



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E
INDUSTRIAS**

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DEL SUERO DE QUESO
FRESCO PASTEURIZADO DE LOS PRODUCTORES
LÁCTEOS DEL CANTÓN MEJÍA – PARROQUIA MACHACHI**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA DE ALIMENTOS**

JOYCE MICHELLE ALVEAR LUZURIAGA

DIRECTOR: ING. MANUEL CORONEL

CODIRECTOR: LIC. LUIS ALBERTO VALDÉS

Quito, Julio 2016

© Universidad Tecnológica Equinoccial. 2016
Reservados todos los derechos de reproducción.

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

PROYECTO DE TITULACIÓN

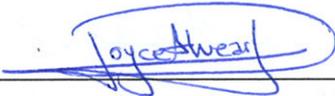
DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1726835786
APELLIDO Y NOMBRES:	Alvear Luzuriaga Joyce Michelle
DIRECCIÓN:	Madroños n47e y Av. El Inca
EMAIL:	aljm1027303@ute.edu.ec
TELÉFONO FIJO:	022408056
TELÉFONO MOVIL:	0992802576

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Estudio microbiológico del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi
AUTOR O AUTORES:	Joyce Michelle Alvear Luzuriaga
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Julio, 2016
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Ing. Manuel Coronel
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero de Alimentos
RESUMEN: Mínimo 250 palabras	El presente trabajo tuvo como objetivo, determinar la calidad microbiológica del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi. Para ésto, se realizó un levantamiento de información, con el fin, de seleccionar cinco productores de queso fresco y realizar un estudio microbiológico de cada lactosuero, basado principalmente, en la normativa ecuatoriana para requisitos microbiológicos de suero de leche líquido. Posterior a la recolección de muestras, el estudio microbiológico se dividió en tres fases de experimentación: análisis inicial de la

	<p>muestra (inoculación directa), diluciones (inoculación de diluciones) y método de conteo directo (tinción Gram). Estas fases fueron realizadas para los siguientes microorganismos: aerobios mesófilos (género <i>Staphylococcus</i>, género <i>Streptococcus</i>, género <i>Campylobacter</i>), hongos filamentosos, levaduras, género <i>Salmonella</i>, género <i>Listeria</i>, <i>Escherichia coli</i> y género <i>Bacillus</i>; a estos, se estimuló el crecimiento haciendo uso del método tradicional de preparación de diferentes medios de cultivo sólidos. Los resultados microbiológicos obtenidos para las cinco empresas, en términos generales, presentaron una elevada carga microbiana en todas las muestras de lactosuero, con presencia además, de microorganismos patógenos. La contaminación microbiológica encontrada en las muestras de lactosuero, podría originarse de materias primas, utensilios o provenir de los manipuladores encargados del proceso de elaboración de queso fresco.</p>
<p>PALABRAS CLAVE:</p>	<p>Lactosuero, estudio microbiológico, microorganismos, inocuidad alimentaria</p>
<p>ABSTRACT:</p>	<p>The present investigation had as its main goal; to determinate the microbiological quality of pasteurized fresh cheeses´ whey of the dairy producers in the cantón Mejía – parroquia Machachi. Therefore, an initial recollection of information, to select five medium fresh cheese production companies and elaborate a microbiological study of each of its whey; perhaps based in the Ecuadorian normative for milk´s liquid whey microbiological requirements. Consequently, the samples processing, the microbiological study was divided in three types of experimentation: initial</p>

	<p>analysis of the sampling (direct inoculation), dissolutions' methods (dilution's inoculation) and direct counting method (Gram staining). These phases were done by the following microorganisms: aerobic mesophilics, <i>Staphylococcus</i> gender, <i>Streptococcus</i> gender, <i>Campylobacter</i> gender, filamentous fungi, yeast, <i>Salmonella</i> gender, <i>Listeria</i> gender, <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus</i> gender; to which, its development was stimulated by using the traditional preparation method of solid culture media. The microbiological results obtained among the five companies, in general terms, showed a high amount of microbial presence in all the whey samples, even, of pathogens microorganisms. The microbiological contamination found in the whey' samples, it can be originated by raw materials, utensils or the manipulators in charge of the fresh cheese elaboration.</p>
KEYWORDS:	Whey, microbiological analysis , microorganisms, food safety

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.

f:  _____

Alvear Luzuriaga Joyce Michelle

1726835786

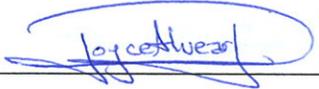
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **ALVEAR LUZURIAGA JOYCE MICHELLE**, CI 1726835786 autor/a del proyecto titulado: **Estudio microbiológico del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi** previo a la obtención del título de **INGENIERO DE ALIMENTOS** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, Julio 2016

f: _____


Alvear Luzuriaga Joyce Michelle

1726835786

DECLARACIÓN

Yo **JOYCE MICHELLE ALVEAR LUZURIAGA**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y; que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.



Joyce Michelle Alvear Luzuriaga

C.I. 1726835786

CODIRECTOR DEL TÍTULO

C.I. 1726835786

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título "**Estudio microbiológico del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi**", que, para aspirar al título de Ingeniero de Alimentos fue desarrollado por Joyce Michelle Alvear Luzuriaga, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 19, 27 y 28.



Ing. Manuel Coronel

DIRECTOR DEL TRABAJO

C.I. 171062522-7



Lic. Luis Alberto Valdés Silverio (MSc)

CODIRECTOR DEL TRABAJO

C.I. 1754572822

DEDICATORIA

A mi padre, el pilar fundamental de mi vida. Gracias por ser incondicional.
Sólo espero retribuirte todo lo que has hecho por mí y no defraudarte nunca.
Las palabras son pocas pero los sentimientos son demasiado grandes.

Te amo papi.

AGRADECIMIENTO

A esa energía suprema que cada persona siente y vive de diferente manera,
sólo gracias por todo.

A mi madre, que la amo mucho a pesar de lo que ella crea. Gracias por todo
mami y espero que algún día podamos compartir ese vínculo que deberían
tener una madre y una hija.

A mis hermanas, porque la diferencia de edad que tenemos, ha servido para
que en ocasiones sean como otras mamás y corra a pedir su ayuda como
cuando era niña. Las amo mucho hermanas, gracias por los hermosos
regalos que me han dado en mis sobrinos (espero que algún día, más que
una tía, sea una amiga amiga para ustedes cuatro).

Los recuerdos siempre estarán en mi corazón y yo siempre estaré para
ustedes.

A mi hermano, porque el aparentemente “Corto” tiempo que nos conocemos,
ha formado en mi corazón un gran lazo, que a pesar de lo que suceda entre
nosotros, siempre va a permitir que sea incondicional para tí y te ame tal y
como eres mi Bob.

A mi tía, Germania Luzuriaga, gracias porque cada vez que te veo,
recuerdas cada detalle pequeño de mi vida y me escuchas como una madre.
Te quiero muchísimo tía.

A la persona que es una guía espiritual en mi vida y siempre verla es
sinónimo de luz, Esperanza Loyola. No se imagina el gran apoyo y
tranquilidad que es para mí.
Gracias Esperancita por ser y estar.

A Estefy, gracias amiga por ser realmente eso, una amiga. Aunque tengamos grandes diferencias de personalidad y no nos aprobemos algunas cosas entre sí, de esa misma forma, nos parecemos en muchas cosas. Gracias por escucharme siempre e incluso secar mis lágrimas; te quiero amiga y no te olvides de que siempre estaré cuando me necesites.

Nico!!!, gracias por compartir este laaaaargo y a la vez corto camino que fue la universidad, por las cosas sin sentido que a veces hacíamos y a Estefy le daban vergüenza e iras jaja... Te quiero Nico y te deseo siempre lo mejor!!!.

Pablito, gracias por siempre estar para mí, así sea para tomar un café y conversar. Te quiero!!!.

Silvana!!! Gracias porque especialmente, en las últimas fases de esta carrera de la vida llamada universidad, compartimos muchas cosas importantes.

A una de las personas que siempre será de las más especiales en mi vida, Jose. Gracias por hacerme fuerte, y ahora, día a día, esforzarte para que yo pueda ver un nuevo lado de las cosas, y más que todo, un nuevo lado de nosotros. Te amo y siempre estaré para tí.

Gracias Lizz, Rubén y Pato, porque son de esas personas que conoces en poquito tiempo y llegan a ocupar un gran lugar en tu corazón. Que la rumba de la vida sea hasta el final.

Gracias por todo y espero siempre estar cuando me necesiten.

A Belén y Serg. Gracias por ser como son, por favor, quédense así. Mi Belenchis!!! Gracias porque eres de esas personas que para cualquier cosa están ahí, así sea para hacer las cosas que hacemos "Rara vez" jaja y que luego decimos: somos las peores!!! Jaja. Te quiero amiga.

Serg!!! Aunque a veces te quiera matar jaja, y de seguro, tú a mí, te quiero un montón. Gracias por hacerme reír siempre y también escuchar cuando debes; tú eres parte de una gran etapa en mi vida.

A los ingenieros Manuel Coronel, Elena Beltrán y Carlos Gonzáles, por su apoyo en la culminación de esta última fase de la vida universitaria. Gracias por su cooperación y comprensión.

Gracias al Lic. Luis Alberto Valdés, por su guía y soporte en la realización de este trabajo. Mi admiración por todo su conocimiento en el área de Microbiología y mi respeto por decir siempre exactamente lo que piensa.

Finalmente, a todas esas personas que estuvieron en todo este transcurso directa o indirectamente. Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 SUERO DE LECHE	3
2.1.1 DEFINICIÓN	3
2.1.2 TIPOS DE SUERO DE LECHE	3
2.1.2.1 Suero dulce	4
2.1.2.2 Suero ácido	4
2.1.3 COMPOSICIÓN DEL SUERO DULCE DE LECHE	5
2.1.3.1 Proteína	5
2.1.3.2 Grasa	9
2.1.3.3 Lactosa	10
2.1.3.4 Vitaminas	10
2.1.3.5 Minerales	11
2.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	12
2.2.1 MICROBIOLOGÍA DEL SUERO DULCE DE LECHE	12
2.2.1.1 Microbiología intrínseca del lactosuero	12
2.2.1.2 Microbiología extrínseca del lactosuero	15
2.3 CANTÓN MEJÍA	19
2.3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	19
2.3.2 DIVISIÓN POLÍTICA	20
2.3.3 GENERALIDADES DEL CANTÓN	21
2.3.4 SISTEMA ECONÓMICO	22
2.3.4.1 Agricultura y Ganadería	22
3. METODOLOGÍA	25
3.1. MATERIALES	25
3.1.1. MATERIA PRIMA	25
3.1.2. INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	25
3.1.3. REACTIVOS	25

	PÁGINA
3.2 HERRAMIENTAS / TÉCNICAS	26
3.2.1. EQUIPOS	26
3.2.2. NORMATIVA	26
3.3 MÉTODOS	26
3.3.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	27
3.3.2 TIPOS DE EXPERIMENTO	28
3.3.2.1 Análisis inicial de la muestra	28
3.3.2.2 Método de diluciones	31
3.3.2.3 Método de conteo directo	40
3.3.3 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MILILITRO DE DILUCIÓN (UFC/ML) Y CONCENTRACIÓN TOTAL DE MICROORGANISMOS EN LA MUESTRA (UFC/ML)	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 RESULTADOS ENCUESTAS REALIZADAS A PRODUCTORES LÁCTEOS DEL CANTÓN MEJÍA – PARROQUIA MACHACHI	42
4.2 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALDL	44
4.3 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALN	49
4.4 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALSM	53
4.5 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALDA	58
4.6 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALK	61
4.7 TINCIÓN GRAM DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE LACTOSUERO DE LOS PRODUCTORES LÁCTEOS	64
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
5.1 CONCLUSIONES	73
5.2 RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	86

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1 Composición de la proteína de leche	9
Tabla 2 Composición lactosuero dulce y ácido	11
Tabla 3 Características generales del cantón Mejía	22
Tabla 4 Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido	43
Tabla 5 Presencia / Ausencia de microorganismos en inoculación directa	44
Tabla 6 Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALDL)	45
Tabla 7 Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALN)	49
Tabla 8 Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALSM)	54
Tabla 9 Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALDA)	59
Tabla 10 Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALK)	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 Ubicación del cantón Mejía, con respecto, a la provincia de Pichincha	20
Figura 2 Mapa político del cantón Mejía	21
Figura 3 Concentración de microorganismos por ml de muestra en una dilución (ALDL)	46
Figura 4 Concentración de microorganismos por ml de muestra en una dilución (ALN)	50
Figura 5 Concentración de microorganismos por ml de muestra en una dilución (ALSM)	54
Figura 6 Concentración de microorganismos por ml de muestra en una dilución (ALDA)	60
Figura 7 Concentración de microorganismos por ml de muestra en una dilución (ALK)	63
Figura 8 Microorganismos aerobios mesófilos (agar Macconkey: placa Petri y tinción Gram)	64
Figura 9 Géneros <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptotoccus</i> y <i>Campylobacter</i> (agar sangre: caja Petri y tinción Gram)	66
Figura 10 <i>Escherichia coli</i> (aga TSA: caja Petri y tinción Gram)	67
Figura 11 Género <i>Salmonella</i> (agar SS: caja Petri y tinción Gram)	68
Figura 12 Género <i>Listeria</i> (agar Oxford: caja Petri y tinción Gram)	70
Figura 13 Género <i>Bacillus</i> (agar MYP: caja Petri y tinción Gram)	71

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Encuesta realizada a productores lácteos	86
ANEXO II	
Resultados de la encuesta	89

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo, determinar la calidad microbiológica del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi. Para ésto, se realizó un levantamiento de información, con el fin de seleccionar cinco medianas empresas productoras de queso fresco y realizar un estudio microbiológico de cada lactosuero, basado principalmente, en la normativa ecuatoriana para requisitos microbiológicos de suero de leche líquido. Posterior a la recolección de muestras, el estudio microbiológico se dividió en tres fases de experimentación: análisis inicial de la muestra (inoculación directa), diluciones (inoculación de diluciones) y método de conteo directo (tinción Gram). Estas fases fueron realizadas para los siguientes microorganismos: aerobios mesófilos (género *Staphylococcus*, género *Streptococcus*, género *Campylobacter*), hongos filamentosos, levaduras, género *Salmonella*, género *Listeria*, *Escherichia coli* y género *Bacillus*; éstos se inocularon, haciendo uso del método tradicional de preparación de diferentes medios de cultivo sólidos. Los resultados microbiológicos obtenidos para las cinco empresas, en términos generales, presentaron una elevada carga microbiana en todas las muestras de lactosuero, con presencia además, de microorganismos patógenos. La contaminación microbiológica encontrada en las muestras de lactosuero, podría originarse de materias primas, utensilios o de los manipuladores encargados del proceso de elaboración de queso fresco.

ABSTRACT

The present investigation had as its main goal; to determinate the microbiological quality of pasteurized fresh cheeses' whey of the dairy producers in the cantón Mejía – parroquia Machachi. Therefore, an initial recollection of information, to select five medium fresh cheese production companies and elaborate a microbiological study of each of its whey; perhaps based in the Ecuadorian normative for milk's liquid whey microbiological requirements. Consequently, the samples processing, the microbiological study was divided in three types of experimentation: initial analysis of the sampling (direct inoculation), dissolutions' methods (dilusion's inoculation) and direct counting method (Gram staining). These phases were done by the following microorganisms: aerobic mesophilics, *Staphylococcus* gender, *Streptococcus* gender, *Campylobacter* gender, filamentous fungi, yeast, *Salmonella* gender, *Listeria* gender, *Escherichia coli* y *Bacillus* gender; which were inoculated by using the traditional preparation method of solid culture media. The microbiological results obtained among the five companies, in general terms, showed a high amount of microbial presence in all the whey samples, even, of pathogens microorganisms. The microbiological contamination found in the whey' samples, it can be originated by raw materials, utensils or the manipulators in charge of the fresh cheese elaboration.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En Ecuador, principalmente en la región interandina, las actividades económicas ligadas a la industria lechera han crecido notablemente en los últimos años, por lo que, la optimización de la cadena de suministros resulta de gran importancia para reducir pérdidas en el proceso, haciendo uso de los subproductos de determinadas actividades involucradas durante la producción (Jácome & Molina, 2014).

