 31. Valores obtenidos en el índice de Shannon para la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila presente en la leche cruda de origen bovino producida en las zonas altas y bajas del Estado Mérida para la diversidad de especies de acuerdo al Índice de Shannon.

Índice de Shannon	H
Zona Alta	0,8096
Zona Baja	1,1832

IV.4. Tratamiento estadístico de los valores obtenidos en la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila presente en las muestras de leche cruda bovina procedentes de las zonas altas y de las zonas bajas del Estado Mérida.

En las tablas 32, 33, 34 y 35 se presentan los resultados del análisis estadístico obtenido en la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila para cada una de las zonas estudiadas y en dos épocas diferentes del año.

El análisis estadístico de los valores obtenidos en la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila indican que los menores valores se obtuvieron para la zona alta en la época de verano, y en el caso de la zona baja no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos en la época de invierno como de verano, siendo en ambos casos mayores que los observados en la zona alta.

Los resultados estadísticos correspondientes a la varianza y la desviación estándar, señalan una gran variabilidad de los datos para cada una de las fincas estudiadas, lo cual se acentúa en la época de verano para las dos zonas bajo estudio, aunque es significativamente mayor en la zona alta.

Los valores observados en los resultados obtenidos al valorar el error estándar sugieren un error aleatorio bajo en la mayoría de las determinaciones realizadas.

Tabla 32. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona alta del Estado Mérida en época de verano.

Microbiota heterótrofa aeróbica mesófila viables								
Zona alta verano	Fincas	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo	Rango
	1	172800	1,02E+10	1,01	0,45	14000	250000	236000
	2	170000	5,50E+08	0,23	0,1	150000	210000	60000
	3	222000	5,70E+08	0,24	0,11	200000	260000	60000
	4	198000	1,97E+09	0,44	0,2	150000	270000	120000
	5	192500	1,56E+09	0,39	0,2	160000	250000	90000

Tabla 33. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona alta del Estado Mérida en época de invierno.

Microbiota heterótrofa aeróbica mesófila viables								
Zona alta invierno	Fincas	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo	Rango
	1	242000	1,37E+09	0,37	0,17	190000	280000	90000
	2	240000	2,80E+09	0,53	0,24	180000	290000	110000
	3	234000	1,68E+09	0,41	0,18	190000	270000	80000
	4	190000	4,20E+09	0,65	0,29	130000	270000	140000
	5	230000	5,07E+09	0,71	0,36	150000	290000	14

Tabla 34. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona baja del Estado Mérida en época de verano.

Microbiota heterótrofa aeróbica mesófila viables								
Zona baja verano	Fincas	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo	Rango
	1	2,42E+06	1,37E+11	0,37	0,17	1,90E+06	2,80E+06	900000
	2	2,40E+06	2,80E+11	0,53	0,24	1,80E+06	2,90E+06	1,10E+06
	3	2,34E+06	1,68E+11	0,41	0,18	1,90E+06	2,70E+06	800000
	4	2,12E+06	4,42E+11	0,66	0,3	1,30E+06	2,70E+06	1,40E+06
	5	2,30E+06	5,07E+11	0,71	0,36	1,50E+06	2,90E+06	1,40E+06

Tabla 35. Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viable en la zona baja del Estado Mérida en época de invierno.

Microbiota heterótrofa aeróbica mesófila viables								
Zona baja invierno	Fincas	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo	Rango
	1	242000	1,37E+09	0,37	0,17	190000	280000	90000
	2	240000	2,80E+09	0,53	0,24	180000	290000	110000
	3	234000	1,68E+09	0,41	0,18	190000	270000	80000
	4	212000	4,42E+09	0,66	0,3	130000	270000	140000
	5	230000	5,07E+09	0,71	0,36	150000	290000	140000

IV.5. Características de las especies bacterianas heterótrofa aeróbica mesófila presente en la leche cruda de origen bovino proveniente de fincas de las zonas altas y bajas del Estado Mérida, que pudiesen ser establecidos como atributos diferenciadores.

En la tabla 36 y 37, se presenta los diferentes géneros y especies bacterianas aisladas de las zonas alta y bajas del estado Mérida y sus características, se muestran aquellas cepas causantes de deterioro y las potenciales patógenos. De igual forma, se muestran las bacterias que pueden presentar interés en la industria láctea y en la producción de alimentos.

Al observar los datos de las tablas 36 y 37 se puede señalar que en las muestras analizadas prevalecen las cepas bacterianas alterantes y/o patógenas. De igual forma, también se presentan una variedad de cepas bacterianas con posibles aplicaciones industriales y biotecnológicas.

Tabla 36. Géneros y especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda producida en la zona alta del estado Mérida en época de invierno y verano, y su importancia.

Género	Especie	Patógeno /deteriorante	Interés industrial
Zona alta			
Enterobacter	E. aerogenes	✓	
	E. cloacae	✓	
Escherichia	E. coli	✓	
Proteus	P. mirabilis	✓	
Citrobacter	C. freundii	✓	
Serratia	S. marcescens	✓	
Staphylococcus	S. aureus	✓	
	S. epidermidis	✓	
	S. haemolyticus	✓	
	S. hyicus	✓	
	S. intermudius	✓	
Streptococcus	S. bovis	✓	✓
Enterococcus	E. faecium	✓	✓
	E. faecalis	✓	
Micrococcus	M. luteus	✓	
Lactococcus	L. lactis		✓
Lactobacillus	L. acidophilus		✓

Bacillus	<i>B. cereus</i>	✓
	<i>B. subtilis</i>	✓
Corynebacterium	<i>C. bovis</i>	✓
	<i>C. glutamicum</i>	✓

Tabla 37. Géneros y especies de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda producida en la zona baja del estado Mérida en época de invierno y verano, y su importancia.

Género	Especie	Patógeno /deteriorante	Interés industrial
Enterobacter	<i>E. aerogenes</i>	✓	
	<i>E. cloacae</i>	✓	
	<i>E. sakazakii</i>	✓	
	<i>E. agglomerans</i>	✓	
Escherichia	<i>E. coli</i>	✓	
Proteus	<i>P. mirabilis</i>	✓	
	<i>P. vulgaris</i>	✓	

Citrobacter	<i>C. freundii</i>	✓
Serratia	<i>S. ficaria</i>	✓
	<i>S. marcescens</i>	✓
Klebsiella	<i>K. oxytoca</i>	✓
	<i>K. pneumoniae</i>	✓
Aeromonas	<i>A. hydrophila</i>	✓
Pseudomonas	<i>P. aeruginosa</i>	✓
Acinetobacter	<i>Ac. baumannii</i>	✓
Staphylococcus	<i>S. aureus</i>	✓
	<i>S. epidermidis</i>	✓
Streptococcus	<i>S. bovis</i>	✓
	<i>S. mitis</i>	✓
	<i>S. equinus</i>	✓
Enterococcus	<i>E. faecium</i>	✓
	<i>E. faecalis</i>	✓

	<i>E. solitarius</i>	✓
<i>Leuconoctoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>	✓
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	✓
	<i>B. subtilis</i>	✓

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V. DISCUSIÓN

La información detallada sobre la población de bacterias y microorganismos autóctonos y alotocnos presente en la leche cruda bovina de una zona geográfica determinada, es escasa. Los trabajos realizados hasta la fecha en la mayoría de países, se relacionan mas con la cuantificación de los grupos bacterianos y microbianos considerados como indicadores de calidad sanitaria, así como con la detección de microorganismos patógenos presentes en la leche cruda (Jayarao y col., 2001; Jayarao y col., 2006; Straley y col., 2006; Bhattarai y Prasad, 2010; D'Amico y Donnelly, 2010; Gillespie y col., 2012; Pant y col., 2013; Soliman, 2013).

Sin embargo, desde el año 2007 la comunidad científica internacional ha venido desarrollando estudios tendientes a conocer la microbiota autóctona de diversos ecosistemas, incluyendo el cuerpo humano, así como de los principales alimentos, entre ellos el agua, la leche y los productos lácteos, de manera de poder entender la biología, dinámica e importancia de estos organismos dentro de cada uno de estos ecosistema (Peterson y col., 2009; Rudi y col., 2009; Elsas y Boersma, 2011; Fricker y col., 2011; Solt y col., 2011; Casanovas-Massana y Blanch, 2012; Neviani y col., 2013; Soggiu y col., 2013).

Un ejemplo de estos trabajos lo constituye el proyecto Biotracer de la Comunidad Económica europea realizados por 24 países en el área de la calidad y seguridad alimentaria, iniciado en el año 2007, donde una de las investigaciones estuvo dirigida a conocer la población microbiana natural característica de la leche cruda producida en tres países de la Comunidad Económica Europea (Fricker y col., 2011).

En Venezuela, al igual que el resto de países, los estudios sobre la microbiología de la leche cruda bovina se han enfocado en la determinación de la calidad sanitaria y la presencia de bacterias patógenas (Boscan y col., 1990; Sánchez y col., 1996a; Sánchez y col., 1996b; Román y col., 2003; Palma y col., 2007; Briñez y col., 2008; Signorini y col., 2008; Guillen y Guerrero, 2009; Lugo y col., 2010), desconociéndose la composición de la microbiota de la leche cruda producida en las principales regiones ganaderas del país.

El estudio de la microbiota autóctona presente en la leche cruda bovina permite determinar por un lado, el grado de contaminación que puede tener una leche y la presencia de microorganismos patógenos, así como la fuente de donde provienen, aspectos estos relacionados con la salud pública de los posibles consumidores de estos productos y de los derivados lácteos elaborados con los mismos. Por otro lado, nos da información sobre la presencia de microorganismos alterante de la leche y sus derivados, y también de la presencia de microorganismos que pueden tener un uso industrial en la fabricación de subproductos lácteos como el queso, la crema de leche y la mantequilla, y que pudieran ser los responsables de sabores y aromas característicos de estos alimentos.

Conocer la microbiota asociada de un producto alimenticio producido en una región geográfica, también tiene una repercusión económica y comercial. No solo porque indica la calidad sanitaria y por ende su valor en el mercado, si no porque permite obtener la denominación de origen, criterio esté de mucha importancia en los últimos años para la comercialización del producto y sus derivados, como lo es el caso de la leche cruda y de los quesos madurados elaborados a partir de ella (Esquerre, 2008; Urbina y Álvarez, 2012).

En el presente trabajo se realizó la cuantificación del número de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas presentes en la leche cruda de origen bovino

producida en dos zonas pecuarias del Estado Mérida, la zona alta y la zona baja, durante dos épocas del año, la época de invierno y la época de verano.

