

LECHE Y DERIVADOS

Se entiende por leche al producto que surge de la secreción normal de las glándulas mamarias de los mamíferos. Cualquier leche que no haya sido calentada a temperaturas de pasteurización se denomina cruda. Existen varias formas de tratamiento para aumentar la vida útil del producto: la pasterización a 63 - 66°C durante 30 minutos o a 72°C durante 15 segundos y enfriamiento de inmediato a 10°C, el tratamiento UHT a 133°C durante al menos 1 segundo y envasado en recipientes estériles, la filtración, clarificación, homogeneización y envasado seguido de calentamiento a 120°C durante 10 - 30 minutos (1).

La leche es un buen medio de cultivo para el crecimiento de varios microorganismos por su contenido en agua, pH casi neutro, y una amplia variedad de nutrientes como lactosa y diferentes proteínas. Aún cuando la leche posee un alto contenido de lípidos son pocos los microorganismos que los utilizan (2).

La leche contiene varios factores antimicrobianos: lisozima, lactoferrina, proteínas de la leche unidas a vitamina B₁₂ y ácido fólico, lactoperoxidasa e inmunoglobulinas maternas. La lactoferrina tiene la capacidad de quelar el hierro. La lactoperoxidasa cataliza la síntesis de compuestos con efecto inhibidor sobre bacterias pero no levaduras o mohos (1).

Los microorganismos son importantes en la leche y los productos derivados porque producen aromas y propiedades físicas deseables en productos lácteos, pero otros pueden generar alteraciones y algunos patógenos o sus toxinas pueden tornar peligrosos a los productos lácteos (2).

La diversidad en los microorganismos presentes es la responsable de la gran diferencia en las características organolépticas entre los quesos hechos con leche cruda, respecto a los pasterizados. La microbiota dominante incluye: a) bacterias lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, etc), b) *Pseudomonas*, c) *Micrococcaceae* (*Micrococcus* y *Staphylococcus*), y d) levaduras. Otros organismos presentes en la leche cruda son *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Enterobacteriaceae* (*Hafnia*, *Citrobacter*, *Serratia*), *Acinetobacter*,

Alcaligenes, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium* (3).

BACTERIAS LACTICAS

Son bacilos o cocos, gram-positivos, no esporulados y en general catalasa-negativos, con una amplia distribución y adaptabilidad a diferentes ambientes. Pueden producir un pH 4,0 en los alimentos con carbohidratos fermentables, inhibiendo el desarrollo de otras bacterias. Aunque son mesofílicas pueden crecer a 5-45°C (4).

El género *Lactobacillus* se divide en tres grupos: a) homofermentativos obligados (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, etc) son termobacterias que no fermentan pentosas, b) heterofermentativos facultativos (*L. casei*, *L. plantarum*, etc) que fermentan pentosas, c) heterofermentativos obligados (*L. brevis*, *L. reuterii*, etc) que producen CO₂ de glucosa (5).

Los cocos comprenden también a *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, además de los géneros ya nombrados (6). Hay tres grupos genéticamente diferentes de estreptococos: a) *Streptococcus* en la ubre y la cavidad oral, b) *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, etc) propios del intestino y c) *Lactococcus*, en la leche (7).

Los enterococos están con frecuencia en los quesos de leche cruda contribuyendo a las características organolépticas, entre ellos *E. casseliflavus*, *E. faecalis* y *E. durans*. Pero *E. faecium* y *Streptococcus bovis*, que predominan en el intestino vacuno, no se suelen encontrar en la leche ni en el queso (8). Aproximadamente el 10% de la leche cruda contiene diversos fagos de *Lactococcus lactis*, algunos de los cuales son sensibles a la pasteurización, pero el 34% de las cepas industriales son resistentes a la infección por fagos (9).

Las bacterias lácticas poseen propiedades terapéuticas, mostrando una variedad de efectos beneficiosos. La fermentación de la leche por los lactobacilos genera una mayor disponibilidad, digestibilidad y asimilación de sus nutrientes, aumentan la concentración de vitamina B₁, ácido láctico, galactosa, ácidos grasos y elementos esenciales como Ca, P, Mn, Fe y Zn (10). *L. acidophilus* actúa disminuyendo el colesterol en sangre (11). *L. helveticus* produce leche fermentada rica en inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (12).

La hidrólisis de la lactosa mediante la β -galactosidasa y la fermentación de los productos, resultan ser beneficiosas para las personas intolerantes a la lactosa (13).