Debido al desperdicio o falta de aprovechamiento del lactosuero, se deben tomar acciones para mejorar sus usos, tomando en cuenta su alto valor nutritivo: aproximadamente 50 % de los sólidos de la leche, 25 % de las proteínas, 7 % de la grasa, 95 % de los minerales y casi el 50 % de los minerales. Sin embargo, dichas cualidades pueden perder su valor, si se encuentra el lactosuero contaminado (Jácome & Molina, 2014).

Por esta razón, un estudio microbiológico preliminar del suero de queso fresco es crucial para la determinación del cumplimiento de ciertos parámetros de calidad, referentes a la inocuidad alimentaria. Todo esto, con la finalidad, de transformar este tipo de subproductos mediante el uso de nuevas tecnologías, para la obtención de productos, que además, sean inocuos para los seres humanos y conserven sus propiedades nutricionales. Es decir, del lactosuero, podrían obtenerse proteínas, bebidas lácteas no fermentadas y fermentadas, entre otros productos funcionales, siempre y cuando, se garantice su inocuidad (Hernández & Vélez, 2014).

La Universidad Tecnológica Equinoccial se encuentra integrada en la Red Temática de Lácteos y Derivados Funcionales (RTLDF) propuesta por la Red de Universidades para la Investigación (REDU). Participa activamente en la aplicación de alternativas de uso tecnológico del suero de leche en Ecuador, por lo que, el tema de estudio a realizar tiene gran importancia en este sentido.

Las actividades experimentales de investigación, se realizarán en los laboratorios de Microbiología de la Universidad Tecnológica Equinoccial y la Universidad Politécnica Salesiana.

El presente trabajo tuvo como objetivo general, determinar la calidad microbiológica del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi.

Para cumplir con este objetivo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la línea base de producción de suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi.
- Identificar los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi, con los que se trabajará en el estudio microbiológico de sus lactosueros.
- Caracterizar los aspectos microbiológicos del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos identificados del cantón Mejía – parroquia Machachi.

2. MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1 SUERO DE LECHE

2.1.1 DEFINICIÓN

El suero de leche, lactosuero o suero de queso, corresponde, al líquido de aspecto turbio, color verdoso - amarillento, de sabor fresco y lánguidamente dulce; que se obtiene, posterior a, la precipitación y disociación de la caseína (proteína de la leche) en la elaboración de queso. Es decir, este líquido representa a la fase hídrica de la leche y se produce durante su coagulación, después de que se separa de la cuajada (Córdoba, 2013; Vega, 2012).

Presenta el contenido mayoritario (50 % aproximadamente) de sustancias solubles provenientes de la leche: proteína, lactosa, cierta cantidad de grasa y sales; y representa desde un 80 % a 90 % del volumen total de leche que ingresa a formulación para fabricar queso (Sánchez, Gil, Gil, Giral, Millán, & Villada, 2009; Veral, Totosaus, Hernández, Soto, & Bolaños, 2008).

2.1.2 TIPOS DE SUERO DE LECHE

Para la diferenciación de los tipos de lactosuero, se utiliza como parámetro el pH, por lo que, dependiendo del tipo de coagulación en la elaboración de queso: enzimática, ácida o mixta, se obtendrán ciertas características específicas en el suero de queso, que además, dependen de aspectos como: procedencia de la leche, tipo de queso, variaciones del proceso de elaboración del mismo. Cabe recalcar, que sobre las características del suero de quesería, influyen directamente las características de la cuajada, y éstas se ven influenciadas por la composición del coágulo, rigor del trabajo

mecánico, pH, temperatura, y en general, las condiciones mismas del proceso.

Existen dos tipos principales de lactosuero, procedentes de la fabricación de queso y vinculados directamente con la coagulación de la leche durante el proceso: lactosuero dulce o enzimático y lactosuero ácido (Faría, Coromoto, & Hernández, Efecto de la tecnología quesera sobre la composición del suero lácteo, 2002).

2.1.2.1 Suero dulce

Se genera por coagulación enzimática, cuando se añade una enzima proteolítica, con el fin, de inducir la etapa de coagulación durante la elaboración de queso. El fenómeno producido, consiste en la hidrólisis de la caseína de la leche, dando lugar a dos fases: hidrófila (caseinomacropéptido) e hidrófoba (paracaseína); es decir, se genera una precipitación de las proteínas de la leche, por la formación de micelas (conjuntos de moléculas) (Córdoba, 2013).

En el lactosuero dulce existe casi nulidad de presencia de ácido láctico, debido a que, prácticamente, no se desarrollan sus microorganismos productores. El pH del suero de queso dulce, presenta valores mayores a 5.8 y es un producto de la elaboración de quesos duros, semiduros y frescos química más estable (Vega, 2012).

2.1.2.2 Suero ácido

Se genera por coagulación ácida, por la adición de un ácido mineral u orgánico o por la acción de los microorganismos propios de la leche. Cuando el valor de pH llega a 4.6, que corresponde al punto isoeléctrico de las caseínas, están floculan formando un precipitado más o menos granuloso, pero si la

acidificación se da lentamente, se formará un coágulo liso y homogéneo que ocupará el volumen inicial de la leche (Córdoba, 2013).

Consiste en un suero de quesería con mayor cantidad de calcio y fosfatos, en relación, al suero dulce. Sin embargo, contiene menor cantidad de lactosa que éste (Endara, 2002; Vega, 2012).

2.1.3 COMPOSICIÓN DEL SUERO DULCE DE LECHE

La composición química del lactosuero está íntimamente relacionada con aspectos como la composición de la leche utilizada y el tipo de queso elaborado, ya que, a partir, de dicho procedimiento, se obtendrá la cuajada por acidificación o adición de cuajo, y por ende, sus características serán variables entre sí (Morales, 2011).

2.1.3.1 Proteína

Con relación al queso, el suero de quesería contiene un porcentaje bajo de proteínas (0.6 %), sin embargo, son de mayor calidad nutritiva que las proteínas no solubles de la caseína que compone el queso, ya que, constituyen una fuente balanceada de aminoácidos esenciales, además, son de alto valor biológico (por su contenido en leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados). En general, las proteínas del lactosuero, representan un conjunto sustancias nitrogenadas solubles (no precipitan cuando el pH de la leche es llevado a 4.6) (Córdoba, 2013; Parra, 2009; Vega, 2012).

Corresponden, con aproximadamente el 20 % de las proteínas de la leche bovina. Dentro de este porcentaje, la β -lactoglobulina (β -LG) ocupa cerca del 10 % y la α -lactoalbúmina el 4 %; además, existen inmersas otras proteínas. Es importante desatacar los diferentes métodos de fraccionamientos, dan lugar, a la distinción de cuatro fracciones principales de proteínas: albúminas,

globulinas, fracción proteosa - peptosa, proteínas menores (Córdoba, 2013; Endara, 2002; Parra, 2009; Vega, 2012).

Sin embargo, de no ser numerosas dentro de la composición de este subproducto de la industria láctea, a las proteínas se les otorga el carácter de funcionalidad del lactosuero; es por ésto, que en la actualidad, el suero de leche es altamente utilizado en la industria alimenticia (Morales, 2011).

- **β -lactoglobulina**

Proteína del lactosuero perteneciente al grupo de las albúminas, que representa aproximadamente el 60 % de éstas. Ciertos autores han planteado su posible papel, como regulador del metabolismo de fosfatos dentro de la glándula mamaria (Vega, 2012).

La β -Lactoglobulina es no soluble en agua destilada, pero sí en diluciones de sales. Esta proteína es algo termolábil, desnaturalizándose y precipitando a una temperatura menor a 73 °C, decir, no tolera temperaturas de pasteurización.

No se encuentra presente en la leche humana, razón por la cual, se la considera como el factor causante de ciertas reacciones alérgicas en bebés alimentados con fórmulas maternas (Córdoba, 2013; Endara, 2002).

- **α -lactoalbúmina**

Proteína del lactosuero perteneciente al grupo de las albúminas, que representa el 25 % de éstas. Su función primordial es la biosíntesis de la lactosa dentro de las glándulas mamarias de todos los mamíferos, mediante el uso de glucosa y galactosa; además, consiste en una fuente de aminoácidos como triptófano y cisteína (Córdoba, 2013).

La α -lactoalbúmina es la proteína del lactosuero menos termolábil y presenta estabilidad en pH 5.4 (Endara, 2002; Vega, 2012).

- **Albúmina sérica**

Llamada también seroalbúmina bovina, consiste en una proteína globular que forma parte del lactosuero y es idéntica a la seroalbúmina sanguínea, tanto en, composición, como en peso molecular y otras características. Corresponde, al 5 % de proteínas solubles de la leche bovina (Barrionuevo, 2011; Córdoba, 2013).

- **Proteopeptonas**

Conformadas por una mezcla heterogénea de polipéptidos, constituyen casi el 10 % de las proteínas del lactosuero. Dentro de sus principales características, se puede mencionar su alta estabilidad térmica, ya que, sus componentes continúan siendo solubles después de soportar temperaturas de calentamiento de 95 °C, durante 20 a 30 minutos y con un pH 4.6 de acidificación (Córdoba, 2013; Vega, 2012).

- **Inmunoglobulinas**

Se consideran como las moléculas más termoresistentes y de mayor tamaño presentes en la leche. Están presentes dentro del conjunto de proteínas solubles del lactosuero, en un porcentaje de 10 % al 12 %. Son proteínas con capacidad inmunológica, ya que, reconocen antígenos y se unen a ellos, con el fin, de destruirlos; constituyéndose como anticuerpos sintetizados, en respuesta, al estímulo de los antígenos mencionados (Barrionuevo, 2011).

Las inmunoglobulinas son de las primordiales sustancias antibacterianas de la leche cruda, ligando varios tipos de bacterias y esporas. Su cantidad en

composición es escasa y provienen de la sangre o se sintetizan en el interior de la glándula mamaria (Córdoba, 2013).

- **Proteínas menores**

Representan aproximadamente el 5 % de las proteínas presentes en el lactosuero. Debido a, su escaso porcentaje, estas proteínas son difíciles de clasificar (Vega, 2012).

Dentro de este pequeño grupo se encuentran las metaloproteínas, llamadas así, por su capacidad de fijar hierro y cobre (irreversiblemente). Se pueden mencionar las siguientes:

- Lactoferrina: es diferente a la lactoferrina sanguínea y tiene inclinación por el hierro, por lo que, cumple un papel importante en la introducción del mismo en la leche, a través, de la sangre.
- Transferrina: posee la capacidad de fijar hierro.
- Ceruloplasmina: posee la capacidad de fijar cobre (Córdoba, 2013).

En general, las proteínas presentes en la composición del lactosuero, se encuentran vinculadas directamente con las proteínas de la leche, las cuales, se encuentran dispuestas en este producto, como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la proteína de la leche

Aminoácido	Proteína (g/100g)
Proteínas del suero	19
α-lactoalbúmina	9.8
β-lactoglobulina	3.7
Albúmina	1.2
Proteopeptonas	2.4
Inmunoglobulinas	2.4
Lactoferrina	
Transferrina	
Proteínas de la membrana del glóbulo de grasa	2

(Córdoba, 2013)

2.1.3.2 Grasa

Una de sus principales funcionalidades, es la de ser una excelente fuente de energía. Inmersa en el lactosuero, la grasa de la leche se presenta, a manera, de glóbulos grasos emulsionados, en suspensión en la fase acuosa del suero.

La composición de la materia grasa, en su mayoría, la constituyen los triglicéridos (98 %), a continuación, fosfolípidos (0.5 % - 1 %) y otras sustancias. Este componente, se encarga de transportar vitaminas liposolubles (A, D, E, entre otras) (Hernández, 2013).

Es importante mencionar, que el porcentaje de grasa en lactosuero, presentará variación, de acuerdo, a su tipo. El lactosuero dulce contiene de 0.2 % - 0.7 % de materia grasa, mientras que, el lactosuero ácido muestra un contenido de 0.04 % (Morales, 2011).

2.1.3.3 Lactosa

Consiste en el principal componente del lactosuero, ya que, ocupa el 73 % de la totalidad de sólidos o materia seca del mismo (Endara, 2002).

Al ser un carbohidrato de fácil asimilación, se establece como una buena fuente de energía para el organismo humano, y posee un poder edulcorante de 20 % a 30 %, con relación, al de la sacarosa. Por esta razón, se utiliza para la elaboración de medio de cultivo y leches maternizadas, a nivel industrial (Hernández, 2013).

La lactosa puede ser transformada en ácido láctico, principalmente, por la acción de bacterias (Vega, 2012).

2.1.3.4 Vitaminas

El porcentaje bajo en grasa del lactosuero, influye directamente en su contenido en vitaminas liposolubles. Sin embargo, presenta ácido ascórbico y varias vitaminas del grupo B: tiamina (B1), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), cobalamina (B12); que hacen de este subproducto, un medio ideal para el desarrollo de fermentaciones (Vega, 2012).

2.1.3.5 Minerales

Con relación a la leche bovina, el lactosuero puede tener en composición, alrededor, del 90 % de sus minerales: calcio, fósforo, potasio, magnesio y sodio; que se trasladan a este subproducto de la industria lechera, posterior a, la fase de coagulación de la proteína durante la producción de la cuajada (Poveda, 2013).

En cuanto, a lo anteriormente mencionado acerca de la composición del lactosuero, como se muestra en la Tabla 2, dicha composición puede diferir, dependiendo del tipo de lactosuero (dulce y ácido).

Tabla 2. Composición lactosuero dulce y ácido

Componente	Lactosuero dulce (g/lt)	Lactosuero ácido (g/lt)
Sólidos totales	6.3	63 – 70
Lactosa	63 - 70	44 - 46
Proteína	46 – 52	6 – 8
Calcio	6 – 10	1.2 – 1.6
Fosfatos	0.4 – 0.6 1 – 3	2 – 4.5
Lactato	2	6.4
Cloruros	1.1	1.1

(Morales, 2011)

2.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

2.2.1 MICROBIOLOGÍA DEL SUERO DULCE DE LECHE

Al originarse de la leche, el lactosuero contiene intrínsecamente las propiedades que debe poseer un medio de cultivo, tales como, alto porcentaje de humedad, pH cercano a la neutralidad y nutrientes de gran valor biológico; estos últimos, se encuentran en forma de carbohidratos (lactosa), compuestos nitrogenados y grasas. En este sentido, los microorganismos sacarolíticos, proteolíticos y lipolíticos, pueden aprovechar altamente, la lactosa, proteína y grasa del lactosuero, respectivamente (Moreno, 2015).

2.2.1.1 Microbiología intrínseca del lactosuero

Corresponden, a un grupo de bacterias anaerobias aerotolerantes, no esporuladas y Gram positivas, que fermentan la lactosa para producir ácido láctico, con el fin, de producir energía para su metabolismo. Es por ésto, que la leche y sus derivados, más aún el lactosuero que contiene alrededor del 73 % de su totalidad en lactosa (Endara, 2002), constituyen un medio ideal para el desarrollo y crecimiento de bacterias acidolácticas. Dentro de este conjunto de microorganismos, existen dos grupos:

- **Bacterias acidolácticas homofermentativas**

Originan de su proceso fermentativo, únicamente ácido láctico. Los géneros: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* pertenecen a este grupo (Rodríguez & Torres, 2006).