En relación de la cuantificación de la microbiota heterótrofa aeróbica mesófila, en la zona alta durante la época de verano, se puede indicar que se encontró una media de $1,9 \times 10^5$ UFC/ml, y en la época de invierno, un valor promedio de $2,2 \times 10^5$ UFC/ml. Dicho conteo no presentó diferencias significativas entre las dos épocas del año en lo que respecta a la zona alta. Esto pudiera indicar que la temperatura no varía significativamente en esta zona, y por ello no tiene una influencia en el crecimiento microbiano.

La calidad integral de la leche adquiere gran importancia en función a dos aspectos fundamentales como son la salud pública y su aptitud industrial, necesitando obviamente, de todos los sectores involucrados en la producción primaria, conservación, transporte, almacenamiento y transformación, es imprescindible partir de animales sanos, genéticamente aptos, apropiadas condiciones de alimentación y manejo, buenas prácticas de higiene, control y tratamiento de mastitis y otras patologías, con el objetivo de asegurar al consumidor productos inocuos, íntegros y legítimos (Calderón y col., 2006).

La cuantificación del número de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas en la zona baja en época de verano correspondió, en promedio, a $2,3 \times 10^6$ UFC/ml, y en la época de invierno presentó una media de $2,3 \times 10^5$ UFC/ml, lo que señala que en esta zona la temperatura de la época del año, sí tiene una influencia en cuanto al crecimiento microbiano, en el sentido de favorecer el crecimiento.

Diversos factores afectan la composición microbiológica de la leche, dentro de estos factores se incluyen el ambiente (clima, temperatura, humedad), estado de lactancia, genética y nutrición (Matthews y col., 1992), la variación en la composición de la leche, obedece igualmente a factores como la rutina de aseo y desinfección e higiene ambiental al momento del ordeño. Es así como el aire, por

ejemplo, puede transportar bacterias del suelo en donde se pueden encontrar excrementos contaminados con cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, restos de alimentos, desechos vegetales, entre otros. Por otro lado, si el animal no está limpio es común encontrar en él diversas partículas contaminantes, incluyendo una gran diversidad de microorganismos (Gibson 1991).

La disminución de la cantidad bacteriana en la época de invierno pudiera también indicar que las prácticas higiénicas de los ordeñadores para esta época mejoran, dada la necesidad de la limpieza de la ubre del animal al momento del ordeño, resultando como consecuencia una disminución del crecimiento bacteriano. De igual manera, se puede destacar el efecto dilutor en el tanque de almacenamiento.

Calderón y col. (2008) señalan que se puede atribuir el alto conteo de bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila viables, en la leche cruda bovina, a las malas condiciones higiénicas del establo, los sitios de ordeño, la falta de higiene en las manos de los operarios y la falta de implementación de prácticas higiénicas previo al ordeño.

Lizarazu y col. (2005), por su parte aseguran que en cierto modo, las estaciones lluviosas constituyen un factor predisponente para la proliferación y transmisión de patógenos.

Atlas y Bartha (2005) afirman que los cambios de la población microbiana pueden ocurrir como respuesta a condiciones ambientales globales, como lo son: cambios estacionales, intensidad de luz, temperatura y lluvia, lo cual estaría en concordancia con lo observado en la zona baja del estado Mérida, no así en lo que respecta a la zona alta.

Al comparara los valores obtenidos en la cuantificación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, con los obtenidos por Román y col. (2003) donde los valores promedios estuvieron por encima de 10^7 UFC/ml, se tiene que las

muestras analizadas en el presente trabajo presentan valores muy inferiores, tanto en la zona alta como en la baja.

De la misma manera, Revelli y col. (2004) analizaron muestras de leche cruda de la zona noreste de Santa Fe y sur de Santiago en Argentina, obteniendo una media en el recuento de bacterias aerobias mesófilas de 10^5 UFC/ml, similar a lo obtenido por Cepero y col. (2005) en leches de la zona de Santa Clara, Cuba, quienes obtuvieron promedios entre $2,0$ y $3,0 \times 10^5$ UFC/ml, lo cual concuerda con los valores promedios obtenidos en las zonas altas y bajas del Estado Mérida.

Dávila y col. en un estudio realizado en el 2006, en muestras de leche en Zulia, Venezuela, señalan recuentos de $1,5 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^6$ UFC/ml, resultados comparables con los obtenidos en la zona baja del Estado Mérida.

Recientemente en estudios realizados por Luigi y col. en el año 2013, en muestras de leche cruda bovina procedentes de fincas ubicadas en el Estado Carabobo, Venezuela, donde se analizaron un total de 40 muestras de leche, se indica que en el 72,9% de las muestras estudiadas se obtuvieron recuentos de bacterias aerobias mesófilas con valores mayores a $>5,0 \times 10^6$ UFC/ml, valores similares a los encontrados en el presente trabajo para ambas zonas de estudio.

En lo que respecta al Estado Mérida, Sánchez y col. (1996), evaluaron la calidad microbiológica de la leche producida en las zonas altas del Estado Mérida, donde el promedio en el conteo de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas fue de 1×10^4 a $1,2 \times 10^{13}$ UFC/ml, demostrando que la calidad sanitaria de la leche de la zona es deficiente.

Desde el punto de vista microbiológico, la determinación de las bacterias heterótrofas aerobias mesófilas, puede revelar la presencia de grupos de microorganismos patógenos los cuales provee información importante sobre la fuente y el tipo de contaminación presente (Silva y col., 2004).

Un recuento alto de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas puede deberse a la contaminación bacteriana con residuos de leche que han quedado en la superficies de los implementos usados en la obtención y almacenamiento de la leche, a ubres sucias o no higienizadas previos al ordeño y la no refrigeración rápida de la leche (Calderón y col., 2006; Jarayao y col. 2004).

Molineri y col. (2009) afirman que un recuento alto de bacterias heterótrofas mesófilas aerobias no es indicativo de una fuente de contaminación específica.

En base a los datos obtenidos hay que destacar que todos los sectores que intervienen en cualquier área de los alimentos, productores e industriales, se deben concientizar de que los productos derivados nunca serán de mejor calidad que la materia prima de la que proceden; de igual manera lo consideran algunos autores en sus publicaciones (Prieto y col., 2008; Luigi y col., 20013).

Una vez cuantificadas la microbiota heterótrofa aeróbica mesófila presente se procedió al aislamiento y la identificación de las cepas bacterianas crecidas, encontrándose que los cocos Gram positivo predominaron de manera general en ambas zonas, con un 50% de prevalencia en las muestra analizadas, mientras que los bacilos Gram negativo se detectaron en 9,25 % del total de las muestras analizadas. Esta relación se encuentra dentro de los estándares considerados habituales, de bacterias aisladas de muestras de leche cruda de origen bovino (Robinson, 1987).

Los géneros aislados con mayor frecuencia fueron *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, y en un menor número, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Lactococcus*.

Dado que el *S. aureus* fue la especie encontrada en mayor número, es importante destacar que la misma es el principal agente etiológico en la producción de

mastitis bovina en Venezuela, y además, agente causal de numerosas intoxicaciones alimentarias en el país.

En el aislamiento e identificación de géneros y especies Gram positiva presentes en muestras de leche cruda en Venezuela, el predominio de *Staphylococcus* frente a los demás géneros es frecuente, este microorganismo puede crecer en los canales de los pezones e infectar a la glándula mamaria, colonizando generalmente a la ubre (Farías y col., 2002; Demo y col., 1999).

Álvarez y col. (2012) llegaron a la conclusión que la leche de tanque es muy propensa a sufrir contaminación, ya que inicialmente la piel del pezón es el principal reservorio de *S. aureus*, lo que favorece su presencia en leche.

En este aspecto es importante destacar que el método de ordeño favorece o no la contaminación de la leche, ya que si se considera un ordeño manual la vaca y la calidad sanitaria de la leche, queda expuestas a las consideraciones del ordeñador, mientras que en el ordeño mecánico se tiene la ventaja, que si el equipo reúne las condiciones mínimas necesarias y trabaja con la eficiencia adecuada la extracción de la leche por este método disminuye la probabilidad de contaminación microbiana; tal como lo afirma Ávila y col, (2001).

Las principales especies de *Staphylococcus* aisladas en la zona alta del Estado Mérida fueron: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. intermedium* y *S. hycus*; sin embargo en la zona baja del Estado Mérida la presencia del género *Staphylococcus* se encontró representada solo por los géneros *S. aureus* y *S. epidermidis*.

En un estudio realizado por Faria y col. (2005) demuestran que de 200 muestras analizadas se aislaron 44 cepas de *Staphylococcus* donde 34,1 % se identificaron como *S. aureus*, 27,3% *S. haemolyticus*, 13,6 % *S. intermedium*, 9,1% *S. schleiferr*, 6,8 % *S. hycus*; 4,6 % *S. epidermidis*.

La presencia de estas especies de *Staphylococcus* en las muestras provenientes de las zona alta pueden estar asociadas con ubres infectadas y no solo por el resultado de los contaminantes externos (Contrino, 2001).

Se ha demostrado que las cepas de *Staphylococcus* producen con mayor frecuencia toxinas y poseen alta resistencia a los antibióticos, por lo que la presencia de *Staphylococcus* en leche y productos lácteos junto a la resistencia térmica de la toxina, podrían contribuir a un incremento de los casos de intoxicación alimentaria (Farias y col., 2005).

Una de las enfermedades altamente prevalente en el ganado lechero es la mastitis pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a los productores de leche en el mundo (Rabello y col., 2005); debido a la disminución en el rendimiento de la leche para la industria láctea y aumento del número de tratamientos clínicos y aumento del desecho temprano de vacas (Correa y col, 2002).

La calidad del ordeño y el control apropiado de los agentes etiológicos de la mastitis son factores determinantes en la rentabilidad de la industria lechera, sin embargo la presencia del *S. aureus* y los principal agente etiológico de la mastitis, son uno de los problemas más importantes hoy en día en la industria láctea (Bedolla y col., 2008; Martínez y col., 2000).

Streptococcus, ocupan el segundo lugar de prevalencia como agente etiológico de mastitis, según Boscan y col. (1992), así como *S. bovis*, ha sido aislado del tracto gastrointestinal de vaca y rumiantes, y también ha sido encontrado en heces humanas; lo que significa que la presencia de esta bacteria en la leche analizada podría corresponder a una baja calidad higiénico sanitaria de la misma, posible explicación para la detección de este grupo bacteriano en las muestras analizadas en la presente investigación; donde se aisló la especie *S. bovis* en la zona alta , y las especies *S. bovis*, *S. mitis* y *S. equinus*, en la zona baja.

La leche puede contaminarse con microorganismos procedentes de personas que se encuentran en el período de incubación de una infección estreptocócica, así como de convalecientes y de portadores asintomáticos. En algunos casos, las personas que diseminan el microorganismo infectan al ganado lechero provocando en él mastitis subclínicas o clínicas que determinan el paso a la leche de gran número de estreptococos; su presencia son una causa corriente de mastitis en los países templados, pero su acción patógena para el hombre es poco acusada y sólo proliferan en tejidos muy susceptibles, como son los del útero después del parto y los del recién nacido (Margariño, 2000).