Las bacterias del ácido láctico y sus metabolitos presentan propiedades anticancerígenas que pueden deberse a: inhibición de células tumorales, supresión de las bacterias productoras de β -glucosidasa, β -glucuronidasa y azorreductasa responsables de la liberación de sustancias cancerígenas a partir de sustratos inocuos, o degradación de sustancias cancerígenas como las nitrosaminas (14, 15).

Son conocidas las propiedades probióticas, con impacto en la salud humana, de la leche fermentada comercial con cepas de *L. casei* y *L. acidophilus* (16, 17, 18). El 51,2% de las células de *L. casei* ingeridas con la leche fermentada sobreviven en el íleo y el 28,4% en el colon (19).

DETERIORO

La leche cruda puede ser alterada por bacterias psicrotróficas, que, en general, son bacilos, no esporulados, gram-negativos, proteolíticos, con algunas cepas lipolíticas. Los más frecuentes son *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* que provocan cambios en el aroma y el sabor del producto refrigerado. Otras especies son *P. fragi*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *Burkholderia cepacia*. Llegan a través del suelo, forraje, agua, los otros animales y también por los utensilios de ordeño y tanques de transporte o almacenamiento mal lavados.

También la leche pasteurizada puede verse contaminada por la exposición al aire o equipos contaminados. El tiempo de generación de estas bacterias en la leche cruda es de 8-12 hs a 3°C y se reduce a 5,5-10 hs a 5°C, y si inicialmente había 1 ufc/mL en 5 días la leche puede estar totalmente alterada (20).

Los bacilos coliformes producen gas a partir de la lactosa mientras que determinadas especies de *Streptococcus*, *Alcaligenes* y *Enterobacter* son responsables de la viscosidad y *P. aeruginosa* y *Serratia marcescens* pueden conferir, respectivamente, color azul y rojo. Es muy difícil producir leche cruda libre de coliformes. No obstante, los altos recuentos son indicadores de malas prácticas de producción, transporte o almacenamiento (5).

En la leche pasteurizada la presencia de bacterias coliformes es inaceptable porque la temperatura de procesamiento las

destruyen así como a la fosfatasa. También la presencia de coliformes puede indicar recontaminación post-pasteurización por los equipos sucios o defectuosos, los operarios o los envases mal desinfectados.

Los miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* llegan a la leche porque se encuentran presentes en las superficies externas de la vaca, el suelo, el forraje o el estiércol. El número, de cien a varios miles por mL, depende de los cuidados en la limpieza y desinfección de las superficies del animal antes del ordeño. El deterioro de las leches ultrapasteurizadas es causado por los esporulados aeróbicos (*Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. sporothermoduans*, *Paenibacillus* spp.), pero los anaeróbicos no parecen ser un problema debido al potencial de reducción relativamente alto (5).

Por otra lado, la maquinaria y/o equipamiento que se utilizan para recolectar la leche contribuyen en un alto porcentaje a la microflora de la leche cruda sino son bien desinfectados. *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* son algunos organismos que llegan a la leche por esta vía.

Los productos lácteos presentan propiedades diferentes a la de la leche fluída porque se han concentrado algunos nutrientes o se han removidos otros, modificando la a_w , el pH y el potencial redox, entre otros parámetros. Por ejemplo, el yogurt tiene pH 4,3 y los quesos pH >5,2, pero éstos tienen una actividad de agua reducida (0,90-0,95) y son sólidos (2).

Algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* suelen formar gran cantidad de D-lactato durante el curado de ciertos quesos, provocando un depósito cristalino blanco en la superficie (21).

Algunas levaduras de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* y *Yarrowia* producen enranciamiento de los productos lácteos y/o formación de gas. Los quesos son susceptibles a la acción de los mohos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Cladosporium* y otros) (22).

MICROORGANISMOS PATÓGENOS

La microbiota normal de la ubre, glándula mamaria de la vaca, está compuesta principalmente por bacterias como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* (alrededor del 50%) seguido por *Corynebacterium* spp, *Escherichia coli* y otros.

Las condiciones anormales debidas a infecciones, enfermedades o prácticas lecheras deficientes pueden afectar la microflora de la leche que procede de la ubre. Las vacas enfermas de mastitis esparcen un gran número de microorganismos y células somáticas en la leche. *Staphylococcus aureus*, los estreptococos *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *E. coli* son las bacterias asociadas con más frecuencia a los casos de mastitis. También han sido aislados *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* y *Corynebacterium bovis* (23).

Las *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* causan la brucelosis en vacas, cabras y ovejas provocando abortos y se debe mantener la vigilancia veterinaria para evitar la difusión de la zoonosis (24).