- **Género *Streptococcus***

Cocos Gram positivos anaerobios facultativos, esféricos u ovalados, con un diámetro de 1 a 1.5 μm disponen a pares o en cadena por la existencia de puentes de pared celular. Dentro de su metabolismo, fermentan la glucosa con producción de ácidos.

Consiste en un grupo heterogéneo muy diverso, ya que, algunos son saprófitos (organismos que ingieren sustancias orgánicas en descomposición), otros componen la flora normal del organismo, y finalmente, los que son patógenos, tienen la capacidad de ocasionar infecciones diversas (Pimienta & Vergara, 2007).

- **Género *Pediococcus***

Bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas no patógenas. En su metabolismo, generan ácido láctico D o L y no endosporas.

No producen acidificación de la leche, ya que, no son capaces de fermentar lactosa (Pimienta & Vergara, 2007).

- **Género *Lactobacillus***

Microorganismos Gram positivos, microaerófilos (requieren atmósfera con baja tensión de oxígeno) o anaerobios, y algunos pueden desarrollar la capacidad de crecer en presencia de oxígeno. Algunos bacilos forman parte de la flora intestinal normal (Pimienta & Vergara, 2007).

Poseen necesidades metabólicas complejas y variadas entre los organismos del género, principalmente, de ciertos aminoácidos, riboflavina, piridoxina, biotina, tiamina, ácido fólico y ácido nicotínico. En este sentido, se dan lugar a dos grupos de lactobacilos, de acuerdo, a los productos originados, a partir,

de la fermentación del azúcar: homofermentativo (transforma casi la totalidad del azúcar fermentada, en ácido láctico) y heterofermentativo (generan cantidades significativas de otros productos de fermentación, tales como, bióxido de carbono, etanol y ácido acético) (Pimienta & Vergara, 2007).

- ***Lactobacillus bifidus***

Bacteria anaerobia con forma de bastón, similar al *Lactobacillus acidophilus*. Su metabolismo genera ácido láctico, a través, de azúcares, y además, fermenta insulina (Pimienta & Vergara, 2007).

- ***Lactobacillus acidophilus***

Bacilos, cuyos cultivos jóvenes muestran comportamiento de bacterias Gram positivas, y los cultivos viejos poseen un comportamiento de tinción bipolar. Se encuentran en mayor cantidad en el intestino, al aumentar la ingesta de hidratos de carbono (Pimienta & Vergara, 2007).

- ***Lactobacillus bulgaricus***

Bacilo menos tolerante que el *L. acidophilus*, en cuanto, a las condiciones del medio para su crecimiento. Este microorganismo, generalmente, no tolera temperaturas de 15 °C y pH 7.8.

- **Género *Lactococcus***

Generan ácido láctico de su metabolismo, mayoritariamente, a una temperatura óptima de 30 °C, y poseen la capacidad de crecer hasta a 10 °C (Rodríguez & Torres, 2006).

Microorganismos de gran utilidad en la industria alimenticia para la producción de lácteos, al usarse como fermentos; además, son capaces de producir bacteriocinas para la preservación de productos (Rodríguez & Torres, 2006).

- **Bacterias acidolácticas heterofermentativas**

Originan de su proceso fermentativo, además de ácido láctico, otros compuestos como: ácido acético, dióxido de carbono, etanol, ácido acético. Los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* pertenecen a este grupo (Rodríguez & Torres, 2006).

- **Género *Leuconostoc***

Bacterias Gram positivas anaerobias facultativas no patógenas. Su metabolismo depende directamente de la existencia de un carbohidrato fermentable, dando lugar, a componentes como: ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y diacetilo (genera aromas en productos), este último, mediante el citrato de la leche (Pimienta & Vergara, 2007).

2.2.1.2 Microbiología extrínseca del lactosuero

La contaminación de la leche, y por ende, del lactosuero mediante de este tipo de flora microbiana, puede ocurrir por dos vías principales:

Vía mamaria: ocurre por vía ascendente, cuando ingresan a la ubre microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, Coliformes; debido a que, después de la etapa de ordeño, el esfínter del pezón presenta apertura a estos organismos porque queda abierto. Además, sucede por vía descendente cuando se presenta una enfermedad sistémica, que produce el transporte de microorganismos (*Salmonella*, *Brucellas*, *Mycobacterium*) hacia la ubre, a través, de los capilares mamaros irrigados por sangre del animal (Moreno, 2015).

Vía ambiental: se origina por el contacto con diferentes vectores de contaminación, a manera, de contaminación cruzada. Ocurre, posterior, al proceso de ordeño desde la ubre bovina al exterior.

Como principales vectores contaminantes, se pueden mencionar: tanques de almacenamiento, manipuladores, sistemas de transporte y utensilios que tengan contacto con el producto (Toalombo, 2011).

Según la NTE INEN 2594:(2011) Suero de leche líquido. Requisitos, dentro de los requisitos microbiológicos para suero de leche líquido, presenta indicadores de tolerancia para la presencia de algunos microorganismos alterantes principales. Estos microorganismos son los siguientes:

- **Microorganismos aerobios mesófilos**

Se denomina así, al grupo heterogéneo de bacterias que se desarrollan, de manera óptima, a 35 °C, sin embargo, abarcan un rango entre 15 °C a 45 °C. Al hablar de microorganismos aerobios mesófilos, se hace también referencia directa a su uso de oxígeno libre en el ambiente (Buñay & Peralta, 2015).

Este conjunto de microorganismos se conforma por: bacterias, mohos y levaduras. Dentro de la temática de alimentos, la presencia de estos organismos, sirve como indicador de calidad en productos terminados, información de: vida útil y posibles procesos de producción inadecuados y descontrolados, así como, materias primas contaminadas (Buñay & Peralta, 2015).

- ***Escherichia coli***

Bacilo Gram negativo anaerobio – facultativo, que forma parte de la familia de las Enterobacteriáceas. Bacteria mesófila, cuya temperatura óptima de crecimiento y desarrollo son los 37 °C, por lo que, se encuentra en el interior

del intestino grueso humano. En el interior de este órgano, tiene la capacidad de producir infecciones por enterotoxinas, comúnmente, por el consumo de carne cruda y otros alimentos contaminados (Rodríguez & Torres, 2006).

En cuanto a, la leche, la *Escherichia coli* puede aprovechar sus proteínas y lactosa, ocasionando alteraciones organolépticas del producto. La presencia de este microorganismo en un alimento es un indicador de contaminación fecal. La pasteurización destruye a la *E. coli* (Pimienta & Vergara, 2007).

- ***Staphylococcus aureus***

Coco Gram positivo anaerobio - facultativo, cuyo óptimo crecimiento y desarrollo se ejecuta de 30 °C a 37 °C, pudiendo además, aprovechar temperaturas comprendidas entre 6.5 °C – 46 °C. Posee la capacidad de producir enterotoxinas causantes de intoxicación alimentaria, las cuales, son termorresistentes a 100 °C por períodos de 30 minutos (Pimienta & Vergara, 2007).

Cuando son identificados en alimentos, se establecen como indicadores de inadecuada manipulación por humanos (falta de higiene), contacto con respiración humana, incorrectos procesos de eliminación de patógenos. Su presencia, además, puede sugerir la existencia de infecciones intramamarias (Rodríguez & Torres, 2006).

- ***Salmonella***

Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Se desarrollan a una temperatura óptima de 35 °C – 37 °C, sin embargo, abarcan un rango de 5 °C a 47 °C (González, Pereira, Soto, Hernández, & Villarreal, 2010; Zambrano, 2014).

Se constituyen como la causa más común de transmisión de enfermedades por ingesta de alimentos. En gran medida, al encontrarse estos microorganismos contenidos en el intestino de muchos animales, su transferencia al organismo humano es por vía fecal oral (Gómez, Villarruel, Torres, & Castro, 2012).

La detección de *Salmonella* en alimentos, puede indicar la necesidad de aplicar al producto, procedimientos destructivos de microorganismos, tales como, la pasteurización; con la finalidad, de producir alimentos seguros para el consumo humano (Martínez & Gómez, 2014).

- ***Listeria monocytogenes***

Bacteria Gram - positiva, aerobia o anaerobia facultativa, cuya temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, sin embargo, puede desarrollarse en un rango entre 1 °C y 45 °C. La *Listeria monocytogenes* se distingue de otros patógenos como la *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, ya que, su desarrollo no resulta inhabilitado cuando la bacteria es sometida a temperaturas de refrigeración, por lo que, es considerada un organismo psicrótrofo (Morales, 2015).

Dentro del género *Listeria*, la *L. monocytogenes* tiene gran relevancia al momento de hablar de patogenicidad, ya que, las especies restantes no han estado relacionadas con esta temática, no obstante, su presencia y detección en alimentos puede indicar la existencia de *L. monocytogenes* (Juan, Vázquez, Rosas, & De la O, 2011).

Esta bacteria habita en varios ambientes: terrestre (suelo, aguas residuales, materia fecal), acuícola, y referente al tema actual, en lugares de procesamiento de alimentos (cámaras de frío, cintas transportadoras, túneles de enfriamiento y congelación, entre otros). En este sentido, al ser este patógeno, competente en medios como alimentos refrigerados (leche, vegetales, carne), puede ser transferido al organismo humano, mediante la

ingesta de alimentos o por contacto con mucosas de animales infectados, provocando así, la infección conocida como listeriosis (Morales, 2015).

La *L. monocytogenes* resiste una baja actividad de agua, y por ende, desarrollarse en alimentos altamente grasos, tales como, los quesos semiduros. Pero además, se puede detectar en quesos blandos y semiblandos, debido, a su alta actividad de agua intrínseca (Juan, De la O, Vázquez, Ríos, & Rosas, 2011).

2.3 CANTÓN MEJÍA

2.3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Con relación, a la provincia de Pichincha, se ubica al sur-oriente en Ecuador.

Sus límites geográficos son:

Norte: Cantón Rumiñahui, Santo Domingo

Sur: Provincia de Cotopaxi

Este: Provincia de Napo

Oeste: Provincia de Cotopaxi y Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (Duque, 2014; Mulky, 2012).

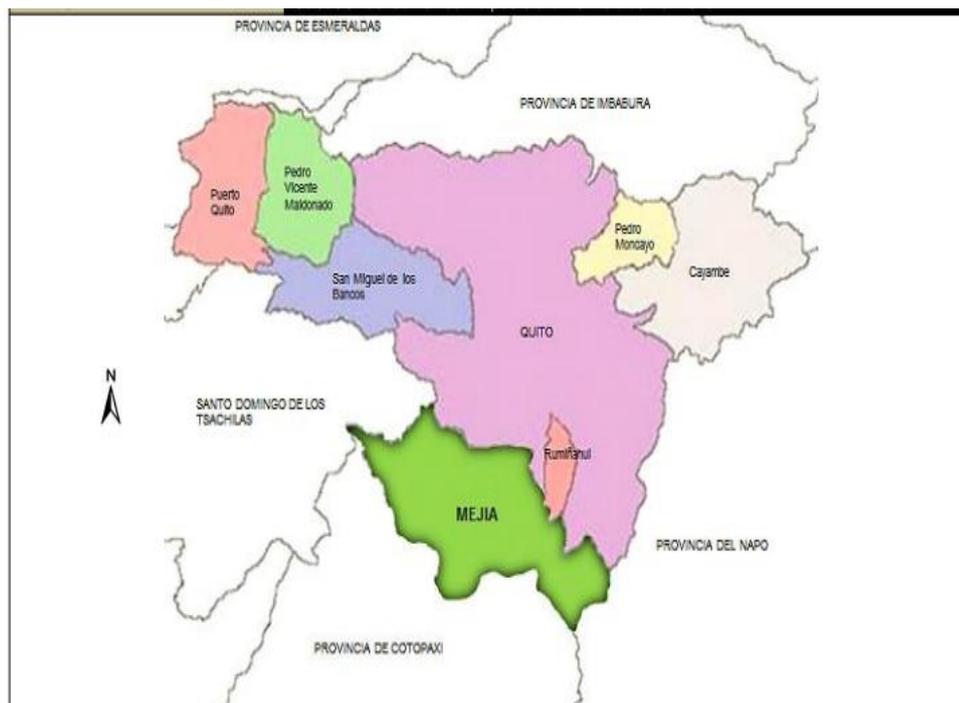


Figura 1. Ubicación del Cantón Mejía, con respecto, a la provincia de Pichincha

(Sistema Nacional de Información, 2015)

2.3.2 DIVISIÓN POLÍTICA

El cantón Mejía, se compone por ocho parroquias:

Urbana: Machachi (cabecera cantonal)

Rurales: Aloag, Aloasí, Manuel Cornejo Astorga, Cutuglagua, El Chaupi, Tambillo, y Uyumbicho (Duque, 2014).



Figura 2. Mapa político del Cantón Mejía

(Duque, 2014)

2.3.3 GENERALIDADES DEL CANTÓN

El cantón Mejía presenta ciertas características geográficas que lo diferencian de los demás cantones de la Sierra ecuatoriana, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Características generales del Cantón Mejía

Superficie	1 410.82 km ²
Altitud	600 – 4 750 m.s.n.m
Temperatura:	Mínima: 1.8 °C Máxima: 21.5 °C
Precipitación promedio mensual del cantón	131mm 77.6 %
Humedad relativa del cantón	77.6 %
Población:	Sector rural: 64820 habitantes (80 %) Sector urbano: 16515 habitantes (20 %) Total: 81335 habitantes

(Mulky, 2012; Sistema Nacional de Información, 2010)

2.3.4 SISTEMA ECONÓMICO

2.3.4.1 Agricultura y Ganadería

El cantón constituye su actividad económica, netamente, en la actividad agrícola (2300 has. anuales de producción de maíz, hortalizas, habas y papa); debido a, su riqueza en recursos hídricos y las características propias de sus suelos volcánicos. Sin embargo, la ganadería se desarrolla crecientemente, en un contexto de grandes haciendas y pequeñas y medianas empresas (Mulky, 2012).

En este sentido, el cantón cuenta con 96937 hectáreas de terreno cultivable, en los cuales: 59962 has. son utilizadas para ganado lechero, 5420 has. son destinadas a la agricultura, 1408 has. para cultivos con fines de exportación y 28017 has. corresponden, a páramos altos (generación de agua) (Sistema Nacional de Información, 2015). En cuanto, a la ganadería, las hectáreas de pasto designado a esta actividad, mantienen a aproximadamente 350000 bovinos (7 % del total de población bovina del país), lográndose los índices más altos de tecnificación en manejo de ganado vacuno en Ecuador, además,

se generan diariamente, alrededor de 860000 litros de leche para la ciudad de Quito (Mulky, 2012).

Mayoritariamente, para la producción lechera, el clima templado es el más apropiado para el desarrollo de ganado vacuno lechero. Para producción de leche, en Ecuador existen 298962 Unidades Productivas Agropecuarias (UPAs), con un rendimiento diario de 4.4 L/vaca, De los cuales, el 35 % representa la leche cruda para consumo y venta, 23 % alimentación de terneros y 11 % leche no recolectada (productos artesanales) (Mulky, 2012).

En el cantón Mejía, en los últimos diez años, ha crecido la actividad industrial, motivada por aspectos como la cercanía a la Panamericana Sur, además, de establecerse este cantón como un nexo de unión entre Sierra Norte – Sierra Sur y de éstas con la Costa ecuatoriana. En este lapso de tiempo, se ha dado lugar, a la generación de nuevas industrias y el fortalecimiento de las existentes, perteneciendo el 52 % de éstas, al grupo de empresas encargadas de elaborar productos alimenticios (Duque, 2014).