Enterococcus fue otro de los géneros aislados en el presente estudio. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, asociada a los alimentos, ambiente y como constituyentes de la microbiota intestinal humana y animal. Este microorganismo juega un papel fundamental en la maduración y el desarrollo del aroma de los productos fermentados, como por ejemplo los quesos.

Por otra parte, en los últimos años se ha descrito que *E. faecium* es una especie comensal habitual en la microbiota de la leche (Cardenas y col., 2012; Contreras y col. 1995).

Según Franz y col. (2003) *Enterococcus* están asociados con los quesos tradicionales europeos fabricados en los países mediterráneos a partir de leche cruda o pasteurizada, y la fuente de los *Enterococcus* en la leche y el queso provienen de las heces de las vacas lecheras y del agua contaminada, de equipos de ordeño y de tanques de almacenamiento. Forman parte de las bacterias ácido láctico de importancia en los alimentos, generalmente intervienen en los procesos de maduración y en el desarrollo del aroma de ciertos quesos y embutidos tradicionales, especialmente los producidos en la zona mediterránea. Los *Enterococcus* son también utilizados como probióticos humanos.

La presencia de *Enterococcus spp.* en leche puede provenir de una contaminación fecal directa o indirecta. Esta situación se puede explicar de distintas maneras, por un lado se relaciona con el ambiente del cual se obtiene este producto puesto que el ganado vacuno, por lo general mantiene una relación estrecha con otros animales de granja como gallinas, perros, caballos y cerdos. Así, estos rumiantes adquieren distintas especies de *Enterococcus spp.* que pueden llegar a encontrarse en la leche. Por otro lado, la leche también podría contaminarse directamente con materia fecal de cualquier animal de granja e incluso del ser humano. Otro mecanismo para justificar la presencia de estas bacterias en la leche se relaciona con la limpieza del equipo de ordeño y con la pureza del agua que se utiliza para el proceso (Araya y col., 2005).

En las muestras analizadas se observó la presencia de *Enterococcus* de las especies: *E. faecium* y *E. faecalis*, para la zona alta, y *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. solitarius* para las muestras de la zona baja de Estado Mérida. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Araya y col. (2005), donde se aislaron cepas de *Enterococcus spp.* de muestras de leche cruda del área metropolitana de Costa Rica, prevaleciendo *E. faecalis*, tal y como se observó en las muestras analizadas en la presente investigación, Esto concuerda con lo observado en la naturaleza, ya que esta especie es sumamente ubicua y se puede aislar de fuentes diversas como agua, animales domésticos, animales de granja y seres humanos.

Por su parte, *Micrococcus*, otro de los géneros bacterianos aislados e identificados en el presente estudio, forman parte de la microbiota normal de la leche cruda las cuales además se caracterizan por no ser patógenas (Farías y col., 2002). Solo en las muestras analizadas de la zona alta del Estado Mérida, se encontró presencia de cepas de *Micrococcus luteus*, en un porcentaje de 1,5 % para la época de invierno y 0,75% para la época de verano.

Los micrococos son muy abundantes en la naturaleza, aislándose frecuentemente del polvo y del agua. A menudo se encuentra en utensilios y equipos usados en ordeño que no han sido adecuadamente limpiados e higienizados.

La fermentación láctica puede ser causada por microbios homófermentativos heterófermentativos, en el primer caso se produce casi exclusivamente ácido láctico junto con otros ácidos (acético), y en el segundo caso se produce ácido láctico junto con cantidades apreciables de otros ácidos y productos volátiles, entre los microorganismos causantes de este deterioro se encuentran los *Micrococcus*, así como de la producción de proteólisis y causa de viscosidad en leche (Mangariños, 2000).

Por su parte, la presencia de *Bacillus*, otra de las bacterias detectadas en leche cruda analizada, implica problemas con la higiene de los establos o sitios de estancia del animal. Esta bacteria se encuentra distribuida en la naturaleza y puede llegar alojarse en la leche por diversos medios, sin embargo, la presencia de *B. cereus* en leche reviste gran importancia desde el punto de vista de la producción láctea, ya que producen proteasas extracelulares y fosfolipasa que suelen causar deterioro, así como la producción de toxinas y esporas termorresistente (Robinson, 1987).

En las muestras analizadas se encontró la presencia de las especies *B. cereus* y *B. subtilis* en las muestras provenientes de la zona alta, en épocas de invierno y verano, mientras que en las zona baja solo la presencia de estas especies se encontró en época de invierno.

La mayoría de las especies del genero *Bacillus* son saprófitos, distribuidos principalmente en suelos, agua y material de origen animal y vegetal. También se encuentra en amplia variedad de alimentos, por lo que constituye un importante porcentaje de la microbiota presente en leche cruda, y puede producir deterioro en estas y sus producto, debido a su actividad proteolítica, lipolítica y sacarolítica

Especies como *B. cereus* han sido asociadas a alteraciones como el sabor, aroma y fermentación de leche (Christiansson y col., 1999; Tatzel y col., 1994; Kalogridou y col., 1992).

En referencia a los subgrupos dentro de los bacilos Gram negativos, se puede señalar que los bacilos Gram negativo fermentadoras prevalecieron entre las cepas aisladas e identificadas en ambas zonas, con un promedio de frecuencia de aislamiento 39,5% de las muestras, mientras que los bacilos Gram negativos no fermentadores solo tuvieron una frecuencia de aislamiento de 1,25% en las muestras, predominando este grupo en la zona baja.

Estudio confirma que las bacterias Gram negativas predominantes en leche cruda pertenecen a los géneros. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Cytophaga*, *Aeromonas* y la familia de las *Enterobacteriaceae* (Bermúdez y col., 2011).

Se debe destacar que en las muestras analizadas se aislaron e identificaron varios miembros de la familia de bacterias *Enterobacteriaceae*, como los géneros: *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*, representando una población de fondo o microbiota de alteración importante, la cual a pesar de estar presentes en bajo conteaje podría enmascarar o dificultar el crecimiento y aislamiento de otros patógenos, tales como *Salmonella*, *Shigella* o *Aeromonas*, ya que estos microorganismos pueden influir en el crecimiento característico de un patógeno en un alimento, debido principalmente a la producción de metabolitos antimicrobianos por parte de la microbiota que puede propiciar la competencia por la utilización de los nutrientes (Román y col., 2003; Revelli y col., 2004; Luigi y col., 2013).

La leche cruda se contamina frecuentemente por Coliformes, derivadas directa e indirectamente del tracto gastrointestinal de las vacas, esta contaminación puede provenir del estiércol, polvo , suelo, alimento del ganado, animales que se pueden encontrar en el área de cría y ordeño (gallinas, perros, gatos, caballos), insectos

(mosca) o el contacto con residuos que se pueden encontrar en los equipos de ordeño y tanques de almacenamiento, mal lavados y saneados donde estas bacterias pueden desarrollarse con facilidad, por lo que la presencia de Coliformes en leche cruda es considerada una condición normal; no obstante altas cuentas de estos microorganismos son indicativas de condiciones insanas de producción, transporte y almacenamiento, originando alteraciones en las características físico-químicas y organolépticas de las mismas (Revelli y col., 2004).

Se aprecia que los principales aislamientos de Gram negativo corresponden al grupo de los coliformes, quedando los bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa en un menor porcentaje (Rivero y col, 1994); según Robinson y col (1987), esta relación se encuentra normalmente entre los bacilos Gram negativos en leche cruda sin antibiótico.

En estudios realizados en cuanto a conteo de Coliformes totales, en su mayoría las muestras de leche presentan recuentos que superan los límites establecidos por la norma, y valores de Coliformes fecales por encima de lo estipulado. La presencia de este alto número de Coliformes indica contaminación directa con materia fecal y sugiere un riesgo indirecto de adquisición de otras bacterias patógenas que se transmiten mediante dicha vía.(Vásquez y col., 2012; Araya y col., 2008).

Los niveles de contaminación por organismos Coliformes en los alimentos indican el alto riesgo epidemiológico de contraer algún tipo de infección gastrointestinal. Su presencia se ha investigado en muchos países, aunque ellos varían de acuerdo con los hábitos alimentarios de las diferentes poblaciones, y dada su presencia e importancia se ha utilizado como indicadores sanitarios. (Oguntona y col., 1995).

Aunque no hubo presencia en ninguna muestra de *Salmonella*, el alto conteo de coliformes según Flores y col. (1996) nos señala la posibilidad de encontrarse presente en las muestras cualquier otro patógeno de origen fecal.

Por otra parte, es importante señalar que se pudo detectar e identificar cepas de *Pseudomonas spp.* Se considera que la presencia de este tipo de bacterias se debe a una contaminación proveniente del ambiente, del agua o de los utensilios utilizados en el proceso de ordeño, y también ponen de relieve la transmisión y diseminación de cepas resistentes a los antibióticos, puesto se ha señalado a este género como responsable de adquirir y diseminar factores genéticos responsables de estas resistencias (Rivero y col., 1994).

Datos similares a los obtenidos en esta investigación se reportan por Ruusunen y col. (2012), donde los análisis de patógenos en leche cruda en Finlandia reportan ausencia de *Salmonella spp.* en las muestras de leche analizada.

De igual manera en Venezuela, Luigi y col. (2013) en un trabajo realizado en la ciudad de Carabobo, donde a pesar del alto índice de recuento de bacterias aerobia mesófilas, la presencia de este patógeno no se pudo detectar.

La baja proporción de aislamientos de *Enterobacterias* a partir de las muestras de leche cruda es contradictoria debido a la alta prevalencia de estos patógenos en los establecimientos de ordeño; esto puede explicarse por dos razones una es el factor de dilución que representa el mezclado en el taque de almacenamiento de la leche, durante uno o más ordeños, por otra parte la leche contiene algunos componentes inhibidores sobre las bacterias contaminantes en especial el sistema lactoperoxidasa, que si bien actúa preferiblemente sobre las bacterias Gram positiva tiene poder bactericida sobre las Gram negativas; sin embargo, varios trabajos han demostrado la capacidad de bacterias patógenas como la *E. coli* para sobrevivir en productos lácteos fermentados y quesos, por lo cual la presencia de

estas, aún en bajas concentraciones puede constituir una amenaza a la salud del consumidor (Maher y col, 2001; McLay y col, 2002; Roldan y col, 2007).

En las muestras analizadas provenientes de la zona baja del Estado Mérida se observó la presencia de especies de *Klebsiella*, tales como *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, el significado clínica de la especie *Klebsiella*, generalmente ha sido limitado a neumonía pulmonar, sin embargo, se ha visto que estos microorganismos son capaces de causar gran cantidad de infecciones incluyendo brotes de diarrea infantil (Macznisk y col., 2003).