Después de atravesar la barrera protectora de las mucosas, las brucelas llegan a los ganglios linfáticos donde son fagocitados por los leucocitos macrófagos y polimorfonucleares. Como están protegidas contra la digestión, son capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de estas células. Pueden colonizar casi todos los órganos y tejidos, especialmente bazo, hígado y médula ósea. Durante la eliminación de las brucelas en las células destruidas, se liberan endotoxinas que provocan fiebre.

Debido a que no es probable la multiplicación en la leche, el control más eficaz es eliminar del rebaño a los animales enfermos de brucelosis (25).

Las vacas enfermas también pueden introducir *Mycobacterium bovis* y *M. paratuberculosis*. Los agentes infecciosos como *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp o *Yersinia enterocolitica* suelen ser encontrados en la leche como resultado de contaminación con materia fecal.

M. paratuberculosis ha sido aislado del 1,6% de envases comerciales de leche pasteurizada a 71,7°C durante 15 segundos, proveniente de tambos con el 10-19,7% de vacas con infección entérica subcrónica (26). También *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir a la pasteurización llevada a cabo a esa temperatura (27).

L. monocytogenes fue hallada en 19,6% y *L. innocua* en el 8,5% de la leche del tanque de almacenamiento en una usina láctea (28). *Bacillus cereus* puede producir citotoxinas en crema batida a 8°C pero no en leche fluída (29).

El personal que realiza ordeño manual, práctica poco usual actualmente, pueden introducir en la leche micrococcos y estafilococos procedentes de sus vías respiratorias (5). Algunas cepas de *Lactobacillus buchneri* y *L. brevis* pueden descarboxilar histidina y tirosina conduciendo a la acumulación de aminos vasopresoras en quesos (30).

ANALISIS MICROBIOLOGICO

El Código Alimentario Argentino (CAA) establece límites microbiológicos para leche pasteurizada y en polvo, quesos y otros productos (cuadros 1, 2 y 3). Los límites para leche cruda certificada son ausencia de patógenos y *E. coli*, bacterias coliformes ≤ 10 /mL y bacterias mesófilas $\leq 10^4$ /mL en el momento de la recepción por el consumidor (art 557) (31).

CUADRO 1. Criterios microbiológicos para leche según art. 556, 558, 559 y 567 del CAA (31).

Leche	entera pasterizada	ultrapasterizada	entera en polvo
Recuento en placa de bacterias mesófilas /mL	$\leq 5 \cdot 10^4$ invierno; $\leq 10^5$ verano	n=5 c=2 m=10 M=10 ³	n=5 c=2 m=3.10 ⁴ M=10 ⁵
Recuento a 30°C de coliformes /mL	<50	n=5 c=2 m<3 M=10	n=5 c=2 m=10 M=100
Recuento a 45°C de coliformes /mL	—	n=5 c=1 m<3 M=10	n=5 c=2 m<3 M=10
<i>S aureus</i> coagulasa positiva /g	—	—	n=5 c=1 m=10 M=100
<i>Salmonella</i> spp /25g	—	—	n=10 c=0 m=0
<i>E coli</i>	ausencia en 1 mL	—	—
Fosfatasa y peroxidasa	negativas	negativas	—
Aflatoxina M ₁	0,5 µg/L	0,5 µg/L	5,0 µg/L

Un método rápido para detectar bacterias en leche consiste en la filtración de una dilución a través de una membrana de

polisulfonas que las retiene, y la tinción con azul de toluidina permitiendo la visualización de las mismas. El tratamiento con etanol-ácido acético (pH 2,8-3,0) decolora las gram-negativas (32). También la citometría de flujo de la leche cruda aclarada enzimáticamente, es un análisis rápido con un límite de detección de 10^4 bacterias/mL (33).

Un método específico para la detección de patógenos en la leche, tal como *Listeria monocytogenes*, consiste en un enriquecimiento y cultivo en placa, seguido de la extracción de ADN y la detección por PCR (34). Una técnica más accesible es el ensayo inmunológico conocido como ELISA, usado para detectar *Brucella* spp (31), *Salmonella* spp (35) y otros patógenos en leche.

CUADRO 2. Criterios microbiológicos para quesos con distintos grado de humedad según el art 605 del CAA (31).