La ganadería consiste en una buena y estable fuente de ingreso económico al cantón, ya que, genera aproximadamente 1.5 millones de empleos directos e indirectos. Como se mencionó anteriormente, la Sierra ecuatoriana es la región más ganadera, concentrándose esta actividad en provincias como: Pichincha, Loja y Azuay; mientras que, en la Costa: Manabí y Guayas; en la serranía se encuentran alrededor de 2583353 cabezas de ganado vacuno, en la cálida zona costera existen 1968576 y en la región oriental 642796 (Mulky, 2012).

En Ecuador, existen seis principales grandes empresas de lácteos:

- Sierra: Nestlé (300000 L), Andina (110000 L), Nutrileche (140000 - 160000 L) y Pasteurizadora Quito (160000 - 180000 L).

- Costa: Rey leche (160000 - 180000 L) y Tony (160000 -180.000 L) (Sistema Nacional de Información, 2015).

Mejía genera diariamente 240000 litros de leche cruda, provenientes de las parroquias: Machachi, Alóag, Tambillo, Aloasí, Cutuglahua, Uyumbicho y El Chaupi. Esta leche, se utiliza principalmente para ser pulverizada (leche en polvo), y la cantidad restante se consigna a pasteurizadoras de otros sectores (Mulky, 2012).

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIALES

3.1.1. MATERIA PRIMA

Suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos ubicados en el cantón Mejía – parroquia Machachi.

3.1.2. INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Recipientes esterilizados de material inerte para almacenar suero, cajas Petri (vidrio y plástico), frascos autoclavables, tubos de ensayo, gradillas para tubos de ensayo, micropipetas, pipetas, porta - tips, puntas para micropipeta, asas de Digralsky, asas de platino, espátula, imanes de agitación, tubos de ensayo, goteros, portaobjetos, cubreobjetos.

3.1.3. REACTIVOS

Medios de cultivo (agares): Macconkey, SDA (Agar Sabouraud Dextrosa), YDP (Yeast Extract – Peptone – Dextrose), Sangre, SS (Salmonella Shigella Agar), TSA (Tryptic Soy Agar), Oxford, MYP (Manitol – Yema de huevo – Poliximina), caldo lactosado, agua destilada, cristal violeta, safranina, lugol, alcohol 70 %, alcohol 96 %.

3.2 HERRAMIENTAS / TÉCNICAS

3.2.1. EQUIPOS

Balanza analítica, plancha de agitación con temperatura, autoclaves, cámara de flujo laminar, mechero, incubadora, refrigeradora, congelador, microscopio óptico.

3.2.2. NORMATIVA

Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2594:(2011) Suero de leche líquido. Requisitos.

3.3 MÉTODOS

Con la finalidad, de identificar a los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi, a cuyas muestras de lactosuero se les realizó el estudio microbiológico, se elaboró una encuesta a los productores, que permitió el levantamiento de información, acerca de la producción y elaboración de sus principales productos y el lactosuero El modelo de encuesta se encuentra detallado en el Anexo I.

Las encuestas se realizaron en el cantón Mejía – parroquia Machachi, en las instalaciones utilizadas por los productores, en una reunión de temática relacionada con sus actividades productivas.

Cabe mencionar, que el proceso de encuestas fue realizado, con el fin, de identificar a los productores lácteos, con el objetivo principal, de organizar la logística de este proyecto.

3.3.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Se tomaron muestras de suero de leche, correspondientes, a los cinco diferentes productores lácteos identificados y ubicadas en el Cantón Mejía – Parroquia Machachi.

Se almacenaron alrededor de 200 ml (en total) de suero dulce de queso fresco, con la ayuda de dos recipientes estériles, mediante la inmersión de éstos (lo menor posible) en el centro de las tinas de desuerado, con el fin, de obtener una muestra representativa de este subproducto de quesería. A continuación, los recipientes fueron etiquetados y refrigerados en un cooler con hielo, para la conservación de la cadena de frío desde el cantón Mejía hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Politécnica Salesiana, donde fueron almacenados asépticamente y en congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para su posterior procesamiento y análisis.

Las muestras fueron recopiladas, con el objetivo, de estudiar la microbiología general del suero dulce de leche, y de este modo, generar un resultado inclinado hacia la calidad, en términos de inocuidad, del lactosuero, y por ende, del proceso productivo del queso fresco en las pequeñas empresas de Machachi – cantón Mejía.

Los ensayos fueron realizados en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Tecnológica Equinoccial y los laboratorios de Ciencias de la Vida de Universidad Politécnica Salesiana.

La metodología utilizada para el análisis realizado en esta experimentación, se dividió en tres fases:

3.3.2 TIPOS DE EXPERIMENTO

3.3.2.1 Análisis inicial de la muestra

- **Microorganismos aerobios mesófilos**

Se preparó en frasco hueco, agar Macconkey, disolviendo 50 g en 1 L de agua destilada, posteriormente, se homogenizó totalmente la mezcla con la ayuda de plancha e imán de agitación, y se procedió, a autoclavar a 1 atm de presión, 121 °C y por un período de 30 min, con el fin, de esterilizar el medio de cultivo. Cuando éste bajó de temperatura, se realizó su dispersión en cajas Petri de vidrio (previamente esterilizadas) en el interior de la cámara de flujo y haciendo uso del bulbo de fuego, de este modo, asegurando condiciones asépticas.

Una vez, el medio de cultivo se solidificó en el interior de las cajas Petri, se inoculó asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero homogenizado (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con puntas estériles (una para cada siembra de cada empresa). A continuación, mediante el asa de Digrafsky estéril y en un radio de 10 cm del bulbo de fuego (con mechero), se dispersó la muestra sobre el agar, haciendo movimientos de lado a lado y en rotación de la caja (sin abrirla completamente), con el fin, de dispersarla uniformemente sobre la superficie.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, como indica la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-5:(2006) Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de la Cantidad de Microorganismos Aerobios Mesófilos (modificada y denominada INEN - ISO 4833 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C); y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas; terminado

el tiempo de incubación de microorganismos aerobios mesófilos, se determinó la viabilidad de la realización de un conteo de UFC/g de muestra, cuando no se encuentra diluída.

En agar Mcconkey se inhibe el desarrollo de bacterias Gram positivas y ciertas Gram negativas exigentes, debido a, su composición de sales biliares y cristal violeta; es un medio de cultivo selectivo y diferencial para enterobacterias y bacilos Gram negativos entéricos relacionados; posee como fuente de hidratos de carbono, a la lactosa y el indicador es el rojo neutro (Universidad de Sevilla, 2013). Por ésto, para el conteo de UFC (Unidades Formadoras de Colonia), se hizo uso de las cajas con una cantidad de 30 a 300 colonias (para la obtención de resultados confiables) de diferentes tonos de rojo y redondeadas; se incluyeron todas, inclusive las que presentaron un tamaño pequeño, y las colonias incoloras, que correspondieron a las bacterias no fermentadoras de lactosa (Dpto Química Orgánica Universidad de Buenos Aires, 2013).

- **Levaduras**

Se preparó agar YDP (Yeast Extract – Peptone – Dextrose) y se realizó inoculación directa de muestra de lactosuero, replicando el procedimiento descrito en el numeral 3.4.2.1 para microorganismos aerobios mesófilos, mediante la variación de la formulación para preparar el medio de cultivo (65 g en 1 L de agua destilada) y las condiciones de incubación (25 °C, por un período de 72 horas).

Al igual, que para el agar Macconkey, este proceso fue realizado para determinar la viabilidad de la realización de un conteo de UFC de muestra, cuando no se encuentra diluída.

El agar YDP es un medio que contiene solamente dextrosa (fuente de hidratos de carbono, suministros de extracto de levadura y sales), lo cual, permite el desarrollo de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (DIFCO, 2009).

Culminado el período de incubación, se contaron las colonias jóvenes de levaduras (húmedas), que tuvieron forma redondeada, color blanquecino, y en ciertos casos, cremoso. Cabe recalcar, que las levaduras con mayor período de incubación, presentan un aspecto redondo, cóncavo, e incluso, pueden ser de forma estrellada (INEN, 2013).

- **Hongos filamentosos**

Se preparó agar SDA (Agar Sabouraud Dextrosa) y se realizó inoculación directa de muestra de lactosuero, replicando el procedimiento descrito en el numeral 3.4.2.1 para microorganismos aerobios mesófilos, y usando la misma formulación y condiciones de incubación que para el agar YDP: 65 g en 1 L de agua destilada; y 25 °C, por un período de 72 horas, respectivamente.

Al igual, que para el agar Macconkey y SDA, este proceso fue realizado para determinar la viabilidad de la realización de un conteo de UFC, cuando la muestra no se encuentra diluída.

El agar SDA favorece el crecimiento de hongos filamentosos, por su pH bajo, que resulta inhibitorio para el desarrollo de bacterias (DIFCO, 2009).

Culminado el período de tiempo de incubación, se contaron las colonias de aspecto algodonoso y blancas (INEN, 2013).

3.3.2.2 Método de diluciones

- **Microorganismos aerobios mesófilos**

Se elaboraron seis diluciones pertenecientes a cada una de las cinco medianas empresas del cantón Machachi. Con el fin, de que la temperatura del diluyente (agua destilada) sea lo más similar a la de las muestras (lactosuero), éstas fueron descongeladas al ambiente y sin métodos térmicos, para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de temperatura (INEN, 2013).

Se tomó 1 ml muestra homogenizada (mediante pipeta graduada y puntas estériles) y se colocó en tubo esterilizado que contenía 9 ml de agua destilada (diluyente), una vez, homogenizada la mezcla (dilución 10^{-1}), a partir de ésta, se realizó una dilución sucesiva, transfiriendo 1 ml de la dilución 10^{-1} (suspensión inicial), a otro tubo que contenía 9 ml de diluyente estéril a la temperatura adecuada (evitando que la pipeta entre en contacto con el diluyente), y se obtuvo la dilución 10^{-2} ; el proceso fue replicado para las diluciones 10^{-3} - 10^{-6} (INEN, 2013). Esta fase se realizó para establecer el número de diluciones necesarias a utilizar para garantizar un conteo veraz en el estudio de la microbiología total del lactosuero de cada una de las queseras de Machachi; es decir, alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm^3 , y de este modo, reportar correctamente los resultados correspondientes (INEN, 2013).

Se preparó agar Macconkey, utilizando la misma metodología descrita en el numeral 3.4.2.1 para microorganismos aerobios mesófilos, con algunas variaciones. Se inocularon asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); y 0.1 ml de cada dilución (por caja Petri y por duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con seis puntas estériles (una para cada siembra directa y una para cada par de cajas de cada dilución).

Cabe mencionar, que una vez que fueron utilizadas las diluciones en la inoculación, se almacenaron en refrigeración a 5 °C (temperatura que detiene el metabolismo de los microorganismos), para seguir usándolas en las siguientes etapas del estudio microbiológico. Además, posterior a la elaboración y conteo de colonias en las diluciones 10^{-1} - 10^{-6} de agar MacConkey, en la siguiente fase sólo fueron inoculadas diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , debido a, las características encontradas en el crecimiento bacteriano.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, como indica la NTE INEN 1529-5:(2006) Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de la Cantidad de Microorganismos Aerobios Mesófilos (modificada y denominada INEN - ISO 4833 Microbiología de los Alimentos para Consumo Humano y Animal. Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos. Técnica de Recuento de Colonias a 30 °C); y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas; terminado el tiempo de incubación de microorganismos aerobios mesófilos, se hizo el conteo de UFC y se determinó el número de diluciones requeridas, con el fin, de obtener resultados factibles de la experimentación.

- **Levaduras**

Se preparó agar YDP y se le realizó inoculación de diluciones de muestra de lactosuero, replicando el procedimiento descrito en el numeral 3.4.2.1 microorganismos aerobios mesófilos, mediante las siguientes variaciones:

Se prepararon diluciones 10^{-1} hasta 10^{-3} , de las muestras de empresas que mostraron resultados MNPC en siembra directa.

Se usó de caldo lactosado, en lugar, de agua destilada para los tubos que contenían las diluciones.

La formulación para preparar el medio de cultivo fue: 65 g en 1 L de agua destilada (diluyente).

Las condiciones de incubación fueron: 25 °C, por un período de 72 horas; previo al conteo de UFC.

- **Hongos filamentosos**

Se preparó agar SDA y se le realizó inoculación de diluciones de muestra de lactosuero, replicando el procedimiento descrito en el numeral 3.4.2.1 Microorganismos aerobios mesófilos, mediante las siguientes variaciones (mismas que par agar YDP):

Se prepararon diluciones 10^{-1} hasta 10^{-3} , de las muestras de empresas que mostraron resultados MNPC en siembra directa.

Se usó de caldo lactosado, en lugar, de agua destilada para los tubos que contenían las diluciones.

La formulación para preparar el medio de cultivo fue: 65 g en 1 L de agua destilada (diluyente).

Las condiciones de incubación fueron: 25 °C, por un período de 72 horas; previo al conteo de UFC.

- ***Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* y *Campylobacter***

Se utilizaron cada una de las diluciones preparadas y almacenadas en refrigeración, pertenecientes a cada una de las empresas del cantón Machachi. Como se mencionó anteriormente, establecido el número adecuado de diluciones a utilizar (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se procedió a elaborar el medio de cultivo: agar sangre.

Se preparó en frasco hueco, agar base, disolviendo 40 g en 1 L de agua destilada, posteriormente, se homogenizó totalmente la mezcla con la ayuda de plancha e imán de agitación y se procedió, a autoclavar a 1 atm de presión, 121 °C y por un período de 30 min, con el fin, de esterilizar el medio de cultivo. Cuando éste bajó de temperatura (alrededor de 45 °C – 50 °C), se agregó el 5 % del medio de cultivo preparado, en sangre de cordero estéril y desfibrinada (5 ml) y fue homogenizado. Se realizó la dispersión de este medio de cultivo en cajas Petri de vidrio (previamente esterilizadas) en el interior de la cámara de flujo y haciendo uso del bulbo de fuego, de este modo, asegurando condiciones asépticas.

Posteriormente, se inocularon asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); y 0.1 ml de cada dilución (por caja Petri y por duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con seis puntas estériles (una para cada siembra directa y una para cada par de cajas de cada dilución). A continuación, mediante el asa de Digrafsky estéril y en un radio de 10 cm del bulbo de fuego (con mechero), se dispersó la muestra sobre el agar, haciendo movimientos de lado a lado y en rotación de la caja (sin abrirla completamente), con el fin, de dispersarla uniformemente sobre la superficie.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas.

Terminado el tiempo de incubación, se procedió al conteo de UFC de tres diferentes tipos de bacterias: para las colonias de *S. aureus*, se contaron las colonias circulares y convexas, de color blanco; en cuanto, a las colonias de *Campylobacter* se presentaron de color rosa pálido, redondas, convexas, lisas y brillantes, con un borde regular, muchas veces, en cadena (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008); finalmente, para las colonias de *Streptococcus* se contaron las esféricas u ovoides de color

grisáceo a negro y gamma – hemolíticas (sin hemólisis alrededor) (Rodríguez, 2008).

- ***Salmonella y Shigella***

Al igual que para el agar sangre, se utilizaron las diluciones preparadas y almacenadas en refrigeración (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), pertenecientes a cada una de las cinco empresas del cantón Machachi.

Se preparó en frasco hueco, agar SS (Salmonella Shigella Agar), disolviendo 60 g en 1 L de agua destilada esterilizada (1 atm, 121 °C y 30 min), se dejó reposar la mezcla durante cinco minutos y se homogenizó (alrededor de 3 horas) con la ayuda de plancha de agitación, llevándolo a ebullición durante un minuto para la disolución total. Cuando éste bajó de temperatura (alrededor de 45 °C – 50 °C), se realizó la dispersión de este medio de cultivo en cajas Petri de vidrio (previamente esterilizadas), haciendo uso del bulbo de fuego del mechero, para garantizar condiciones asépticas.