En las últimas décadas en diversos estudios a nivel mundial se ha considerado a *Klebsiella spp.* como patógeno intestinal especialmente en niños menores de 6 años. En Venezuela es importante mencionar los estudios realizados por Urrestarazu y col., quienes identificaron como patógeno único aislado a partir de heces de niños a *K. pneumoniae* ocupando el tercer lugar entre los patógenos más frecuentes (Albarado y col., 2007).

El mantenimiento de la leche bajo condiciones de frío promueven la selección y crecimiento de microorganismos psicrótrofos, que por otra parte pueden alterar las características físico químicas de los constituyentes de la leche, La presencia de estos microorganismos y los productos de su metabolismo conducen a cambios en las propiedades sensoriales y tecnológicas (sabores, aromas, firmeza de la cuajada, tiempo de estacionamientos en frío). Si bien los microorganismos psicrótrofos pueden ser eliminados por el proceso de pasteurización, las enzimas (proteolíticas y lipolíticas) producidas durante la etapa de almacenamiento en frío son termoestables y su acción permanece luego de la pasteurización (Banks, 1990).

Por otra parte, la utilización de fermentos en la elaboración de productos lácteos, es una práctica diaria a nivel industrial (Vásquez y col, 2007); en nuestro país generalmente estos fermentos son adquiridos a través de empresas extranjeras

dedicadas a la producción y comercialización de los mismos, muchos de los cuales incorpora bacterias probióticas; en los últimos tiempos estos productos han adquirido una gran relevancia como complemento alimentario, son muchos los microorganismos utilizados como probióticos, entre estos los géneros *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Amores y col, 2004; Fons y col, 2000).

En las muestras analizadas en la zona alta podemos encontrar aislamientos de géneros tales como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Bacillus*; dichas muestras representan un potencial en cuanto a la industria láctea se refiere, ya que estos microorganismos podrían otorgar un valor agregado o diferenciador a los productos lácteos elaborados a partir de la leche producida en la zona, así como potenciar el aislamiento y producción de fermentos, la industria láctea y farmacéutica.

Las bacterias lácticas ejercen efecto biopreservador manifestado en la prolongación de la vida útil de los productos elaborados con sus cultivos, ciertas especies producen bacteriocinas, con la producción de ácido y descenso del pH, se logra la inhibición de otras especies bacterianas y la conservación de los alimentos; el efecto biopreservador también se cumple gracias a la competencia por nutrientes que se dan entre las diversas especies bacterianas (Heer, 2007); entre estas bacterias se encuentran las aisladas en las muestras analizadas, tales como *Lactococcus* y *Enterococcus*.

De igual manera, se ha determinado que las bacterias lácticas poseen propiedades terapéuticas mostrando una variedad de efectos beneficiosos, géneros tales como *Lactobacillus*, aislado en la muestra procedentes de la zona alta del estado Mérida tanto en época de invierno como verano, genera una mayor disponibilidad, digestibilidad y asimilación de los nutrientes, aumentando la concentración de vitaminas, ácidos lácticos, ácidos grasos y elementos esenciales (Ca, P, Mn, Fe y Zn) (Heer, 2007).

En las muestras analizadas se observó la presencia de micróbiota con potencial probiótico y de brindar la capacidad de mejorar las características organolépticas de los derivados, la cual pudiera ser utilizada en la industria láctea, el número de microorganismos con características probióticas y que aportan beneficio a los alimentos y la salud del consumidor cada vez es mayor por lo tanto el número de alimentos puestos a disposición para el consumo de la población cada vez es mayor, así la necesidad de utilizar las propiedades de la leche para lograr obtener un derivado con ciertas características únicas que solo las obtiene, al ser producido en una región específica, puesto que involucraría factores internos y externos que le darán una propiedad única, pudiendo considerarse el abordaje de la denominación de origen.

Para la determinación de la biodiversidad, en alimentos se requiere estudios sobre la actividad y distribución de los microorganismos directamente, tanto por técnicas tradicionales como emergentes que enriquezcan la información disponible de los mismos; es importante realizar estudios sobre la diversidad bacteriana, puesto que los tipos de microorganismos presentes en la leche tienen incidencia directa sobre la identificación de aquellos que son capaces de brindar un atributo diferenciador. Los atributos diferenciadores distinguen características que están por sobre los requisitos básicos que debe cumplir un alimento (Oyarzun, 2010).

Uno de los índices más utilizados para cuantificar la biodiversidad específica es el de Shannon, también conocido como Shannon-Weaver, derivado de la teoría de información como una medida de la entropía. El índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y aumenta considerando la cantidad de especies presentes hasta un valor máximo de 5, cuando las especies están representadas por el mismo número de individuos (Pla, 2006).

Moreno (2001) expresa que la riqueza específica (S) es la forma más sencilla de medir la diversidad, ya que se basa únicamente en el número de especies presentes, sin tomar en cuenta el valor de importancia de las mismas. La forma ideal de medir la riqueza específica es contar con un inventario completo que nos permita conocer el número total de especies (S) obtenido por un censo de la comunidad.

Aplicando el índice de riqueza específica, para la zona alta del Estado Mérida el valor de $S = 8,70$; mientras que para la zona baja el valor es de $S = 10,8$.

La diversidad es el resultado de la riqueza de especies y la equitatividad que presentan las mismas al interior de la comunidad, para obtener este valor se utilizó el índice de Shannon- Weaver, para el cual los resultados fueron los siguientes: para la zona alta $H = 0.8096$ y para la zona baja $H = 1,1832$.

El índice de H aumenta a medida que la riqueza específica aumenta y los individuos se distribuyen mas homogéneamente entre todas las especies, así podemos observar que la riqueza específica para la zona baja es mayor y de esta manera del índice de Shannon-Weaver es mayor por lo tanto existe mayor diversidad de especies en esta zona.

Todas las especies tienen igual peso en el índice de Shannon-Weaver, sin embargo, en microbiología este dato nos ayuda a sintetizar mucha información (Somarriba, 1999).

Es bastante amplia la aplicación del índice de Shannon-Weaver en el área de foresta tropicales húmedos, en el área marítima, en vegetación no forestal, en el área de la microbiología ha estado su uso limitado, sin embargo, una aplicación relativamente del índice H, es la evaluación de la diversidad de helmintos en el tratamiento intestinal de los animales. Moreno y col. (2007) realizó estudios de esa naturaleza en bovinos, en Venezuela (Daniel, 1998).

Sin embargo pese a las ventajas de la aplicación del índice de Shannon-Weaver, en la aplicación microbiológica consideramos que nos provee información importante en cuanto a la cantidad de especies presentes y nos da la idea de la diversidad presente en diferentes zonas, pudiendo determinar si la zona objeto de estudio es mas biodiversa que otra, sin embargo, la información no discrimina entre las especies encontradas.

El hecho de encontrar mayor diversidad la zona baja del estado Mérida, nos indica que existe mayor probabilidad de encontrar diversas especies distribuidas de forma heterogénea ya que el numero obtenido no se acerca al número máximo posible en el índice H que es 5, el cual indica igual número de individuos por especie y al obtener un valor de $H=1,1832$ es indicativo que la diversidad es alta y el número de individuos por especie varia.

La determinación del índice de Shannon-Weaver aporta valores importantes cuando deseemos establecer factores diferenciadores ya que una zona con índices de diversidad alta es de potencial interés para el estudio detallado de los géneros y especies presentes y las características especiales que podamos explotar de estas de manera de poder avanzar a obtener una denominación de origen o un factor diferenciador.

En cuanto a los análisis estadísticos los resultados muestran que la leche no registra diferencia significativa en cuanto a los promedios relacionados al conteo de microbiota heterótrofa aeróbica en las zonas alta y baja en las dos diferentes épocas del año, presentando un valor $p > 0,05$.

CAPITULO VI. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

VI.1. Conclusiones

De la presente investigación se desprenden las siguientes conclusiones:

- Las particularidades y características agroecológicas de las zonas altas y las zonas bajas productoras de leche del Estado Mérida establecen diferencias en la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila y ello determinó cambios en la diversidad bacteriana.
- Al contabilizar la diversidad de la microbiota bacteriana de la zona alta en época de verano encontramos una media de $1,9 \times 10^5$ UFC/ml, y en época de invierno un valor promedio de $2,2 \times 10^5$ UFC/ml, dicho conteo no presentó diferencia significativa entre las dos épocas del año, lo que indica que las condiciones ambientales no varía significativamente en esta zona.
- El conteo en la zona baja en época de verano se eleva en un promedio de $2,3 \times 10^6$ UFC/ml, y en invierno presenta una media de $2,3 \times 10^5$ UFC/ml, lo que señala que en esta zona las condiciones ambientales de la época del año, si influyó en cuanto al crecimiento microbiano, en el sentido y favoreció el crecimiento.
- En época de invierno en la zona baja, el conteo de microbiota bacteriana heterótrofa aeróbica mesófila disminuyó, a parte de la influencia de las condiciones ambientales, este hecho se relaciono con las prácticas higiénicas de los ordeñadores para esta época mejoran, dada la necesidad de la limpieza de la ubre del animal al momento del ordeño.
- Se observó poca variabilidad en los resultados obtenidos en las diferentes épocas del año en las muestras analizadas en la zona alta.
- En cuanto al aislamiento se observó un predominio en la presencia de cocos Gram positivo de manera general en ambas zonas, encontrándose que en 50% de las

muestra analizadas, imperando su presencia en la zona alta, mientras que los bacilos Gram negativo se presentan en 9,25 % del total de las muestras.

- Las especies Gram positiva predominante en las muestras de leche cruda provenientes de ambas zonas fue *Staphylococcus*, con mayor presencia el *S. aureus*.
- Se ha demostrado que las cepas de *Staphylococcus* producen con mayor frecuencia toxinas y posee alta resistencia a los antibióticos, por lo que la presencia de *Staphylococcus* en leche y productos lácteos junto a la resistencia térmica de la toxina, podrían contribuir a un incremento de los casos de intoxicación alimentaria asociada a la ingesta de leche cruda.
- Los géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas cocos Gram positivo, aisladas en leche cruda bovina de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano fueron: *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, mientras que los bacilos Gram positivo fueron *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*
- Los géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas cocos Gram positivo, aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano fueron: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* mientras que los bacilos Gram positivo estuvo representado por el género *Bacillus*.
- Las especies de bacterias Gram positivas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano para los cocos Gram positivo fueron: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. intermedium*; *Str. bovis*; *E. faecium*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *L. lactis*; y entre los bacilos Gram positivo encontramos *L. acidophilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. bovis*, *C. glutamicum*.
- Las especies de bacterias Gram positivas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano para los cocos Gram positivo

fueron: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. bovis*, *Str. mitis*, *Str. equinus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. solitaries*, *L. mesenteroides*; por su parte los *B. cereus* y *B. subtilis* estuvieron presentes entre los *Bacillus* Gram positivo.