Humedad	<36%	>36% y <46%	>46% y <55%	>46% y <55% *	>55% **
Coliformes totales /g (30°C)	n=5 c=2 m=2.10 ² M=10 ³	n=5 c=2 m=10 ³ M=5.10 ³	n=5 c=2 m=5.10 ³ M=10 ⁴	n=5 c=2 m=10 ⁴ M=10 ⁵	n=5 c=3 m=100 M=10 ³
Coliformes /g (45°C)	n=5 c=2 m= 10 ² M=5.10 ²	n=5 c=2 m= 10 ² M=5.10 ²	n=5 c=2 m=10 ³ M=5.10 ³	n=5 c=2 m=10 ³ M=5.10 ³	n=5 c=2 m= 10 M=10 ²
Estafilococos coagulasa positiva /g	n=5 c=2 m=10 ² M=10 ³	n=5 c=2 m=10 ² M=10 ³	n=5 c=2 m=10 ² M=10 ³	n=5 c=2 m=10 ² M=10 ³	n=5 c=2 m= 10 M=10 ²
<i>Salmonella</i> spp /25g	n=5 c=0 m=0	n=5 c=0 m=0	n=10 c=0 m=0	n=10 c=0 m=0	n=10 c=0 m=0
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	-	n=5 c=0 m=0	n=5 c=0 m=0	n=10 c=0 m=0	n=10 c=0 m=0
Mohos y levaduras	-	-	-	-	n=5 c=2 m=5.10 ² M=5.10 ³
* cuartirolo, cremoso y criollo, ** con bacterias lácticas vivas					

CUADRO 3. Criterios microbiológicos para varios productos lácteos según art 576, 592 y 603 del CAA (31).

Productos	leches fermentadas	manteca salada	dulce de leche
Coliformes /g a 30°C	n=5 c=2 m=10 M=100	n=5 c=2 m=10 M=100	—
Coliformes /g a 45°C	n=5 c=2 m<3 M=10	n=5 c=2 m<3 M=10	—
<i>S aureus</i> coagulasa positivo	—	n=5 c=1 m=10 M=100	n=5 c=2 m=10 M=100
<i>Salmonella</i> spp/25 g	—	n=5 c=0 m=0	—
Mohos y levaduras /g	n=5 c=2 m=50 M=200	—	n=5 c=2 m=50 M=100

DETECCION y RECUESTO DE *Staphylococcus aureus*

a. Realizar un hisopado de manos y/o fosas nasales del operador. Hacer estrías con el hisopo sobre una placa de agar Baird Parker.

b. Preparar las diluciones de la muestra (10^{-1} y 10^{-2}). Sembrar 0,1 mL de cada dilución en sendas placas del medio de cultivo y extender con una varilla de vidrio doblada en L. Incubar a 37°C durante 24 - 48 hs.

Observar las colonias circulares, lisas, planas, pequeñas, negras, rodeadas de una zona opaca y con frecuencia una zona clara alrededor de la opaca. Determinar número de ufc/mL.

Tomar varias colonias que presenten las características típicas y repicarlas en caldo infusión de cerebro y corazón. Incubar a 37°C durante 24 hs. Hacer una coloración de Gram y observar los cocos en racimos gram-positivos. Realizar la prueba de catalasa y la de coagulasa, ambas serán positivas.

AGAR BAIRD PARKER. Peptona de caseína 10 g; extracto de carne 5 g, extracto de levadura 1 g, piruvato de sodio 1 g, glicina 1,2 g; cloruro de litio 0,5 g, agar 15 g, agua 1 L, pH 6,8. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Agregar al medio fundido y enfriado a 50°C, 50 mL de la emulsión de yema de huevo al 20% y 5 mL de telurito de potasio al 2%, mezclar y volcar en cajas de Petri.

PRUEBA DE COAGULASA. En un tubo pequeño colocar 0,3 mL de plasma de conejo u otro animal, y añadir 0,1mL del cultivo. Incuba a 37°C y observar la coagulación a las 4, 6 y 24 hs (2).

RECuento DE *Lactobacillus* Y *Enterococcus*

a. Con un sacabocado estéril tomar una porción de queso, descartar los extremos y pesar asépticamente, añadir cloruro de sodio al 0,85% o citrato de sodio al 2%, estéril y a 40°C, para obtener la dilución 10^{-1} . Preparar las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .

b. Tomar 1 mL de la muestra líquida y agregarlo a 9 mL de diluyente. Homoginizar y hacer diluciones decimales.

c. Sembrar 0,1 mL en la superficie de las placas de medio de cultivo extendiendo con una varilla en L.