Posteriormente, se inocularon asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); y 0.1 ml de cada dilución (por caja Petri y por duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con seis puntas estériles (una para cada siembra directa y una para cada par de cajas de cada dilución). A continuación, mediante el asa de Digrafsky estéril y en un radio de 10 cm del bulbo de fuego (con mechero), se dispersó la muestra sobre el agar, haciendo movimientos de lado a lado y en rotación de la caja (sin abrirla completamente), con el fin, de dispersarla uniformemente sobre la superficie.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas.

El Agar SS es moderadamente selectivo, ya que, por su contenido en sales biliares, colorante verde brillante y citratos (sódico y férrico), impide el desarrollo de microorganismos Gram - positivos y enterobacterias, diferentes de *Salmonella* y *Shigella*. El componente que otorga la selectividad es la lactosa, los organismos que la fermentan, formaron colonias rojas. Mientras que, para *Salmonella*, El tiosulfato de sodio y citrato férrico permiten la detección de la producción de sulfuro de hidrógeno, por lo que, se contaron las colonias con centro negro (DIFCO, 2009; Universidad de Sevilla, 2013).

- ***Escherichia coli***

Se preparó en frasco hueco, agar TSA (Tryptic Soy Agar), disolviendo 40 g en 1 L de agua destilada, posteriormente, se homogenizó totalmente la mezcla con la ayuda de plancha e imán de agitación y se procedió, a autoclavar a 1 atm de presión, 121 °C y por un período de 30 min, con el fin, de esterilizar el medio de cultivo. Se realizó la dispersión de este medio de cultivo en cajas Petri esterilizadas en el interior de la cámara de flujo y haciendo uso del bulbo de fuego, de este modo, asegurando condiciones asépticas.

Posteriormente, se inocularon asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); y 0.1 ml de cada dilución: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (por caja Petri y por duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con seis puntas estériles (una para cada siembra directa y una para cada par de cajas de cada dilución). A continuación, mediante el asa de Digrafsky estéril y en un radio de 10 cm del bulbo de fuego (con mechero), se dispersó la muestra sobre el agar, haciendo movimientos de lado a lado y en rotación de la caja (sin abrirla completamente), con el fin, de dispersarla uniformemente sobre la superficie.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas.

El agar TSA es un medio de cultivo de uso general para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos, su formulación con caseína y peptonas de soja (otorga suministro de nitrógeno orgánico, en forma de aminoácidos y polipéptidos), lo constituyen como un medio altamente nutritivo, ideal para la proliferación de coliformes y *Escherichia coli*; por lo que, culminada la etapa de incubación, se contaron las colonias redondas y blancas para establecer el valor de UFC.

- ***Listeria monocytogenes***

Se preparó en frasco hueco, agar Oxford, disolviendo 57.5 g en 1 L de agua purificada, posteriormente, se homogenizó totalmente la mezcla con la ayuda calor y agitación, y se hirvió para disolución completamente, durante un minuto. Se procedió, a autoclavar a 1 atm de presión, 121 °C y por un período de 15 min, con el fin, de esterilizar el medio de cultivo. Ulteriormente, se realizó la dispersión de este medio de cultivo (45 °C – 50 °C) en cajas Petri esterilizadas, haciendo uso del bulbo de fuego, de este modo, asegurando condiciones asépticas (Merckmillipore, 2016).

Posteriormente, se inocularon asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); y 0.1 ml de cada dilución: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (por caja Petri y por duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con seis puntas estériles (una para cada siembra directa y una para cada par de cajas de cada dilución). A continuación, mediante el asa de Digrafsky estéril y en un radio de 10 cm del bulbo de fuego (con mechero), se dispersó la muestra sobre el agar, haciendo movimientos de lado a lado y en rotación de la caja (sin abrirla completamente), con el fin, de dispersarla uniformemente sobre la superficie.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas.

La formulación del agar Oxford posee un complemento de cloruro de litio (otorga alta selectividad al medio), acriflavina, colistina, sulfato, cefotetan, cicloheximida y fosfomicina, dichos componentes (agentes antimicrobianos, en su mayoría) contribuyen a la eliminación del desarrollo de bacterias comunes, Gram positivas y Gram negativas. La selectividad de este medio de cultivo para *Listeria monocytogenes*, se basa en que esta bacteria hidroliza la esculina a esculetina y forma un complejo de color negro con iones de hierro (Becton, Dickinson y Company, 2003); además, *Listeria spp* genera colonias brillantes, lisas y de 1 mm – 2 mm, que observándose a un ángulo de luz entre 45 ° y 60 ° muestran destellos de color azul – verdoso sobre una superficie ligeramente granular. Terminado el tiempo de incubación, se procedió al conteo de UFC con estas características (Alonso & Poveda, 2008).

- ***Bacillus cereus***

Se preparó en frasco hueco, agar MYP (Manitol – Yema de huevo – Poliximina), disolviendo 46 g en 900 ml de agua purificada, posteriormente, se homogenizó totalmente la mezcla con la ayuda calor y agitación, y se hirvió para disolución completamente, durante un minuto. Se procedió, a autoclavar a 1 atm de presión, 121 °C y por un período de 15 min, con el fin, de esterilizar el medio de cultivo, y se enfrió a una temperatura entre 45 °C – 50 °C (para mezcla con yema de huevo).

Previo a la preparación del gar MYP, se tuvieron en esterilización, tres huevos en alcohol al 96 %. A continuación, culminado dicho período de tiempo, se separó la yema de los huevos, hasta conseguir 12.5 ml (con la ayuda de pipeta esterilizada), se pesó en frasco estéril y se añadió el mismo volumen de agua esterilizada; de inmediato, la mezcla fue fusionada con el agar base MYP y dispersada en cajas Petri estériles, haciendo uso del bulbo de fuego y la cámara de flujo laminar, de este modo, asegurando condiciones asépticas.

Posteriormente, se inocularon asépticamente por empresa, 0.1 ml de lactosuero (para siembra directa, por caja Petri y duplicado); y 0.1 ml de cada dilución: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (por caja Petri y por duplicado); para este fin, se utilizó micropipeta graduada con seis puntas estériles (una para cada siembra directa y una para cada par de cajas de cada dilución). A continuación, mediante el asa de Digralsky estéril y en un radio de 10 cm del bulbo de fuego (con mechero), se dispersó la muestra sobre el agar, haciendo movimientos de lado a lado y en rotación de la caja (sin abrirla completamente), con el fin, de dispersarla uniformemente sobre la superficie.

Acabada la siembra de las muestras, se apilaron en grupos de máximo seis cajas Petri, y fueron envueltas con papel aluminio, codificadas adecuadamente e incubadas a 36 °C, por un período de 24 horas.

El agar MYP en su formulación, contiene extracto de carne y peptona, nitrógeno, vitaminas, minerales, rojo fenol (indicador de pH), la yema de huevo otorga la lecitina, y polimixina B, corresponde, al agente inhibitorio para el desarrollo de gran variedad de población bacteriana. Este medio de cultivo es diferencial por la presencia de manitol (fuente de hidratos de carbono), ya que, las bacterias fermentadoras de manitol (manitol +), acidifican el medio y producen el viraje de la coloración del indicador de pH rojo de fenol, al amarillo (*Bacillus subtilis*); mientras que, las bacterias no fermentativas de manitol, crecen como colonias del color del medio.

El *B. cereus* (manitol -), alcaliniza el medio por su metabolismo nitrogenado, produciendo el viraje del medio al color rosado, por lo que, se contaron las UFC con esta coloración, terminado el tiempo de incubación (Dpto Química Orgánica Universidad de Buenos Aires, 2012).

3.3.2.3 Método de conteo directo

Una vez, se terminaron los diferentes análisis microbiológicos por siembra directa y diluciones, se separaron cierto número de cajas Petri, que presentaban colonias de microorganismos de crecimiento y características representativas, con la finalidad, de realizar la identificación morfológica y confirmativa, mediante la tinción Gram, que separa las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. El procedimiento se realizó, con base en, la Norma INEN 1529 – 8:(1990) Leche pasteurizada conteo de bacterias coliformes.

Se trasladó el inóculo (con el asa de platino), al portaobjetos y se realizó un frotis, posterior a, su secado y fijado (leve llama de mechero), se cubrió con la solución coloreada de cristal violeta amonio durante un minuto; a continuación, se lavó el frotis con agua (evitar exceso de reactivo) y se cubrió con la solución de lugol. Después de lavar con agua, secar, y decolorar con alcohol etílico (30 segundos), nuevamente, se lavó, secó y colocó el colorante de contraste (10 segundos), que también fue lavado y secado.

Finalmente, se examinó al microscopio, tomando en cuenta las siguientes características: células decoloradas que aceptan el colorante contraste, son Gram negativas; mientras que, las células que no se decoloran pero retienen la solución cristal violeta-amonio, son Gram positivas (INEN, 2015).

3.3.3 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MILILITRO DE DILUCIÓN (UFC/ML) Y CONCENTRACIÓN TOTAL DE MICROORGANISMOS EN LA MUESTRA (UFC/ML)

Los resultados obtenidos de los diferentes análisis microbiológicos, fueron reportados como concentración de microorganismos por mililitro de dilución (UFC/ml) (Fernández et al., 2006) y concentración total de microorganismos por 250 ml de muestra (UFC/ml) (Doutoum et al., 2013), mediante las Ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$UFC/ml = (NC * \frac{1}{FD} * \frac{1}{V}) / (P * FH) \quad [1]$$

Donde:

UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonia por ml de muestra

NC: número de colonias en una caja

FD: factor de dilución, que corresponde, a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inoculó la caja

V: volumen inoculado en la caja (0.1 ml)

P: peso de la muestra húmeda utilizada (1 ml)

FH: factor de corrección de humedad (1 – (% Humedad/100))

Esta fórmula expresa la concentración de microorganismos por mililitro de una dilución específica.

$$N = \Sigma C / V(n_1 + 0.1n_2)d \quad [2]$$

Donde:

N: número unidades formadoras de colonia por mililitro

Σ : suma de todas las colonias contadas en todas las placas retenidas de dos diluciones sucesivas

V: volumen del inóculo aplicado a cada placa en mililitros (0.1ml)

n_1 : número de colonias retenidas en la primera dilución

n_2 : número de colonias retenidas en la segunda dilución

d: nivel de dilución, correspondiente, a la primera dilución retenida.

Esta fórmula expresa la concentración total de microorganismos en la muestra analizada, en este caso, 250 ml de lactosuero.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS ENCUESTAS REALIZADAS A PRODUCTORES LÁCTEOS DEL CANTÓN MEJÍA – PARROQUIA MACHACHI

Los resultados más relevantes obtenidos en la primera fase de este proyecto, a través, del levantamiento de información mediante el proceso de encuestas, como se indica en el Anexo II, fueron los siguientes:

El 63 % de los productores lácteos, elaboran como producto primordial el queso fresco, lo cual, origina una producción diaria de un volumen entre 500 L y 1000 L de suero de quesería.

Un aspecto notable de esta investigación, se relaciona directamente con el aprovechamiento del lactosuero por parte de los productores lácteos. En este sentido, el 48 % de este subproducto es desechado, principalmente en el alcantarillado público.

Con respecto a este resultado alcanzado, cabe recalcar que, en las siguientes fases de este proyecto, se pretenden realizar investigaciones, en base, a acciones que permitan lograr el mayor beneficio de uso del lactosuero, altamente desperdiciado en la actualidad por los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi.

Por otro lado, la segunda parte del análisis de resultados, fue realizada, basándose en el estado microbiológico de las muestras de lactosuero obtenidas de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Machachi.

Se compararon los resultados obtenidos, de acuerdo, a la NTE INEN 2594:(2011) Suero de leche líquido. Requisitos, que indica ciertos parámetros de cumplimiento microbiológico, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido

Requisito	m	M	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos UFC/ml	30000	100000	NTE INEN 1529-5
Recuento de <i>Escherichia coli</i> UFC/ml	<10	-	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/ml	<100	100	NTE INEN 1529-14
<i>Salmonella</i>/25 ml	Ausencia	-	NTE INEN 1529-15
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>/25 ml	Ausencia	-	ISO 11290-1

(INEN, 2011)

m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

Se realizaron inoculaciones directas de las muestras de lactosuero de cada una de las empresas, con la finalidad, de determinar el número de diluciones necesarias a realizar para obtener resultados viables. Como se muestra en la Tabla 5, se representaron estos resultados como ausencia (-) o presencia (+) de cada grupo de microorganismos en el conteo.

Tabla 5. Presencia / Ausencia de microorganismos en inoculación directa

	Empresas				
	ALDL	ALN	ALSM	ALDA	ALK
Aerobios mesófilos	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-
<i>G. Streptococcus</i>	+	+	+	+	+
<i>G. Campylobacter</i>	-	-	+	-	-
Hongos filamentosos	+	-	-	-	-
Levaduras	+	+	+	+	+
<i>G. Salmonella</i>	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>G. Listeria</i>	-	+	+	+	-
<i>G. Bacillus</i>	+	+	+	+	+

Se procedió a preparar diluciones sucesivas de todos los lactosueros, ya que, los conteos de siembra directa mostraron presencia de microorganismos en al menos una de las muestras analizadas. Además, si bien es cierto, aparentemente en algunos casos no existía gran carga microbiana en inoculación directa, se optó por preparar las diluciones con caldo lactosado, para mejorar el crecimiento.

4.2 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALDL

ALDL presentó un valor de $1.02E+05$ UFC/ml para *Staphylococcus aureus*, es decir, de los cinco productores analizados, se convirtió en la única empresa fuera de los límites permisibles máximos para suero de leche líquido de buena calidad (< 100 UFC/ml) y aceptable calidad (100 UFC/ml) en este parámetro microbiológico.

Con respecto, a la presencia del género *Streptococcus*, se obtuvo un valor 2.39E+05 UFC/ml. Además, los resultados generados para *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* fueron MNPC en todos los casos para ALDL.

En cuanto a hongos filamentosos, sólo ALDL tuvo presencia de estos microorganismos, con un valor de 1.21E+06 UFC/ml; mientras que, para levaduras se indicó un valor de 8.12E+05 UFC/ml.

Los resultados expresados anteriormente, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALDL)

Microorganismos	UFC/ml
Aerobios mesófilos	<30
<i>S. aureus</i>	1.02E+05
<i>Streptococcus</i>	2.39E+05
<i>Campylobacter</i>	0.00E+00
Hongos filamentosos	1.21E+06
Levaduras	8.12E+05
<i>Salmonella</i>	0.00E+00
<i>E. coli</i>	MNPC
<i>L. spp</i>	0.00E+00
<i>L. monocytogenes</i>	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	MNPC
<i>B. subtilis</i>	MNPC

Como se muestra en la Figura 3, en términos generales, el productor lácteo ALDL obtuvo valores altos en los análisis microbiológicos, referentes a los géneros: *S. aureus*, *Streptococcus*, *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* y hongos filamentosos y levaduras.