- Los géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas Gram negativos aisladas en leche cruda bovina de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano para bacilos Gram negativo fermentadores fueron: *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratias*.
- Los géneros de bacterias heterótrofas aerobias mesófilas Gram negativos aisladas en leche cruda bovina de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano para bacilos Gram negativo fermentadores fueron: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratias*, *Klebsiella*, *Aeromonas*; mientras que para los bacilos Gram negativo no fermentadores *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.
- Las especies de bacterias Gram negativas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona alta del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano que se encontraron presentes fueron: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *S. marcescens*.
- Las especies de bacterias Gram negativas heterótrofas aerobias mesófilas aisladas en leche cruda bovinas de la zona baja del Estado Mérida, Venezuela en las épocas de invierno y verano, entre las Gram negativa fermentadoras de la glucosa tenemos: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. sakazakii*, *E. agglomerans*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *C. freundii*, *S. ficaria*, *S. marcescens*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila*; mientras que las especies no fermentadoras estuvieron representadas por *P. aeruginosa* y *Ac. Baumannii*.
- Los principales aislamientos de Gram negativo corresponden al grupo de los coliformes, quedando los bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa en un menor porcentaje.

- No hubo presencia en ninguna muestra de *Salmonella*.
- El mantenimiento de la leche bajo condiciones de frío promueven la selección y crecimiento de microorganismos psicrótrofos, La presencia de estos microorganismos y los productos de su metabolismo conducen cambios en las propiedades sensoriales y tecnológicas (sabores, aromas, firmeza de la cuajada).
- En las muestras analizadas en la zona alta podemos encontrar aislamientos con presencia de géneros tales como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Bacillus*; dichas muestras representan un potencial en cuanto a la industria láctea se refiere, ya que estos microorganismos podrían otorgar un valor agregado o diferenciador a los productos lácteos elaborados a partir de la leche producida en la zona, así como potenciar el aislamiento y producción de fermentos, la industria láctea y farmacéutica.
- En las muestras analizadas se observó la presencia de micróbiota con potencial probiótico y de brindar la capacidad de mejorar las características organolépticas de los derivados, la cual pudiera ser utilizada en la industria láctea.
- El índice de riqueza específica, para la zona alta del Estado Mérida fue de: $S=8,70$; mientras que para la zona baja el valor es de $S=10,8$.
- El índice de Shanon- Weaver, para las muestras obtenidas fueron los siguientes: para la zona alta $H=0,8096$ y para la zona baja $H=1,1832$.
- Las muestras provenientes de la zona baja del estado Mérida, presentan una riqueza específica mayor y por lo tanto un índice de biodiversidad de Shanon- Weaver mayor.
- Al presentar mayor diversidad la zona baja del estado Mérida, existe mayor probabilidad de encontrar diversas especies distribuidas de forma heterogénea y por lo tanto ser la zona potencial para la aplicación de una denominación de origen o factor diferenciador.

VI.2 Recomendaciones

- Para futuras investigaciones se recomienda ampliar el número de muestreos.
- Incluir otros métodos de aislamiento, para de esta manera lograr tener la identificación más detallada de la microbiota heterótrofa mesófila viable presente por cada zona.
- Con el fin de reducir costos y ampliar el número de géneros analizados, se recomienda priorizar la búsqueda en aquellos microorganismos que puedan aportar un factor diferenciador a la leche y por lo tanto a los derivados de la misma.
- Incorporar métodos de análisis moleculares.

Referencias Bibliográficas

Ablan, E. (2000). Políticas de calidad en el sistema agroalimentario Español. Agroalimentaria. 10:63-72.

Acinas, S. (2008). Diversidad y estructura de la comunidad microbiana. Departamento de biología. Instituto de ciencias del mar. Barcelona. 44:24.

Agudelo, D; Bedoya, O, Mejía. (2005). Composición y características físico Químicas de la leche. Revista Lasallista de investigación. 2(1):38-42.

Alais, Ch (2003). Ciencias de la leche. Editorial reverles S.A. Barcelona, España. Documento en línea, disponible en: <http://www.publidisa.com/publicacionesd>.

Albarado, L, Flores, E, Mendoza, G; Mundarain, T. (2007). Asociación de Klebsiella spp con síndrome diarreico agudo en niños de 0 a 2 años de edad. Revista de la facultad de ciencias de la salud. Universidad de Carabobo-Venezuela. 1(3):7-12.

Alegría, L; Salazar, J; Mata, M; Sandrea, L; Paz, A; Valero, K; Hernández, I, Fuenmayor, A. (2009). Bacterias enteropatógenas en la comunidad étnica añu de la laguna de sinamaica Estado Zulia-Venezuela. Revista de la sociedad venezolana de microbiología, 29:84-90.

Álvarez G; Herrera, J; Alonso, G; Barrera, A. (2012). Calidad de la leche cruda en unidad de producción familiar del sur de ciudad de México. Arch. Med. Vet. 44: 237-242.

Amiot, J. (1991). Ciencia y Tecnología de la leche. Editorial Acribia S.A, Zaragoza. España.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Amores, R, Calvo, A maestre, J, Hernand, M.(2004). Probióticos. Revisión. Rev. Esp. Quimioterap. 17(2).131-139.

Andueza, F. (2000). Patógenos clásicos y emergentes detectados en leche y derivados en el Estado Mérida. Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. pp.: 112-114. Mérida. Venezuela.

Araya, M; Davidovich, G; Chaves, C; Arias, M. (2005).Identificación de *Enterococcus sp.* en muestras de leche cruda del área metropolitana de Costa Rica y evaluación del patrón de sensibilidad a antibióticos. ALAN. 55(2):35-42.

Araya , M; Gallo, L; Quesada, C; Chaves, C; Arias, M.(2008). Evaluación bacteriológica de la leche y queso distribuidos en el area metropolitana de costa rica. ALAn. 58(2): 46-52.

Arora, D; Hirsch, P; Kerry, B. (1996). PCR-based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporium* isolates. *Mycol. Res.*, 100 (7):801-809

Atlas, R.; Bartha, R. (2005). Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª Edición, Editorial Pearson. Madrid. España.

Ávila, T; Valdivieso, N; Cruz, P. (2001). Fisiología de la glándula mamaria y ordeño. Facultad de medicina veterinaria zootecnia, Universidad nacional autónoma de México. México, DF.

Banks,J.(1990).Thequalityofmilkinrelationtocheesemanufacture.J.Soc.DairyTechno l.45:,48:61

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Barrow, G.I.; Feltham, R.K.A. (2004). *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. Third Edition. Cambridge.UK.

Bedolla, C y Ponce, M.(2008).Pérdidas económicas ocasionadas por mastitis bovina en la industria lechera. REDVET IX(4):1-6.

Bermúdez, J; Reginensi, S. (2011). Calidad de la leche para la producción de producción lácteos diferenciados de alto valor en pequeños rumiantes. Memorias II Congreso latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. IX congreso nacional de producción ovina.

Bhattarai, B.; Prasad, S. (2010). Quality Evaluation of Milk at Different Levels of Milk Chain System in Makwanpur District, Nepal. Journal of Food Science and Technology Nepal. Vol 6: 80-93.

Boscán, L.; Faria, J.; Sánchez, M. (1990). Calidad química y microbiológica de la leche en Venezuela. En: González; Stagnaro, editores. Ganadería mestiza de doble propósito. 1° edición. Universidad del Zulia. Págs.605-629. Maracaibo. Venezuela.

Botero,L; Vertel,M; Florez,L; Medina, J .(2012). Calidad composicional e higiénico Sanitaria de leche cruda entregada en época seca por productores de galeras, Sucre. Vite, 19(1):S314-S316.

Briñez, W.; Valbuena, E.; Castro, G.; Tovar, A.; Ruiz-Ramírez, J. (2008). Algunos parámetros de composición y calidad en leche cruda de vaca doble propósito en el Municipio Machiques de Perija. Estado Zulia. Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVIII (5): 607 – 617.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Caballero, A. (2008). Temas de higiene de los alimentos. Editorial ciencias médicas. La Habana, Cuba. P. 382.

Calderón, A; García, F; Martínez, G. (2008). Indicadores de calidad de leche cruda en diferentes regiones de Colombia. Rev.MVZ. Cordoba. 11(1):725-737.

Calderón, A. (2002). Cuantificación de factores de riesgo de mastitis en sistemas Elite de producción de leche en el altiplano Cundiboyacense. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

Camacho, A, Giles, M; Ortegon, A; Palao, B; Velásquez, O: (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. 2ª edición. Facultad de química, UNAM. México.

Cambra, J ; Villafuentes, A.(2009). Denominación de origen e indicadores geográficos, justificación de su empleo y valorización de si situación actual en España. El Lamo de Espinoza (ed.). Almería. Pp 329-350.

Cammarata, E.; Gutiérrez, L. (1994). Estudio Microbiológico de Leche Cruda y Pasteurizada de consumo en el Distrito Sanitario Colon del Estado Zulia y el Distrito Sanitario Mérida del Estado Mérida. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Tesis de pregrado. Mérida. Venezuela.

Cárdenas, M; Peiroten, A; Calzada, J. (2012). Actividad de *Enterococcus faecium* aislado de leche materna y su influencia en el aroma del queso. REUCA. 4(15). 37-39.

Caro,I; Mateo,J, Sandoval, M; Soto, S; García, M; Castro, J.(2013). Characterization of Oaxaca raw milk chesse microbiota with particular interest in Lactobacillus strains. J dairy Sci. 96(6):3661:3670.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Carvajal, M.(2011).Manual de microbiología, Laboratorios Victoria, Bogotá Colombia, Documento en línea disponible en: http://www.esevictoria.gov.co/sitio2/Guias_Protocolos/apoyodiagnostico/laboratorioclinico.

Casanovas-Massana, M.; Blanch, A. (2012). Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. International Journal of Food Microbiology. Vol. 153 (1-2): 38-44

Chávez, M; Margalef, M; Martínez (2007). Cuantificación de lipólisis en leche cruda y térmicamente tratada. Resumen V congreso latinoamericano de especialistas en Rumiantes y camélidos sudamericanos. Argentina. pp 181-186.

Chritiansson, A; Bertilsson, J, Svensson, B.(1999). *B. cereus* spores in raw milk, factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J Dairy Sci. 8(2): 305-314.

Cepero, O; Castillo, J, Salado, J, Herrera, N; Aguilar, J; González, R. (2005). Valoración de diferentes factores que intervienen en la calidad higiénica Sanitaria de la leche cruda. REDVET.3: 115-121. Disponible en: <http://www.redaly.org/articulo.oa/n030305.html>.