Colocar las placas de MRS invertidas en el interior de una lata y sobre las mismas una vela encendida, tapar herméticamente. Cuando la llama se ha consumido, la disminución del oxígeno estimula el desarrollo de estas bacterias. Incubar a 37°C durante 24-48 hs. Incubar las placas de MSS a 37°C durante 24-48 hs sin ningún tratamiento especial.

Observar las colonias circulares, pequeñas, con bordes definidos, blancas, opacas, chatas y determinar el número de ufc/g ó mL.

MEDIO DE MAN, ROGOSA, SHARPE (MRS). Peptona de carne 10 g, extracto de carne 10 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 20 g, tween 80 1 mL, acetato de sodio 5 g, citrato triamónico 1 g, fosfato dipotásico 2 g, sulfato de magnesio 0,2 g, pH 6,6. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri (2).

MEDIO SELECTIVO PARA STREPTOCOCCUS (MSS). Peptona de carne 5 g, tripteína 14 g, glucosa 5 g, citrato de sodio 1 g, cloruro de sodio 4 g, azida sódica 0,22 g, sulfito de sodio 0,22 g, L-cisteína 0,22 g, pH 6,5-7,0. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri.

REFERENCIAS

1. ICMSF. 1998. Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, London, p 521.
2. Mossel DA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. 2º ed. Acribia, Zaragoza, p 506, 636.
3. Lafarge V *et al.* 2004. Appl Environ Microbiol 70 : 5644-5650.
4. Sharpe ME. 1981. En: The Prokaryotes. Vol. II. Starr MP *et al.*, eds. Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1679.
5. Jay JM *et al.* 2005. Modern Food Microbiology. 7º ed. Springer, New York, p 149.
6. Ludwig W *et al.* 1985. J Gral Microbiol 131: 543-551.
7. Schleifer KH *et al.* 1985. Syst Appl Microbiol 6: 183-195.
8. Gelsomino R *et al.* 2002. Appl Environ Microbiol 68: 3560-3565.
9. Madera C *et al.* 2004. Appl Environ Microbiol 70: 7365-7371.
10. Mc Donough FE *et al.* 1983. Fed Proc 42: 556.

11. De Smet I *et al.* 1995. *J Appl Bacteriol* 79:292-301.
12. Fuglsang A *et al.* 2002 *Appl Environ Microbiol* 68: 3566-3569.
13. Gilliland SE, Kim HS. 1984. *J Dairy Sci* 67: 1-6.
14. Goldin BR, Gorbach SL. 1984. *Am J Clin Nutr* 39: 756-761.
15. Goldin BR, Gorbach SL. 1977. *Cancer* 40: 2421-2426.
16. González S *et al.* 1990. *M A N* 8: 349-354.
17. Apella MC *et al.* 1992. *J Appl Bacteriol* 73: 480-483.
18. Perdigón G *et al.* 1991. *Food Agricult Immunol* 3: 93-102.
19. Oozeer R *et al.* 2006. *Appl Environ Microbiol* 72: 5615-5617.
20. Dogan B, Boor KJ. 2003. *Appl Environ Microbiol* 69: 130-138.
21. Rengpipat S, Johnson EA. 1989. *Appl Environ Microbiol* 55: 2579-2582.
22. Doyle MP *et al.*, eds. 1997. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers.* ASM, Washington, p 101.
23. Downes FP, Ito K. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* 4^a ed. American Puublic Health Association, Washington, p 483.
24. Funk ND *et al.* 2005. *J Clin Microbiol* 43: 721-725.
25. ICMSF. 1996. *Microbiología de los Alimentos. Características de los Patógenos Microbianos.* Acribia, Zaragoza, p 43.
26. Ayele WY *et al.* 2005. *Appl Environ Microbiol* 71: 1210-1214
27. Doyle MP *et al.* 1987. *Appl Environ Microbiol* 53: 1433-1438.
28. Waak E *et al.* 2002. *Appl Environ Microbiol* 68: 3366-3370.
29. Christiansson A *et al.* 1989. *Appl Environ Microbiol* 55: 2595-2600.
30. Joosten HMLJ, Northolt MD. 1989. *Appl Environ Microbiol* 55: 2356-2359.
31. Código Alimentario Argentino. Cap 8. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>
32. Yazdankhah SP *et al.* 2001. *J Clin Microbiol* 39: 3228-3233.
33. Gunasekera TS *et al.* 2000. *Appl Environ Microbiol* 66: 1228-1232.
34. Thomas E J *et al.* 1991 *Appl Environ Microbiol* 57: 2576-2580.
35. Veling J *et al.* 2001. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 8: 1049-1055.