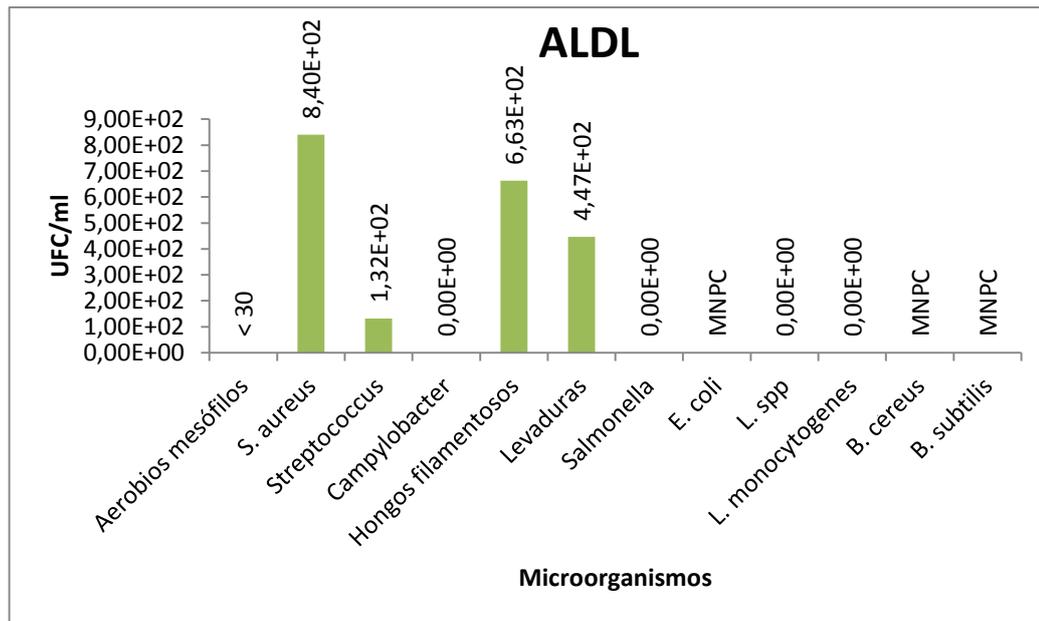


Figura 3. Concentración de microorganismos por ml de muestra de una dilución (ALDL)

Para *S. aureus*, resultados similares se han reportado para análisis microbiológicos en sueros de quesos elaborados artesanalmente, y se detalla que la alta carga de este microorganismo Gram positivo, puede deberse a contaminación originada de fuente humana, mediante boca, fosas nasales o piel de personas portadoras, en este caso, manipuladores de las empresas (Vanegas , González , Martínez , & Buitrago, 2008). En este sentido, al ser el queso fresco un producto que requiere de gran manipulación durante su elaboración, especialmente al momento de la sedimentación de la caseína de la leche, la contaminación encontrada podría indicar una deficiente higiene de los manipuladores, ya que, se originaría una contaminación cruzada, tanto de la cuajada manipulada, como del suero que suelta la misma, durante esta fase del procesamiento. Además, cabe mencionar, que la contaminación por *S. aureus* puede existir en la ubre bovina, por la posible existencia de infecciones intramamarias, y además, por incorrectos procesos de eliminación de patógenos, como es el caso de la pasteurización (Chávez & Romero, 2006; Rodríguez & Tórrres, 2006).

En cuanto, a microorganismos del género *Streptococcus*, al igual que para el género *Campylobacter*, la presencia de estas bacterias Gram positivas en el

lactosuero, puede atribuirse a la contaminación de la leche utilizada como materia prima, principalmente, mediante la piel de los pezones de la ubre bovina, que es un reservorio de microorganismos como *Streptococcus spp* (Ministerio de Salud y Protección Social, UERIA, & Instituto Nacional de Salud INS, 2011). Es decir, si la ubre no es preparada higiénicamente (limpieza y desinfección) antes del ordeño, aumenta la contaminación y transferencia de bacterias. Si bien es cierto, el género *Staphylococcus*, en la mayoría de casos, contiene los principales patógenos mastitogénicos, también se identifica al género *Streptococcus* como un microorganismo altamente aislado en casos de mastitis en vacas lecheras, ya sea en ordeño mecánico, o manual como es el caso de esta investigación (Faría, Valero, D' Pool, García, Allara & Morales, 2005).

La existencia del microorganismo Gram negativo *E. coli* en las muestras de lactosuero, como se indica en un estudio realizado acerca de la Calidad de la leche y del suero de los municipios de Turbaco, Arjona y Carmen de Bolívar – Colombia (2012), el cual, obtuvo resultados elevados, en cuanto a, la presencia de coliformes fecales y *E. coli*; podría indicar la contaminación por materia fecal de los sueros de queso artesanal durante su proceso de elaboración (Grandos , Acevedo, & Torres, 2012). Además, *E. coli* es un microorganismo Gram negativo, vulnerable a la destrucción por pasteurización (Pimienta & Vergara, 2007), por lo que, se podría deducir un deficiente tratamiento térmico de la leche utilizada como materia prima para la elaboración de queso fresco.

La leche utilizada para la elaboración de queso fresco fue previamente pasteurizada en todas las empresas, sin embargo, se supondría la existencia posibles fallas en el proceso y control de puntos críticos, ya que, se evidencia la presencia de ciertos microorganismos vulnerables a las temperaturas que requiere este tipo de tratamiento térmico. Sin embargo, aún con la realización correcta del proceso de pasteurización a la leche, existen bacterias resistentes a este tratamiento: *Streptococci* (*Streptococcus thermophilus*), los *Micrococci*

(*Micrococcus luteus*), *Alcaligenes*, *Corynebacterium* (*Mycobacterium lacticum*) y el conjunto de bacterias esporuladas (*Bacillus* y *Clostridium*) (Sharup & Tepán, 2009).

Se pueden causar alteraciones en leches, tanto pasteurizadas como ultrapasteurizadas, por parte de bacterias esporuladas termoestables, tales como: *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y por proteasas y lipasas termoestables de las bacterias psicrótrofas (Sharup & Tepán, 2009), lo cual, puede ser una posible causa para la presencia de las bacterias Gram negativas del género *Bacillus* en el lactosuero de las empresas de la parroquia Machachi.

En cuanto, a hongos filamentosos y levaduras, los resultados obtenidos en este estudio, fueron elevados, como en el estudio realizado por Chams, Cury & Aguas (2012), acerca de la Evaluación microbiológica del suero costeño y valoración higiénica en puntos de venta en Montería Córdoba. Dicha contaminación podría indicar una relación directa con la higiene locativa de los sitios de elaboración, y además, por inadecuadas condiciones higiénicas de procesamiento (Chams, Cury, & Aguas, 2012).

Se debe tomar en consideración, que la carga micótica puede provenir de materia prima contaminada (leche), o por la presencia de esporas en los recipientes empleados para la elaboración o almacenamiento del lactosuero.

No sólo la presencia de bacterias debe ser motivo de alarma al analizar microbiológicamente un alimento, ya que, no se debe olvidar que los hongos filamentosos pueden dar origen a micotoxinas causantes de ETAS (Enfermedades Transmitidas por Alimentos). Por esta razón, además, se debe poner especial interés, a las condiciones de los sitios de procesamiento, tales como, techos, paredes y suelos; así como, la conservación de la cadena de frío del producto (Chávez & Romero, 2006).

4.3 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALN

La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2594:(2011) determina ausencia de *Salmonella*, tanto para un nivel de buena, como de aceptable calidad del suero de queso líquido. ALN presentó un valor de 5.15E+02 UFC/ml para este microorganismo.

Además, obtuvo valores MNPC para los microorganismos del género *Streptococcus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Listeria spp.* Para los dos últimos, los valores excedieron de gran manera los límites permisibles determinados en la NTE INEN 2594:(2011), que indica ausencia de *Listeria* en muestras de lactosuero líquido; y < 10 UFC/ml para *E. coli*.

En cuanto, a levaduras, se presentó un resultado de 2.18E+04 UFC/ml.

Los valores mencionados anteriormente, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALN)

Microorganismos	UFC/ml
Aerobios mesófilos	< 30
<i>S. aureus</i>	0.00E+00
<i>Streptococcus</i>	MNPC
<i>Campylobacter</i>	0.00E+00
Hongos filamentosos	0,00E+00
Levaduras	2.18E+04
<i>Salmonella</i>	3.12E+03
<i>E. coli</i>	MNPC
<i>L. spp</i>	MNPC
<i>L. monocytogenes</i>	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	0.00E+00
<i>B. subtilis</i>	MNPC

Como se muestra en la Figura 4, el productor lácteo ALN obtuvo resultados altos en los análisis microbiológicos, referentes a los géneros: *Streptococcus*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. spp*, *B. subtilis* y levaduras.

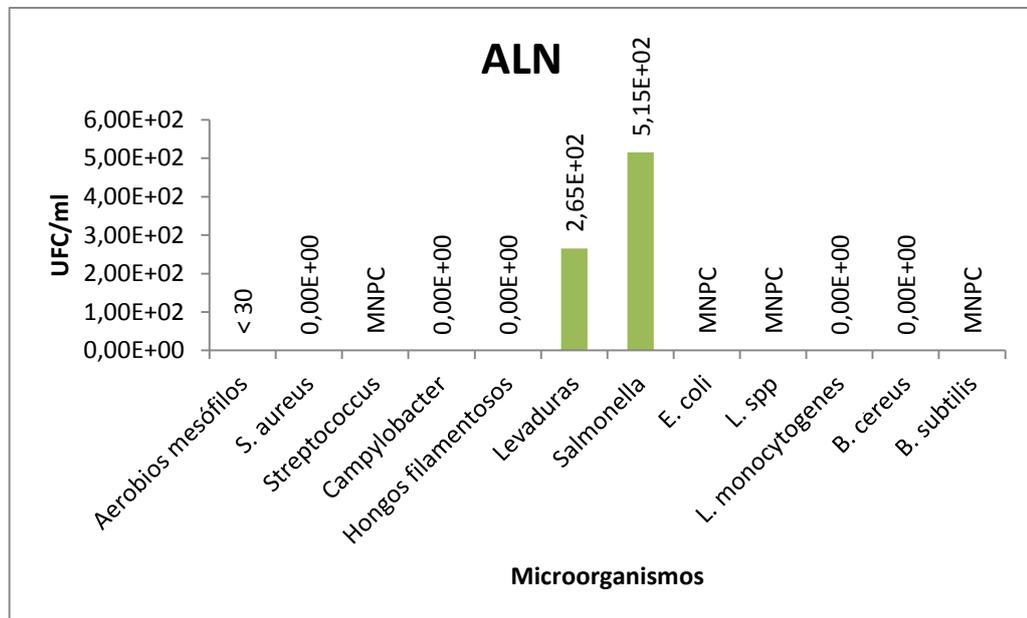


Figura 4. Concentración de microorganismos por ml de muestra de una dilución (ALN)

La presencia de microorganismos del género *Streptococcus*, como se mencionó anteriormente, puede estar ligada a cierto tipo de contaminación cruzada de la leche utilizada como materia prima, por parte de la piel de la ubre del animal. En este aspecto, podría hablarse de casos de mastitis del ganado lechero, ya que, si bien es cierto, el género *Staphylococcus*, en la mayoría de casos, contiene los principales patógenos mastitogénicos, también se identifica al género *Streptococcus* como un microorganismo altamente aislado en casos de mastitis en vacas lecheras, ya sea en ordeño mecánico o manual, como es el caso de esta investigación. De este modo, una vez más, se podría deducir como una viable causa de contaminación de los lactosueros analizados, a la leche utilizada en la elaboración del queso fresco (Faría et al., 2005).

En el caso del microorganismo *Salmonella*, los análisis positivos en las muestras de lactosuero, podrían evidenciar la ausencia de controles higiénicos durante la elaboración de queso fresco, como consecuencia, de una posible falta de capacitación sobre buenas prácticas de manufactura de productos alimenticios, lo que deriva, en desconocimiento por parte de los manipuladores (Chávez & Romero, 2006). Los resultados obtenidos reflejarían una posible contaminación por vía fecal – oral hacia el organismo humano, puesto que, este organismo Gram negativo está presente en el intestino de muchos animales; este hecho es alarmante en términos de inocuidad, al poseer esta bacteria un alto grado de patogenicidad y representar la causa más habitual de transmisión de enfermedades por ingesta de alimentos en humanos (Gómez, Villarruel, Torres, & Castro, 2012).

En cuanto, a la presencia de *E. coli* en las muestras de lactosuero, al igual que, en el caso de la existencia de colonias viables de *Salmonella*, se podría deducir una probable contaminación por materia fecal de los sueros de queso durante su proceso de elaboración. Además, *E. coli* es un microorganismo vulnerable a la destrucción por pasteurización (Pimienta & Vergara, 2007), por lo que, posiblemente exista un deficiente tratamiento térmico de la leche utilizada como materia prima para la elaboración artesanal de queso fresco.

Referente a la presencia del género *Listeria* en las muestras de lactosuero, se afirman dos hechos importantes, según estudios realizados en Europa acerca de brotes de listeriosis en humanos, vinculados con el consumo de leche cruda y derivados lácteos procesados, a partir, de la misma: los brotes constituyen la mitad de los existentes en su totalidad, y pueden ocurrir por consumo leche pasteurizada y recontaminación de los productos resultantes durante procedimientos industriales (Lundén , Tolvanen , & Korkeala, 2004).

Esta bacteria Gram positiva es altamente adaptable a condiciones extremas del medio ambiente, pudiendo multiplicarse en un rango de temperatura de 2 °C – 42 °C, e incluso se ha reportado que es capaz de sobrevivir durante

varias semanas y en varios tipos de sustratos a -80 °C (Alonso & Poveda, 2008), específicamente para este estudio, la presencia de este organismo psicrótrofo en las muestras de lactosuero analizadas, estaría directamente relacionada a los requerimientos para el desarrollo de esta bacteria, debido a que, las muestras fueron almacenadas en congelación, exactamente a -80 °C.

La *Listeria* puede coexistir como patógeno en animales y plantas, por lo que, es importante no descartar toda posible fuente de contaminación, con el fin, de determinar el origen de la existencia de este microorganismo en los sueros de queso analizados. Se debe tomar en cuenta, que en muchas haciendas lecheras, la alimentación del ganado consiste en una mezcla de diferentes productos forrajeros, que pueden estar contaminados por este microorganismo, y que al mismo tiempo, se encuentran a la intemperie y expuestos al contacto con heces de aves y otros animales, que posiblemente, pueden ser portadores de *Listeria spp* (Konosonoka, Jemeljanovs, Ikauniece, Osmane, & Gulbe, 2012).

Para el género *Bacillus*, tanto *Bacillus stearothermophilus* como *Bacillus subtilis*, podrían ser vectores de alteraciones en leches pasteurizadas y ultrapasteurizadas (Sharup & Tepán, 2009), por lo que, se podría asumir una posible causa para la presencia de las bacterias del género *Bacillus* en el lactosuero de queso fresco pasteurizado de las empresas de la parroquia Machachi. Además, cabe mencionar, que otra factible causa para la presencia de este género de bacterias, podría ser la existencia de vacas infectadas de mastitis, ya que, dentro de la diversidad de agentes etiológicos que la causan, se encuentra el género *Bacillus spp*; por ésto se podría sospechar de una calidad deficiente de los lactosueros, debido a, enfermedad en ganados proveedores de leche (Faría, Valero, D'Pool, García, & Allara, 2005).

Finalmente, en el caso de las levaduras encontradas, la existencia de población de levaduras, podría indicar contaminación ambiental,

concretamente, del aérea donde se elaboran los productos lácteos (Chávez & Romero, 2006).

4.4 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALSM

Referente a microorganismos aerobios mesófilos, la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2594:(2011) determina un valor máximo de 30000 UFC/ml para un nivel de buena calidad del suero de queso fresco, por otro lado, para un nivel de aceptable calidad, establece un límite de 100000 UFC/ml. En este aspecto, ALSM presentó un valor de $7.65E+03$ UFC/ml para este microorganismo, que indica que la empresa se encuentra dentro del límite permisible para identificar nivel de buena calidad.

Obtuvo un valor de $2.48E+05$ UFC/ml para *Streptococcus*, y $1.70E+03$ UFC/ml en el caso de levaduras.