Cermeño, L.; Peña, A. (1998). Determinación de *Aeromonas spp.* En muestras de leche cruda producida en fincas del Municipio Libertador del Edo. Mérida. Escuela de Bioanálisis Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Tesis de pregrado. Mérida. Venezuela.

Código Internacional de prácticas higiénicas para la leche y los productos lácteos. CODEX. Disponible en: www.codexalimentarius.net.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Comisión Venezolana de Norma Industriales (Covenin). Norma Venezolana 903:93. Leche Cruda, Fondonorma, Caracas, Venezuela.1993

Comisión Venezolana de Norma Industriales (Covenin). Norma Venezolana 902:87.Método para el recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri., Fondonorma, Caracas, Venezuela.1987

Comisión Venezolana de Norma Industriales (Covenin). Norma Venezolana 938:83. Leche y productos lácteos. Método para la toma de muestra. Fondonorma, Caraca, Venezuela. 1983

Comisión Venezolana de Norma Industriales (Covenin). Norma Venezolana 1126:89. Alimentos identificación y preparación de muestras para análisis microbiológico. 19 rev. Fondonormas Caracas, Venezuea,1989.

Corpoandes (2002). Estado Mérida. Esquea de contenido. Dossier de las entidades federales. 80p.

Coorevits, A, Jonghe,V; Vandromme,J, reekmans,R; heyman,J; Messens,W; Devos,P; heyndrickx,M.(2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. Syst appl mucrobiol.31(2):126-140.

Correa, M y Marín, J. (2002). O-serogroups eae gene and EAF plasmiden Escherichia coli isolates from of bovine mastitis in brazil . Veterinary microbiology. 85:125-132.

Cotrino, V.(2001).Rutina de ordeño. Mastitis. Mastitis y calidad de la leche”. Cómo producir leche de óptima calidad. Memorias-Curso. Consejo Nacional de calidad

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

de la leche y Prevención de la mastitis. Bogotá D. C: Sena. Asociación Nacional de Productores de leche.

D'Amico, D.; Donnelly, C. (2010). Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science*. Vol. 93 (1): 134-147

Daniel, O. (1998). Subsidies al uso del índice de diversidad de Shannon. Congreso atinoamericano IUFRO, resumen, tema 3. Valdivia. Chile.

Dávila, J y Reyes, O. (2006). Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración del queso tipo gouda en la industria venezolana. *ALAN*.56:51-59.

Dávila, J y Reyes, O. (2006). Evaluación microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración del queso tipo gouda en la industria venezolana. *ALAN*.56:51-59.

De Cagigas, A; Blanco, J.(2002). Prebióticos y Probióticos . Una relación beneficiosa. *Revista cubana de alimentación y nutrición*. 16(1):63-68.

De Jonge, R; Vanfurth ,A; Wassennarm,M; Gemke, R; Terweenc, C.(2011). Predicting sequelae and death after bacterial meningitis review of prognostic studies . *BMC infectious diseases*. 10:233.

Demo, M; Quiñonez ,J; Martin, V.(1999). Claves dicotómicas para la identificación de *Staphylococcus* aislados de leche bovina. *Revista latinoamericana de microbiología*. 41:53-57.

Díaz, C. (2000).Microbiología de la leche y de los productos lácteos .volumen I,

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Impresión editorial Venezolana C.A. Mérida, Venezuela.p.270

Duthot, F; Gondon, J; Montel, M. (2003). Bacterial community dynamics during productions of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16rRNA gene singes satrand conformation polymorphism analysis. Appl environ microbial, 69:3840-3848.

Elsas, J.; Boersma, S. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. European Journal of Soil Biology. Vol. 47(2): 77-87.

End, M; Abou, M; Adb-Rabou, N; Aboud A.(2009). Chermocal composition of raw milk and heavy metals behavior during processing of milk products. Global veterinaria 3(3):268-275.

Ercolini,D;Russo,F; Ferrocino,L;Villani,F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. Food Microbiology. Vol. 26 (2): 228-231.

Esquerre, G. (2008). Análisis de los factores que explican la eficacia de la estrategia de denominación de origen como estrategia de marketing a través de un estudio de caso. La denominación de origen protegida queso Idiazábal en el País Vasco. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Educación a distancia. Madrid. España.

FAO.(2012).Guía de Buenas Prácticas en explotación lechera. Organización para las naciones unidas, Federación internacional de Leche. Roma.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Farías, J; García, A; Izquierdo, P; Allara, M; Valera, K.(2005). Aislamientos de bacterias Gram positiva de leche con residuos de antibiotics. ALAN. 52(1): 156-163.

Farías, J, Valero, K; Izquierdo, P, Garaci, A; Allara,M.(2002). Resistencia a los antimicrobianos de *Enterococcus* aislados de leche cruda. Revista científica FCV-LUZ. XII(1):29-35.

Farías, J, Allara, m; Izquierdo, D, D'Pool, G; García, A; Valero, K.(2001). Resistencia a los antimicrobianos de especies de *B. cereus* aislados en leche cruda. Revista científica FCV-LUZ. XI(6):479-484.

Fernández, J; Barbosa, G; Swanson, B. (2013). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos .Arbor. CLXVIII (661): 155-170.

Flores, J; Suárez, G; Heredia, M; Puc, M; Franco, J. (1996). Calidad microbiológica de los alimentos marinos de la ciudad de Mérida Yucatán, Vet. Mex. 27(4):319-324.

Fons, M; Gomez, A; karjalainen, T.(2000). Mechanism of colonisation and coloniation resistance of the digestive tract . Microbiol Ecol. Health dis. 2:240-246.

Franz, C., Stiles, M., Schleifer, K. y Holzapfel, W.(2003). Enterococci in foods a functional and safety aspects. (documento en línea). Consultado el 6 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T7K-48Y6SBX5/2/61d3de77510237415bc190c29f0121c4>

Fricker, M.; Skanseng, B.; Rudi, K.; Stessl, B.; Ehling-Shulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. International journal of food microbiology. Vol. 145 (1): 24-30.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Fredricks, D. (2013). The human microbiota. Wiley-Blackwell. First edition. NY. USA.

Fuentes, A; Campas,O; Meza, M.(2005). Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad Obregón, Sonora, México. Respyn, 6(3).

Fuentes, A; Herrera, J; Bastidas, A; Barrera, A. (2012). Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de la ciudad de México. Archivos de Medicina veterinaria. 44(3):237-242.

Garedea,L; Berhanu,A; Mengesha, D; Tsegay,G;.(2012). Identification of gran negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cowmilk consumed at gondar town nd its suburbs etiopia. BMC public health. 6(12):950-958.ia from critical control points of raw and pasteurized cow milk consumed at Gondar town its suburbs, Ethiopia. BMC public health.12:950-958.

Garrity, G.; Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Ed. Vol. II. Springer. New York. USA.

Gásquez,J; Martínez, F; Barrera,V.(2012). Indicadores de origen protegidas como elementos de diferenciación de los productos agroalimentarios, el caso del jamon de España.Redalyc.12(2):103-129.

Gómez, M; Sordelli, D; Buzzola; F; García, V.(2004). Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. Infect Immun.70:4254-4260.

González, F; González, B.(2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencia sobre efectos hipocolesterolémicos. Respyn 7(1). Documento en línea, disponible en: <http://www.respyn.unanl.mx/vii/ensayohtm>.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

González, F; Gonzalez, B.(2012). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencia sobre efectos hipocolesterolémicos. Respyn7(1).Documento en línea, disponible en: <http://www.respyn.unanl.mx/vii/ensayo/criterios.htm>.

González, M. (2002). Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt. Enacyt. Panamá. Disponible en: [www. Slideshare.net/tecnología-para-la-elaboración-de-queso](http://www.slideshare.net/tecnología-para-la-elaboración-de-queso).

Grandos, C; Acevedo, D; Torres, R.(2012). Calidad de la leche y del suero costeño de los municipios Tubarco, Arjona y Carmen de Bolívar, Colombia. Revista la sallista de investigación. 9(2):132-137

Guerrero, L; Román, S; Pacheco, L. (2003). Proteólisis de a leche cruda almacenada en frio, efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas. Revista científica FCV-LUZ, vol XIII, N°3. pp 187-192.

Guillen, M.; Guerrero, L. (2009). Calidad microbiológica de la leche cruda bovina de Socopó del Estado Barinas. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Tesis de pregrado. Mérida. Venezuela.

Guillespie, B.; Lewis, M.; Boonyayatra, S.; Maxwell, M.; Saxton, A.; Oliver, S.; Almeida, R. (2012). Evaluation of bulk tank milk microbiological quality of nine dairy farms in Tennessee. Journal of Dairy Science. Vol. 95 (8): 4275-4279

Hantsis-Zacharov,E y Halpern,M.. (2007). Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits_applied and environmental microbiology. Vol. 73 (22): 7162–7168.

Heer, G.(2007). Microbiología de la leche. Facultad de ciencias veterinarias, cátedra de tecnología de la leche. Manual. UNL.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Hernández, A.(2007). Aislamiento , caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. Argentina.

Herrera, B.(2012). Desarrollo de un sistema de gestión de la calidad para el control de enfriamiento de leche "Madrilac" en l canto de Guano Riobamba, Ecuador.Tesis de grado de maestría en producción agroindustrial, Universidad de Chimboraza.

Hill, B, Smythe,B; Lindsay, D; Shepherd,J.(2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. Int.J. Food micriol. 157(2):305-308.

Holt, J.G.; Krieg, N.; Sneath, D.; Slaley, J.; Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. USA.

Jay,J (1994). Microbiología moderna de los alimentos.3ª Edición Acribia, Zaragoza, España.

Jayarao, B.; Henning, D. (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. J Dairy Sci. Vol. 84(10):2157-62.

Jayarao, B; Pillai, s; Sawant, A; Wolfgang D; Hegde, N. (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. J. dairy sci. 87(10):3561-3573.

Jayarao, B.; Donaldson, S.; Straley, B.; Sawant A.; Hegde, N.; Brown, J. (2006). A survey of food borne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. J. Dairy Sci. Vol. 89(7): 2451-8.

Kalogridou, D. (1992).Biochemical activities of *Bacillus* specie isolates from fial sour evaporated milk, J Dairy Sci. 75(10):2681-2686.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Kennedy, A. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems agricultura. *Ecosystems and environment*. 74:65-76.
- Kirk, R; Sawyer, R; Egan, H. (2005). Composición y análisis de alimentos de penson. *CECSA México*. 5(1):583-632.
- Krebs, C.(1994). *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance* 6th Ed. Lavoisieer.
- Kuang,Y; Tani,K; Synnott,A; Ohshima,K; Higuchi,H; Nagahata,Y;.(2009). Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by cultura independent PCR method.*Biochemical engineering journal*.45(1):76-81.
- Lafarge, V; Ogier, V, Girard, V; Maldems, J, Leveau, A; Gruss A; Delacroix, B. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl environ microbial*. 70:5644-5650.
- Lanneau,P; Lebtahi, K, Swinne, D. (1996). Isolation of yeat from bovine milk in belgium. *Mycopathologia*. 135:99-102.
- Lavoie,K;Touchette,M;St-Gelais,M;Labrie,S.(2011).Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec*Dairy Science & Technology* 2011.
- Lejeune, J; y Rajala-Schultz, P. (2009). Food safety: Unpasteurized milk a continued public health thereat. *In infect dis*. 1;48(1): 93-100.
- Le Loir, Y; Barón, F; Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisonin .*Genet mol rev*. 2(1):63-76.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Le Roux, Y; Colin,O, Laurent, F (1995). Proteolysis in samples of quarter milk with somatic cell counts.Comparision of somatic indicators of endogeneous proteolysis in milk. J dairy Sci. 78.1289-1297.