Se evidenciaron resultados MNPC, en cuanto, a microorganismos como *B. céreus*, *B. subtilis* y *L. spp.* Un aspecto relevante, es que, las muestras de lactosuero de ALSM se encuentran fuera de los límites de calidad microbiológica descritos en la normativa ecuatoriana, debido a que, se concluyó MNPC para el análisis de *Salmonella*, *E. coli* y *L. monocytogenes*; tomando en cuenta, que en la NTE INEN 2594:(2011), se dictamina que lo adecuado en muestras de suero de leche líquido es ausencia para *Salmonella* y *L. monocytogenes*, mientras que, para *E. coli* se establece < 10 UFC/ml para un suero de leche líquido de nivel de buena calidad, y ausencia para un nivel de aceptable calidad.

Finalmente, el resultado para el género *Campylobacter* fue < 30 UFC/ml.

Los valores descritos anteriormente, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALSM)

Microorganismos	UFC/ml
Aerobios mesófilos	7.65E+03
<i>S. aureus</i>	0.00E+00
<i>Streptococcus</i>	2.48E+05
<i>Campylobacter</i>	< 30
Hongos filamentosos	0.00E+00
Levaduras	1.70E+03
<i>Salmonella</i>	MNPC
<i>E. coli</i>	MNPC
<i>L. spp</i>	MNPC
<i>L. monocytogenes</i>	MNPC
<i>B. céreus</i>	MNPC
<i>B. subtilis</i>	9.91E+05

Así mismo, como se muestra en la Figura 5, el productor lácteo ALSM obtuvo en los análisis microbiológicos, resultados positivos, referentes a la presencia de los siguientes microorganismos: aerobios mesófilos, *Streptococcus*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. spp*, *L. monocytogenes*, *B. céreus*, *B. subtilis* y levaduras.

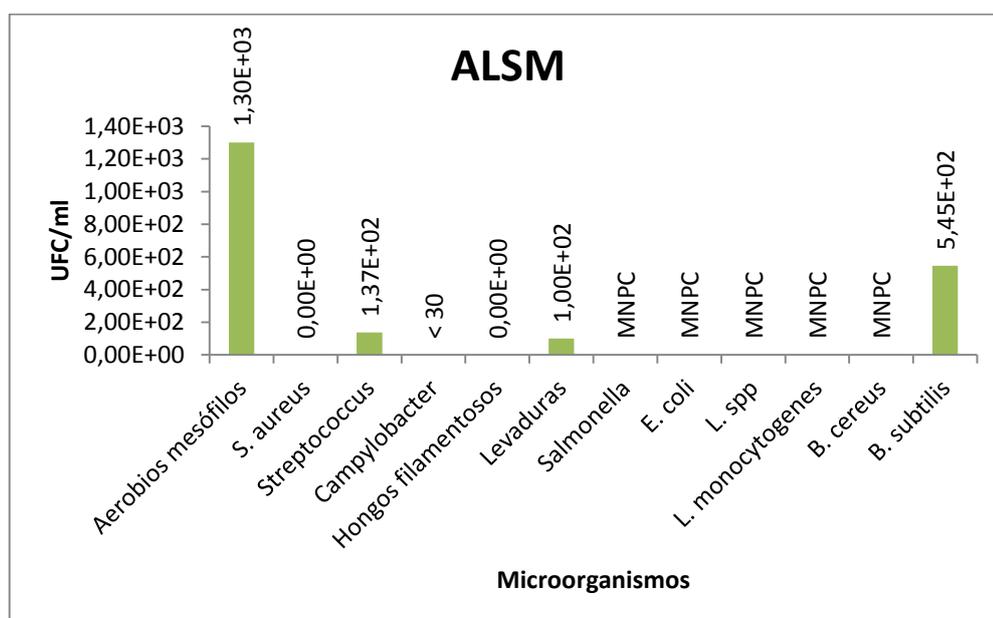


Figura 5. Concentración de microorganismos por ml de muestra de una dilución (ALSM)

En referencia, a la presencia de microorganismos aerobios mesófilos, si bien es cierto, ALSM presentó un resultado dentro de los límites que exige una calidad aceptable del suero de leche, la existencia de este tipo de flora microbiana en las muestras de lactosuero podría indicar información importante acerca de una contaminación inicial de un producto, vida útil probable, descongelación no controlada o posibles fallas en el manejo de las temperaturas de congelación (Alonso & Poveda, 2008), sin embargo, tomando en cuenta, que la concurrencia de este tipo de microorganismos existe en alimentos que se mantienen a temperatura ambiente o refrigeración, siempre y cuando, se haya roto la cadena de frío, y que las muestras de lactosuero utilizadas fueron almacenadas en congelación a -80 °C, se podría deducir, que la contaminación proviene de materias primas, utensilios o de inadecuados tratamientos térmicos aplicados a la leche (pasteurización) (Campos, Rodríguez, Sierra, & Arias, 2003).

Referente a la presencia de *Streptococcus* en las muestras de lactosuero analizadas, ésta se podría atribuir al presunto uso de leche contaminada en la elaboración del queso fresco, posiblemente, durante el ordeño, ocasionando así, una contaminación cruzada de origen mastitogénico

Al igual que para el género *Campylobacter*, la presencia de este microorganismo Gram positivo en el lactosuero puede atribuirse a la contaminación de la leche utilizada como materia prima, principalmente, mediante la piel de los pezones de la ubre bovina, que es un reservorio de microorganismos como *Streptococcus spp* (Ministerio de Salud y Protección Social, UERIA, & Instituto Nacional de Salud INS, 2011). Es decir, si la ubre no es preparada higiénicamente (limpieza y desinfección) antes del ordeño, aumenta la contaminación y transferencia de bacterias.

Si bien es cierto, el género *Staphylococcus*, en la mayoría de casos, contiene los principales patógenos mastitogénicos, también se identifica al género *Streptococcus* como un microorganismo altamente aislado en casos de

mastitis en vacas lecheras, ya sea en ordeño mecánico, o manual como es el caso de esta investigación. De este modo, una vez más, se podría deducir como una viable causa de contaminación de los lactosueros analizados, a la leche utilizada en la elaboración del queso fresco, por ganado lechero enfermo (Faría et al., 2005).

Para la bacteria Gram negativa *Campylobacter*, sólo la empresa ALSM tuvo presencia en sus muestras de lactosuero, con un valor correspondiente a < 30 UFC/ml, en este sentido, aunque aparentemente sea una cuantificación baja, no debería haber existencia de este tipo de microorganismos, ya que, son causantes de infecciones extraintestinales, incluyendo bacteremia, y ciertas consecuencias de la infección, tales como, las polineuropatías, que pueden ser graves, aunque no muy frecuentes (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008).

La transferencia de este microorganismo hacia el organismo humano, causando campilobacteriosis humana, se realiza principalmente por el consumo y manipulación de alimentos de origen animal, y además, por contacto directo con los animales colonizados, en este caso, ganado bovino. De este modo, los forrajes que sirven de alimento para las vacas lecheras pueden ser una buena fuente de microorganismos como *Campylobacter spp*, por consiguiente, se continúa la cadena de contaminación, cuando se utilizan las heces de estos animales como abono de los pastos (Ministerio de Salud y Protección Social, UERIA, & Instituto Nacional de Salud INS, 2011); es decir, la presencia de este microorganismo en las muestras de lactosuero, podría deberse a una contaminación desde la leche utilizada como materia prima.

Otra fuente de contaminación directa al ganado, y de esta forma, a su leche producida, puede constituirse en el agua que bebe el animal, misma que es un medio en el que *Campylobacter spp* tiene la capacidad de desarrollarse y ser viable por más de 4 semanas a 4 °C; dicho microorganismo es altamente versátil a diversos ambientes, especialmente, en el intestino de animales de

sangre caliente (Ministerio de Salud y Protección Social, UERIA, & Instituto Nacional de Salud INS, 2011).

Los resultados positivos para la presencia de levaduras y coliformes fecales (específicamente, *E. coli*) en productos lácteos y sus derivados, podrían presumir condiciones higiénicas deficientes durante la elaboración y almacenamiento de los productos, en este caso, lactosuero. Del mismo modo, dicha contaminación indicaría una relación directa con la higiene locativa de los sitios de fabricación (Chams, Cury, & Aguas, 2012).

En el caso del microorganismo *Salmonella*, como se mencionó anteriormente, su existencia al realizar análisis microbiológicos en las muestras de lactosuero, probablemente, sería un indicador de contaminación vía fecal y, por ende, de inadecuados controles higiénicos durante la elaboración del queso fresco. Cabe mencionar, que consecuentemente, este microorganismo es altamente patógeno para el organismo humano (Chávez & Romero, 2006).

Para el género *Listeria*, ALSM mostró presencia, tanto de *L. spp* y *L. monocytogenes*. Un aspecto interesante y preocupante de este microorganismo, es su capacidad para habitar ambientes con diversas características: suelo, aguas residuales, materia fecal, sitios de procesamiento de alimentos, entre otros (Morales, 2015).

En los microorganismos Gram positivos, como es el caso de la *Listeria*, la pared celular es diez veces más gruesa que la de las bacterias Gram negativas (conformada por capa simple de peptidoglicano cubierta por membrana), por su composición en peptidoglicano (asociados con ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos) estructurado complejamente en múltiples capas. Ésto le confiere a la bacteria, resistencia a desinfectantes usados en el tratamiento del pezón de la vaca, previo al ordeño y, por ende, gran vulnerabilidad a la inocuidad de la leche y sus derivados, más aún, si no se realizan eficientes tratamientos térmicos a la materia prima, como se

sospecha por los resultados microbiológicos obtenidos para los otros tipos de microorganismos analizados (Konosonoka, Jemeljanovs, Ikauniece, Osmane, & Gulbe, 2012).

Referente al género *Bacillus*, al igual que para *Streptococcus*, una posible causa para su viabilidad, es la enfermedad por mastitis en el ganado lechero (Faría, Valero, D'Pool, García, & Allara, 2005).

Para el caso de las levaduras, los resultados obtenidos en este estudio, podrían poseer un vínculo estrecho con la higiene locativa de los sitios de elaboración (Chams, Cury, & Aguas, 2012).

4.5 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALDA

ALDL presentó un valor de $5.15E+05$ UFC/ml para la presencia de microorganismos aerobios mesófilos, es decir, se encuentra dentro del límite permisible para identificar nivel de buena calidad, ya que, la NTE INEN 2594:(2011) establece un valor máximo de 30000 UFC/ml para un nivel de buena calidad del suero de queso fresco, mientras que, para un nivel de aceptable calidad, determina un límite de 100000 UFC/ml.

Referente a *E. coli*, la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2594:(2011) determina un valor máximo de < 10 UFC/ml para un suero de leche líquido de nivel de buena calidad, y ausencia para un nivel de aceptable calidad. Por esta razón, el productor lácteo ALDA no cumplió con dicho parámetro microbiológico de la normativa ecuatoriana, al obtenerse un valor de $1.59E+06$ UFC/ml para este microorganismo.

Finalmente, se obtuvieron resultados MNPC para los microorganismos: *Streptococcus*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *L. spp*, *B. subtilis* y levaduras, incumplándose los límites establecidos en la NTE INEN 2594:(2011),

referentes, a la presencia del género *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, ya que, para ambos microorganismos se establece ausencia como valor ideal en muestras de suero de queso fresco líquido.

Los resultados expresados anteriormente, se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALDA)

Microorganismos	UFC/ml
Aerobios mesófilos	5.15E+04
<i>S. aureus</i>	0.00E+00
<i>Streptococcus</i>	MNPC
<i>Campylobacter</i>	0.00E+00
Hongos filamentosos	0.00E+00
Levaduras	MNPC
<i>Salmonella</i>	MNPC
<i>E. coli</i>	1.59E+06
<i>L. spp</i>	MNPC
<i>L. monocytogenes</i>	MNPC
<i>B. cereus</i>	0.00E+00
<i>B. subtilis</i>	MNPC

Del mismo modo, como se muestra en la Figura 6, el productor lácteo ALDA obtuvo en los análisis microbiológicos, resultados positivos, referentes a la presencia de microorganismos aerobios mesófilos, *Streptococcus*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. spp*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* y levaduras.

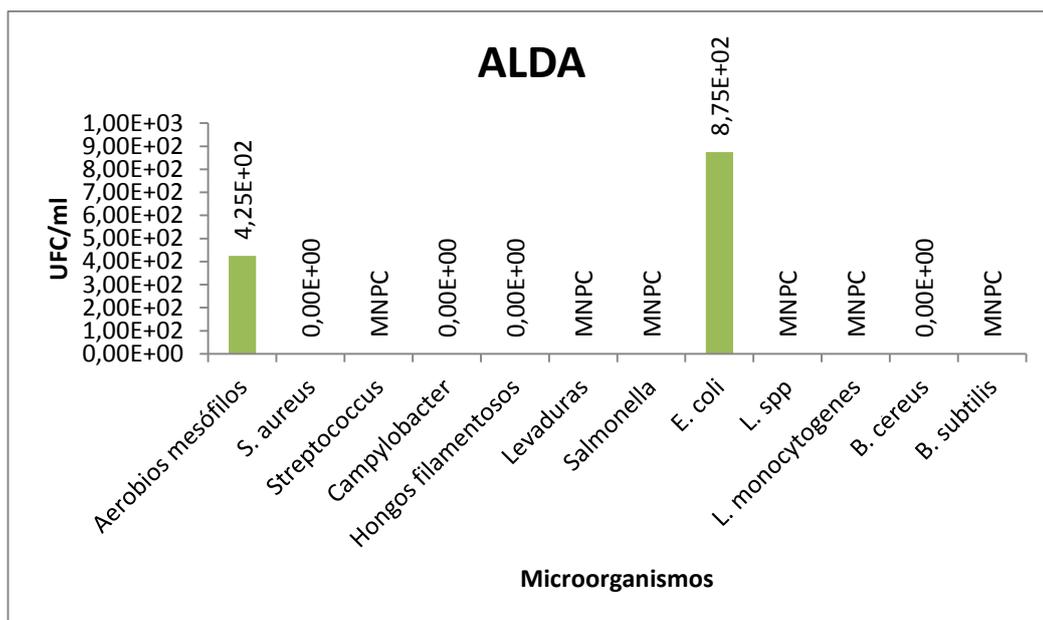


Figura 6. Concentración de microorganismos por ml de muestra de una dilución (ALDA)

La presencia de microorganismos aerobios mesófilos, como se mencionó anteriormente, podría atribuirse a materias primas, utensilios o deficiente pasteurización de la leche utilizada como materia prima (Campos, Rodríguez, Sierra, & Arias, 2003). Además, los resultados positivos ligados a la presencia de estos microorganismos, se asocian con la vida útil y alteración de un producto alimenticio, tal como se indica en la Norma Técnica de Salud N° - MINSA/DIGESA-V.01 Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Dentro de este grupo de microorganismos indicadores de alteración, igualmente, se encuentran las levaduras que se puedan encontrar presentes en un producto (MINSA, 2007).

Por otro lado, la existencia de *Streptococcus* en las muestras de lactosuero utilizadas para el análisis microbiológico, puede ser causada por la contaminación de la leche utilizada en la elaboración de queso fresco, a través, de la piel de los pezones de la ubre bovina, como se mencionó anteriormente. Por esta razón, la ubre debe encontrarse limpia y desinfectada,

previo al proceso de ordeño. (Ministerio de Salud y Protección Social, UERIA, & Instituto Nacional de Salud INS, 2011).

La NTS N° - MINS/DIGESA-V.01, establece además, un grupo de microorganismos indicadores de higiene, en el que se encuentra *E. coli* (MINS, 2007). Se debe recalcar, que además de ser una bacteria Gram negativa de origen fecal, es vulnerable a la destrucción por pasteurización (Pimienta & Vergara, 2007), por lo que, se podría deducir un deficiente tratamiento térmico de la leche utilizada como materia prima para la elaboración de queso fresco.