López, R; Tepal,J; Andrade,L; Escobar,M; Gutierrez, R; Blanco,M.(2011). Mejora continúa de la calidad higiéxico sanitaria de la leche de vaca. Manual de capacitación instituto nacional de investigación forestal, agrícola y pecuaria, Centro nacional de investigación disciplinaria en microbiología animal. Guajimalpa. México D.F .

López, G. (2008). Estudio de la leche de vaca. Universidad de Antioquia, Facultad de química farmacéutica. Guía práctica.

Lugo, A.; Roa, V.; Martínez, A.; Araque, J.; Rosales, D.; Andueza, F. (2009). Aislamiento de cepas de *Brucella spp.*, en muestras de leche bovina producida en fincas del sector Dos de Socopo. Estado Barinas. Venezuela. Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN). Vol. XI (4); 12-19.

Luigi, T.; Rojas, L.; Valbuena, O. (2013). Evaluación de la calidad higiéxico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo. Venezuela. Salus. Vol. 17 (1): 25-33.

Macfaddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. Argentina.

Macznsk, B, Smutncka, D; Przondon, A;Burdynowski, K.(2003). Adhesive propesties and antibiotic resistance of Klebsiella spp. Strains isolated from gastrointestinal tracts of children hospitalized in Wroclaw nan opele. Med dosw microbial. 55:333-342.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Madigan, M; Martinkon, J, Parker, j . (2004). Brock Biología de los microorganismos . Decima edición. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. Pp 122.

Maher,M; Jordan, K; Upton,M; Coffey, A. Growth ad survival of E. coli O157.H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw ilk. J appl. Microbial. 90:201-207.

Mallet; A.; Guéguen, M.; Kauffmann, F.; Chesneau, C.; Sesboué, A. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. International Dairy Journal. Vol. 27 (1-2): 13-21.

Mangariño, H (2001). Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa. 1ª edición. Producciones y servicios incorporados S.A. Guatemala.

Marchand, S.; Coudijzer, K.; Heyndrickx, M.; Dewettinck, K.; De Block, J.(2008). Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. *International Dairy Journal*, Edmonton, 18(5):514-519.

Masoud, W; Vogensen,F; Lillevang,S;Abu Al-Soud,W; Sorensen,S; Jakobsen,M.(2012).The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR.*International Journal of Food Microbiology* 153:192–202.

Martelo, M. (2003). La precipitación en Venezuela y su relación con el sistema climático. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales, Dirección General de Cuencas Hidrográficas, Dirección de Hidrología, Metrología y Oceanología. Documento en línea disponible en:
<http://www.inameh.gob.ve/bvirtual.php>.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Martinez, G, Harel, J; Higgins, R; Lacouture, S, Daignault, D Gottschalk, M. (2000). Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of clinical microbiology*. 38:71-78.

Matthews, K.; Harmon, R.; Langlois, B. (1992). Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 75: 1835-1839.

McLay, J; Kennedy, M; O'Rourke, R; Ellio, R, Simmonds, R.(2002). Inhibidores of bacterial food borne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *Int. J. food microbial*. 73:1-9.

Medina, J; Botero, L; Florez, L; Vertel, M.(2012). Composición e higiene sanitaria de leche cruda entregada en época seca por producción. *Vitae*. 19(1):45-48.

Millan, M, Morales, E.(2012). Denominación de origen protegido (D.O.P) y turismo gastronómico, una relación simbiótica en Andalucía. *Gran tour, Revista de investigaciones científicas*. 6:101-121.

Miravet, M. (2003). Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas como indicadores de ambiente. Ministerio de Ciencia, tecnología y medio ambiente. Habana Cuba. Disponible en línea en <http://www.oceandocs.org/bitsream/1834>.

Molineri, A, Signorini, M; Cuartri, A; Canavesio, V, Neder, V; Russi, N; Bonazza, J, Calvihho, L. (2009). Calidad bacteriológica y relación entre grupos bacterianos en leche de tanque de frío. *Rev. FAVE- cient. Vet.* 8(2):75-85.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Moreno, F; Rodríguez, G; Méndez; V Osunas;Vargas, M.(2001). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda en regiones del alto Chicamocha. Revista de medicina veterinaria. 014: 61-83.

Moreno ;F; Rodríguez, G Méndez, V; Osuna, L; Vargas, M.(2007) .Análisis microbiológico y su relación con la calidad higienica y sanitaria de la leche producida en la región de Chicamocha, Colombia. Revista médica veterinaria,Universidad La Salle. 014:61:83.

Moren, C.(2001). Métodos para medir la biodiversidad. CYTED programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. UNESCO oficina regional de ciencias y tecnología para la América latina y el Caribe. Chile.

Neviani, E.; Bottari, B.; Lazzi, C.; Gatti, M. (2013). New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. Front. Microbiol. Vol. 4: 36.

Ogier,J; Son,O; Gruss,A; Tailliez, P, Bruchet, A.(2013). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Applied and environmental microbiology. 79(13).

Oguntona CR, Kanye O. (1995).Contribution of street foods to nutrient intakes by Nigerian adolescents. Nutr Health.10(2):165-71.

Olembo, R (1991). Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity of mimicroorganism and invertebrales. Its role in sustainable agriculture. Redwood press.Melkshan.uk.

Olivares,M; Quattrochi, H.(2010). Situación actual y tendencias de la producción mundial de leche.Centros de investigaciones lecheras IFCN.Reporteros lecheros IFCN. Documento en línea disponible en <http://www.ifcndairy.org>.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ordoñez, J. (2005). Gaceta ganadera, III Foro Venezolano de leche. Disponible en [http:// www.cavilac.org](http://www.cavilac.org).

Oyarzun, M y Tartanac, F. (2002). Estudio sobre los principales tipos de sellos de calidad en alimentos a nivel mundial. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Oficina regional para América latina. Santiago. Chile.

Palma, J.; Núñez, R.; Espinoza, F.; Vargas, T.; Folache, L.; Aguirre, C.; Linares, Z. (2007). Calidad de la leche en los Municipios San José de Guaribe, Camatagua y Urdaneta. Estrategia de calidad. Resumen I Simposio: Tecnologías apropiadas para la ganadería de los llanos de Venezuela. Barinas. Venezuela.

Páez, L; López, N; Salas, K; Spaldillero, A; Verde, O.(2002). Características físico-químicas de la leche cruda en las zonas de Aroa y Yaracal. Venezuela. Científica, 12(2):58-66.

Padilla,P; Chacón, E; Contreras, J: (2007). Nuevas opciones para la producción de leche en Venezuela, estudio de caso en el suroeste andino. Sistemas de intervención , capítulo IV.pp 286-310.

Pant, R.; Nirwal, S.; Rai, N. (2013). Prevalence Of Antibiotic Resistant Bacteria And Analysis Of Microbial Quality Of Raw Milk Samples Collected From Different Regions Of Dehradun. International Journal of Pharm.Tech. Research Vol.5 (2): 804-810.

Paredes, L. (2010). Perspectivas de la producción lechera en Venezuela en el contexto socio económico actual. Mundo pecuario. VI(2):127-142.

Parra, H; Adolfo,R.(2010). Review. Bacterias ácido lácticas, papel funcional en los Alimentos. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, Rev. Facultad de ciencias agropecuarias. 8(1):223-243.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Peña, M. (2009). Estudio Microbiológico de la Leche Cruda de las zonas altas y bajas del Estado Mérida. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Tesis de pregrado. Mérida. Venezuela.

Pérez, L; Egea, P ; Sanz, J.(2013).Valoración de externalidad territoriales en denominaciones de origen de aceite de oliva mediante técnicas del proceso analítico de red.ITEA.109(2):239-262.

Peterson, J.; Garges, S.; Giovanni, M.; McInnes, P.; Wang, L.; Schloss, JA.; Bonazzi, V.; McEwen, JE.; Wetterstrand, KA.; Deal, C.; Baker, CC.; Di Francesco, V.; Howcroft, TK.; Karp, RW.; Lunsford, RD.; Wellington, CR.; Belachew, T.; Wright, M.; Giblin, C.; David, H.; Mills, M.; Salomon, R.; Mullins, C.; Akolkar, B.; Begg, L.; Davis, C.; Grandison, L.; Humble, M.; Khalsa, J.; Little, AR.; Peavy, H.; Pontzer, C.; Portnoy, M.; Sayre, MH.; Starke-Reed, P.; Zakhari, S.; Read, J.; Watson, B.; Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. Genome Res. Vol. 19(12):2317-23.

Pinzón, A. (2006). Determinación dl índice de bacterias mesófilas aerobicas presentes en la leche cruda versus leche pasteurizada que se comercializa en la zona urbana de la ciudad de Popayán, Colombia, tesis de grado para optar al título de zootecnista, Universidad Nacional abierta , ciencia agrarias. Colombia.

Pla, L.(2006).Biodiversidad, inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. INCI.31(8):15-20.

Prescott,L; Harley, J; Klein,D.(1999). Microbiologia.4a edicion. Editorial McGraw Hill-Interamericana. Madrid, España.

Prieto,L; Villarreal; C; Soto V; Pereira, Z ;Varela N; Lanchero,J ;Villanueva;R; Mendoza, D; Torres, E.(2008) Reacción en cadena de la polimerasa para la

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

detección de Salmonella sp. en leche en polvo: optimización del método en 12 horas Salud Uninorte, 24(2): 216-225

Quigley,L; O'Sullivan L; staton, C; Beresford ,T; Ross,R; Cotter, P.(2013).The complex microbiota of raw milk. Fems microbioly Rev. 37(5):664-698.

Raats, D; offek, M; minz, d; Halpem, M.(2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. Food microbiology.28(3).465-471.

Rabello, R; Souza C, Duarte, M; Lopes, R; Teixeira, M; Castro, L. (2005). Characterization of Staphylococcus aureus isolates recoverd. J dairy Sci. 88;3211 3321.

Rámirez, A;Velazco, J.; Araque, M.; Araujo, E.; Longa, A.; Nieves, B.; Sanchez, K.; Velazco, E. (2006). Manual práctico de Bacteriología Clínica. Colección Temas Universitarios. Vicerrectorado Académico. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.

Ray, B.; Bhunia, A. (2010). Fundamentos de microbiología de los alimentos. McGraw-Hill Interamericana editores. México DF. México.

Revelli, G, Sbodio, E; Tercero, E (2011).Estudio y evolución de la calidad de la Leche cruda en la zona noreste de santa Fe y sur de Santiago. Argentina. Revista de investigaciones agropecuarias, 37(2):128-139.

Ricci,A; Capello, K; Cibir,V; Pozza,G; Ferré,N; Barrucci, F; Menin,R; Farina,R; Marangon,S.(2013). Raw milk associated foodborne infections a scoring system for the risk based categorization ofraw dairy farms. Rev.Vet.Sci.95(1):69-75.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Rivano, A; Andrighetto, C; Torriani, S; Lombardi, A. (2013). Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative Staphylococcus isolated from raw milk and cheese of north Italy. Food microbiology. 34(1):106-111.

Rivero, Z; Farias, J; Santoro, R. (1994). Aislamientos de gran negativo en leche cruda con antibiótico. Revista científica FCV-LUZ. IV(1):11-16.

Robinson, R. (1987). Microbiología lactológica. Tomo I. Editorial acribia S.A. Zaragoza, España.

Robinson, R. (1997). Microbiología lactológica. Tomo I. Editorial acribia S.A. Zaragoza, España.

Rojas, L; Álvarez, C. (2007). Denominación de origen del queso Turrialba. Estudio técnico para su inscripción en el registro de propiedad intelectual Costarricense. Dirección de calidad agroalimentaria, U.S.C. Documento en línea, disponible en <http://www.fao.org/fileadmin/templatem/documents/costarica/estudiotecnico.pdf>

Roldan, M; Chinen, I; Otero, J; Miliwehsky, E, Alfaro, N, Burns, P; Rivas, M. (1999). Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *E. coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista argentina de microbiología. 39: 113-119.

Román, S; Guerrero, L; Pacheco, L. (2003). Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche almacenada en frío. Rev. Científica FCV-LUZ. 13:146-152.

Romero, G. (2007). Biotecnología: generalidades, riesgos y beneficios. Cursos expertos universitarios en biotecnología de alimentos. Documento en línea

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

disponible en: <http://www.biotech.com.es>.

Rondón, M; Goodman. R; Handelsman, J.(1999). The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Tibtech*. 17:403-409.

Rudi, K.; Tannaes, T.; Vatn, M. (2009). Temporal and spatial diversity of the tap water microbiota in a Norwegian hospital. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75(24):7855-7857.

Ruusune, M; Salonen, M; Pukkinen.H; Huuskonen,M; Hellstrom,S; Revez,J; Hannien,M; Fredriksson,M; Lindstrom,M.(2013). Pathogenic bacteria in finnish bulk tank milk. *Foodborne pathog dis.* 10(2):99-106.

Sanchez, M.; Boscán, L.; De Jongh, F. (1996a). Características físico-químicas y sanitarias de la leche del Estado Mérida Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ* / Vol. VI (2): 99 – 110.

Sanchez, M.; Boscán, L.; Diaz, C. (1996b). Características físico-químicas y sanitarias de la leche del Estado Mérida Venezuela. II Zonas bajas, *Revista Científica, FCV-LUZ* / Vol. VI (2): 111 – 116.

Signorini,M ; Sequeira, G; Bonazza, J; Santilla,R; Marti, L; Frizzo, L; Rosmini, R.(2008). Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de as condiciones higienico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Revista científica FCV-LUZ*. XVIII (2):207-217.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Silva,J; Rámirez, L; Alfieri, A; Rivas,G; Sanchez,M. (2004). Determinación d microorganismos indicadores de calidad sanitaria, coliformes totales y coliformes fecales y aeróbios mesófilos en agua potable envasada y distribuida e san Diego Estado Carabobo- Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 24(1-2) :18-23.

Sim Kheng, Y; Fook,Ch; Fan Hui,Y.(2012). Microbiologica quality and the impact of hygienic practices on the raw milk obtained from the small-scale dairy farmers in Sabah,Malaysia. International Journal of agricultural and food Science. 2(2):55-59.

Smith,LI.(2005).Culture collections over the world. Int microbiology. 6:195, pp.100 115.

Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Shape, M. and Holt, J. (1986). *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. II. Williams & Wilkins. Baltimore. USA.

Soggiu, A.; Bendixen, E.; Brasca, M.; Morandi, S.; Piras, C.; Bonizzi, L.; Roncada, P. (2013). Milk and cheese microbiome for safety and quality of dairy products. In: Farm animal proteomic 2013. Proceedings of the 4th Management Committee Meeting and 3rd Meeting of Working Groups 1, 2 & 3 of COST Action FA1002. Wageningen Academic Publishers. Slovaquia.

Solt, I.; Kim, M.; Offer, C. (2011). The human microbiome. Harefuah. Vol. 150(5): 484-488.

Somarriba, E.(1999). Diversidad Shannon. Agroforesteria en America. 6(23):13-17.
Soliman, A. (2013). Bacteriological Quality and Safety of Raw Cow 's Milk and Fresh Cream. Slov. Vet. Res. Vol. 50 (1): 21-30

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Spreer, E. (1991). Lactología industrial, 2a Edición, Editorial acribia, Zaragoza, España.

Stephen,O; Kathryn,J; Steven, C; Murphy, E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. <foodborne pathogens and disease. 6(7) :793-806.

Stevens,M; Ashbolt,N Cunliffe, D.(2003). Recommendations to change the use of coliforms as microbial indicators of drinking water quality. Department of human services south Australia. Documento en línea disponible en:
http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopese/_files32.pdf.

Straley, B.; Donaldson, S.; Hedge, N.; Sawant, A.; Srinivasan, V.; Oliver, S.; Jayarao, B. (2006). Public health significance of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in raw bulk tank milk. Foodborne Pathog Dis. Vol. 3(3):222-33.

Tatzel, R; Ludwig, W; Schleifer, K; Wallnofer, P.(1994). Identification of Bacillus strains isolated from milk and cream with classical and nucleic acid hybridization methods. J Dairy Sci. 6:529-535.

Urbina, K.; Álvarez, R. (2012). La denominación de origen como estrategia de diferenciación para el Queso Telita elaborado en el Municipio Piar del Estado Bolívar, Venezuela. 10th Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology. Resumen. Panama City, Panama.

Urrestarazu, M; Darricarrere, R, Perez, M; Doud, G; Serrano, N, Cavazza, m.(1987). Frecuencia de Campylobacter jejuni y otros agentes patógenos en un grupo de lactantes venezolanos con diarrea aguda. Bo so sanit panam. 104:225-232.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Uzcategui, A. (2008). Cacao de Chuao, Comunicado al pueblo Venezolano. Grupo de investigaciones sobre políticas de propiedad intelectual G3π. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias jurídicas y políticas.

Vacheyrou, M. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen french farms. *Int J Food microbiol.* 1(46): 253-262.

Valero, K; Rivera, J; valbuena, E; Boscan, I, Valeres, R, Castro, G; Briñez, W.(2012). Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *S. aureus* aisladas de leche cruda y queso artesanal de fincas del Estado Zulia. *Revista científica FCV/LUZ.* XXII(4): 303-312.

Vásquez, S; Lopretti, M; Rey, F; Zunino, P.(2007). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus* spp, para su uso como probióticos en la industria láctea. *Publicac. anual del laboratorio de tecnología del Uruguay. INNTEC.* 2:11-15.

Vásquez, H; Jäger ; Wolter, W; Zschöck, M; Castañeda, M; El-Sayed, A.(2012). Isolation and identification of main mastitis pathogens in México. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(2):337-382.

Verdier-Metz, I; Michel, V, delbés, C; Montel, M.(2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk?. *Food microbiol.* 26(3):305-310.

Verdier-Metz, I ; Gagne, G; Bornes, S; Monsallier, F; Veisseire, P; Delbes-Paus, C; Montel, M.(2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *78(2):326-333.*

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Walsh, C; Meade, J; Mc Gill, K; Fanning, S.(2012).The biodiversity of thermophilic bacteria isolated from whey. Journal of food safety. 32 (2):255-261.

Wattiaux,M.(2005). Investigación y desarrollo internacional de la industria Láctea, Instituto Babcock, Universidad de Wisconsin-Madison.

Yanine, S y Fernando,H. (2010). Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelo de cuencas del río Otón y la Veya. Tesis de grado maestría en ciencias microbiológicas, Universidad nacional de Colombia.

www.bdigital.ula.ve

ANEXO 1.
ENTREVISTA

Fecha

Ubicación

Finca N°

Responsable

Información general:

Sistema de ordeño

Horas de ordeño:

Litros de producción diaria

Destino de la leche ordeñada

Condiciones Higiénico sanitarias del lugar

Instalaciones

Indique con una X la presencia o ausencia de lo indicado a continuación:

Escombros	SI	☐	NO	☐	Desechos	SI	☐	NO	☐
Maquinarias en desuso	SI	☐	NO	☐	Basureros	SI	☐	NO	☐
Relleno sanitario	SI	☐	NO	☐	Plagas evidentes	SI	☐	NO	☐
Animales ajenos al ordeño	SI	☐	NO	☐	Tanque de agua	SI	☐	NO	☐
Existe disponibilidad de agua potable					SI	☐	NO	☐	
Las áreas se encuentran claramente separadas					SI	☐	NO	☐	

Plan Sanitario

Marque con una X donde sea necesario, conteste claramente las siguientes interrogantes:

Existe presencia de médico veterinario en la finca	SI	☐	NO	☐
Existe control de enfermedades de los operarios	SI	☐	NO	☐
Se cuenta con certificado medico vigente	SI	☐	NO	☐

Frecuencia del veterinario en la finca _____

¿Cómo se controla la prevención de enfermedades? (Brucelosis, fiebre aftosa, rabia , entre otros) _____

Indique como es el sistema de vacunación

¿Cómo se realiza la prevención y control de mastitis?

¿Cómo se maneja la erradicación de enfermedades?

¿Cómo se maneja la presencia de animales enfermos?

Programa de limpieza

¿Existe sistema de clasificación de los desechos sólidos? SI ☐ NO ☐

¿Cómo es el control de manejo de residuos y desechos peligrosos?

Existe un programa de limpieza y desinfección SI ☐ NO ☐

¿Cómo se realiza la limpieza y desinfección de los equipos? _____

¿Existe proceso de limpieza y desinfección de los animales pre-ordeño? SI ☐ NO ☐

Luego del ordeño, ¿cómo se conserva la inocuidad de la leche?

En época de invierno ¿aplican alguna medida especial en la higiene y desinfección de las

Instalaciones? SI ☐ NO ☐ ¿Cuál? _____