Por otro lado, los microorganismos encontrados en las muestras de lactosuero, correspondientes, a los géneros *Salmonella*, *Listeria* y *Bacillus*, en la normativa peruana citada anteriormente, son denominados microorganismos patógenos, cuya presencia condicionaría peligro para la salud humana (MINS, 2007).

4.6 MICROBIOLOGÍA EN MUESTRAS DE LACTOSUERO DEL PRODUCTOR LÁCTEO ALK

Referente a *E. coli*, la NTE INEN 2594:(2011) establece un valor máximo de < 10 UFC/ml para un suero de leche líquido de nivel de buena calidad, y ausencia para un nivel de aceptable calidad. Por esta razón, el productor lácteo ALK no cumplió esta medida microbiológica de la normativa ecuatoriana, al obtenerse un valor de 1.19E+04 UFC/ml para este microorganismo.

En cuanto a levaduras, los resultados indicaron 7.30E+05 UFC/ml para el análisis microbiológico realizado.

Finalmente, se obtuvieron resultados MNPC para los microorganismos: *Streptococcus*, *B. cereus* y *B. subtilis*. Los resultados expresados anteriormente, se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración total de microorganismos presentes en 250 ml de muestra (ALK)

Microorganismos	UFC/ml
Aerobios mesófilos	0.00E+00
<i>S. aureus</i>	0.00E+00
<i>Streptococcus</i>	MNPC
<i>Campylobacter</i>	0.00E+00
Hongos filamentosos	0.00E+00
Levaduras	7.30E+05
<i>Salmonella</i>	0.00E+00
<i>E. coli</i>	1.19E+04
<i>L. spp</i>	0.00E+00
<i>L. monocytogenes</i>	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	MNPC
<i>B. subtilis</i>	MNPC

Así mismo, como se muestra en la Figura 7, el productor lácteo ALK presentó en sus análisis microbiológicos, existencia de *Streptococcus*, *E. coli*, *B. céreus*, *B. subtilis* y levaduras.

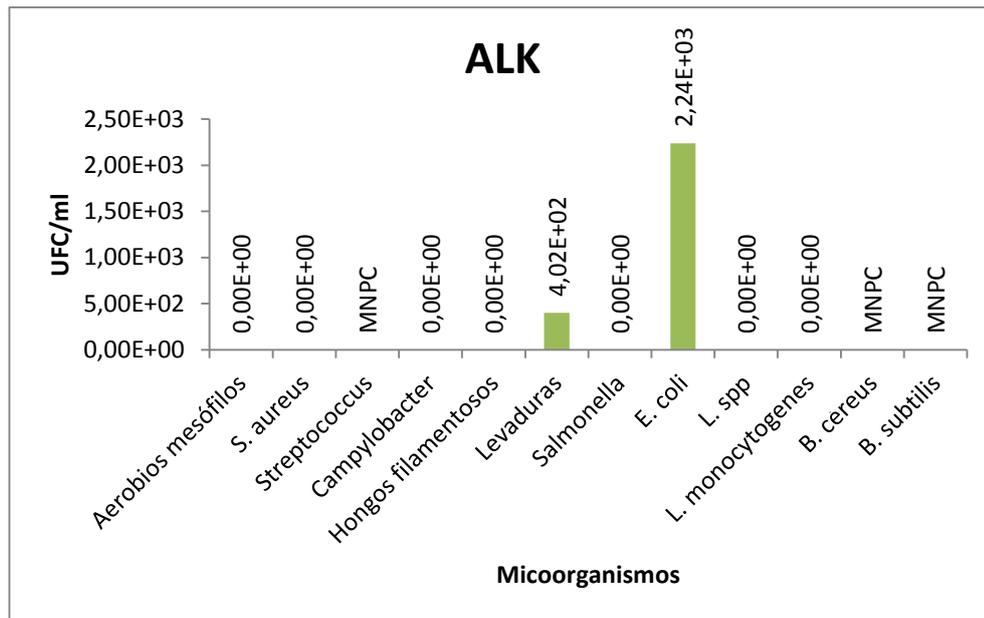


Figura 7. Concentración de microorganismos por ml de muestra (ALK)

Tanto la presencia de microorganismos del género *Streptococcus*, como del género *Bacillus*, podría ser causada por la posible existencia de vacas infectadas de mastitis, ya que, dentro de la diversidad de agentes etiológicos que la causan, se encuentran estos géneros; por ésto se podría sospechar de una calidad deficiente de los lactosueros, debido a, enfermedad de ganados lecheros (Faría, Valero, D´Pool, García, & Allara, 2005).

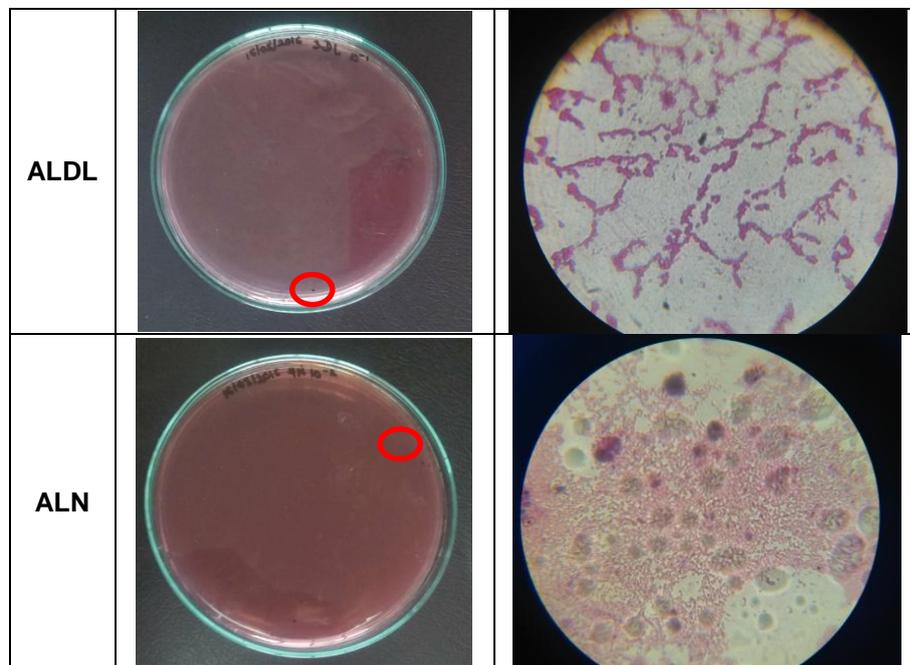
En cuanto, a la bacteria *E. coli* en las muestras de lactosuero, al ser un microorganismo indicador de higiene, se supone contaminación por materia fecal de los sueros de queso fresco durante su proceso de elaboración (Grandos , Acevedo, & Torres, 2012). Además, de posibles fallas durante la pasteurización de la leche utilizada (Pimienta & Vergara, 2007).

Finalmente, las levaduras, como se ha mencionado en este documento, son microorganismos indicadores de alteración, relacionándose directamente, con la vida útil y alteración de un producto alimenticio (MINSa, 2007).

4.7 TINCIÓN GRAM DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE LACTOSUERO DE LOS PRODUCTORES LÁCTEOS

Finalmente, posterior a realizar el procedimiento de tinción Gram sobre los inóculos obtenidos, fueron analizados al microscopio, con la finalidad, de realizar una primera diferenciación bacteriana. Se manifestaron dos tipos de coloraciones, en base, a ciertas características de las paredes celulares de las células observadas; las células decoloradas que admitieron el colorante contraste, se definieron como Gram negativas (color rosa); por otro lado, las células que no se decoloraron pero retuvieron la solución cristal violeta-amonio, fueron especificadas como Gram positivas (INEN, 2015).

Como se muestra en Figura 8, los microorganismos aerobios mesófilos detectados en los lactosueros de los cinco productores lácteos de Machachi, se mostraron Gram negativos (color rosa) frente a la tinción realizada.



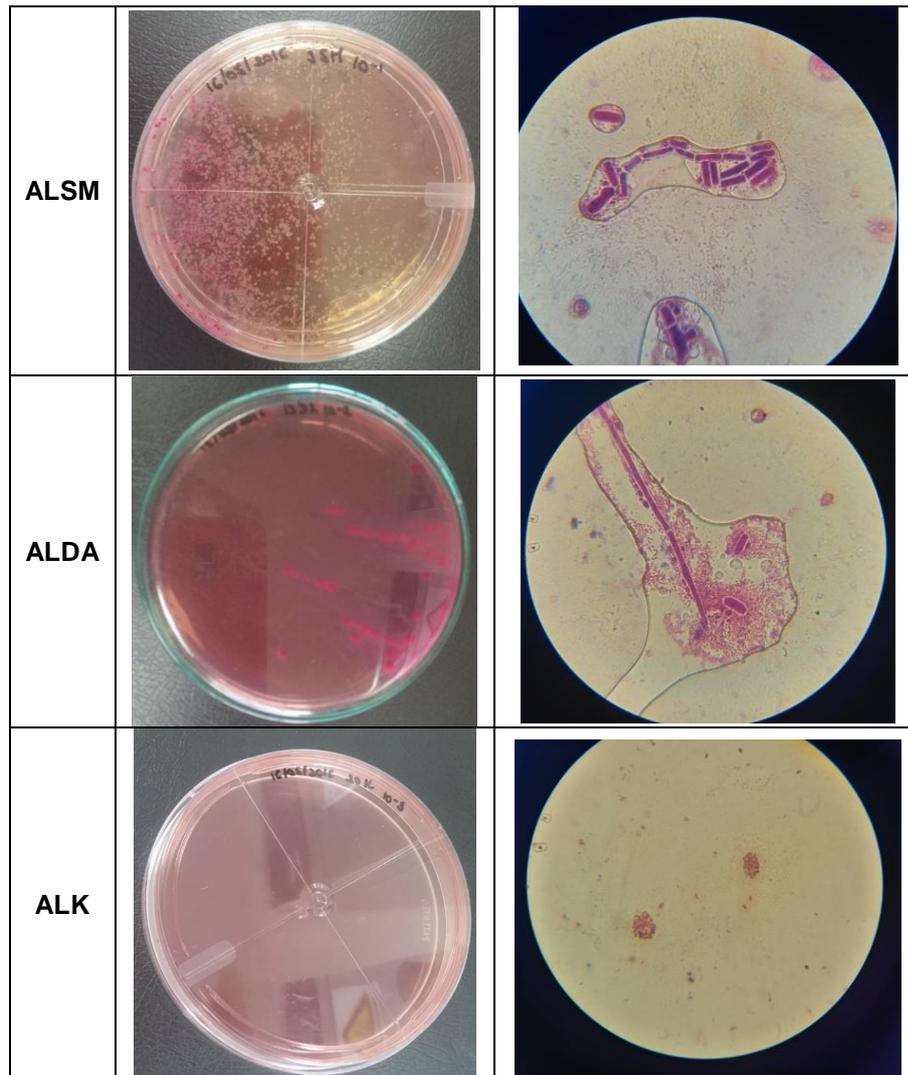
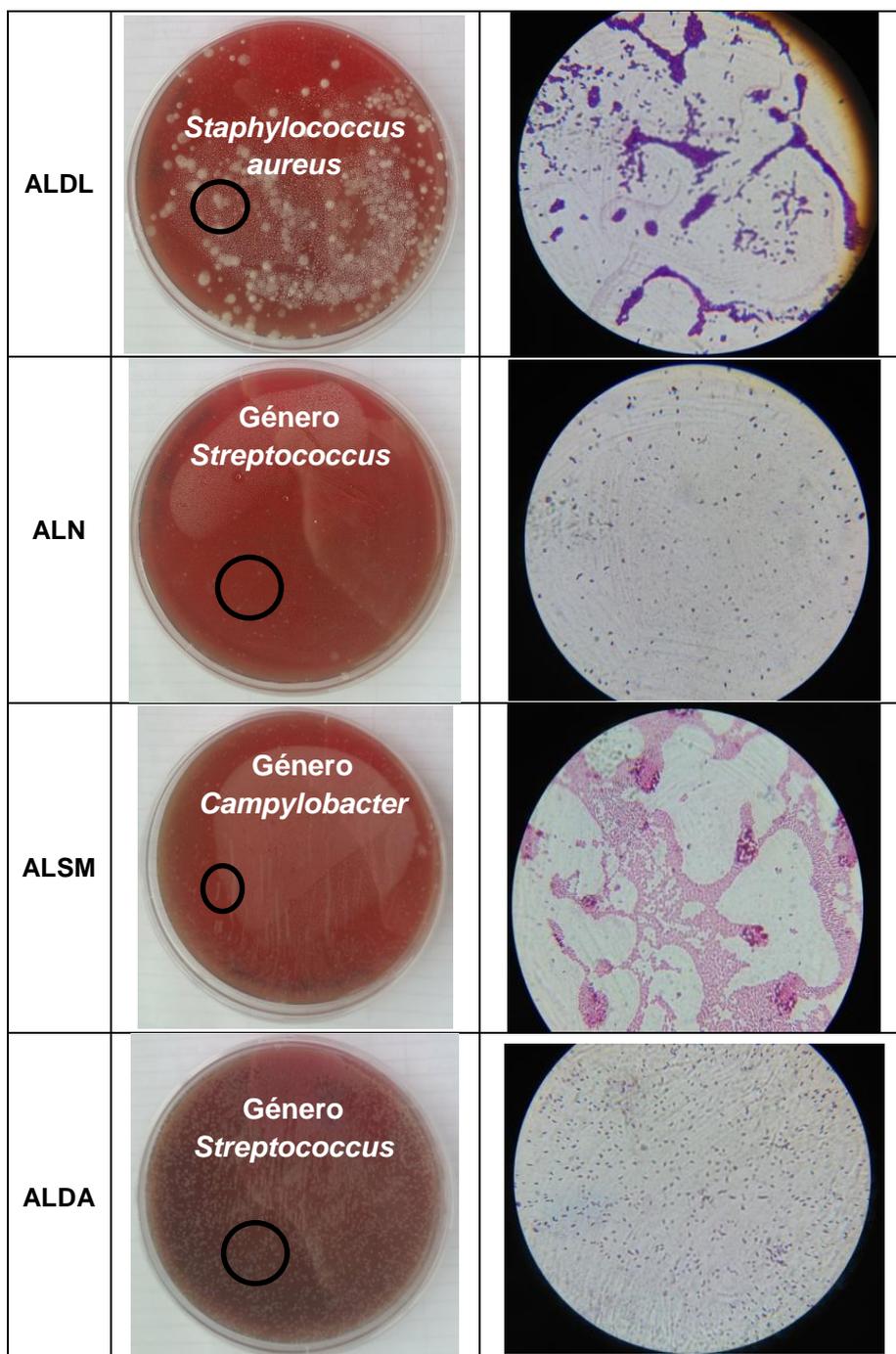


Figura 8. Microorganismos aerobios mesófilos (agar Macconkey: placa Petri y tinción Gram)

La tinción Gram permitió corroborar la información teórica determinada en la NTE INEN 1529-14:2013, referente específicamente, al grupo de bacterias al que pertenece el microorganismo *Staphylococcus aureus*, de acuerdo, a la coloración resultante posterior a realizar tinción Gram. En este sentido, en el caso de la bacteria *S. aureus*, este microorganismo presentó un comportamiento de bacteria Gram positiva (coloración violeta) frente al microscopio óptico (INEN, 2013), al igual, que las bacterias del género *Streptococcus* analizadas (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008).

Por otro lado, la tinción de la bacteria del género *Campylobacter*, se manifestó Gram negativa (color rosa) (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008).

Los resultados anteriormente descritos, se muestran en la Figura 9.



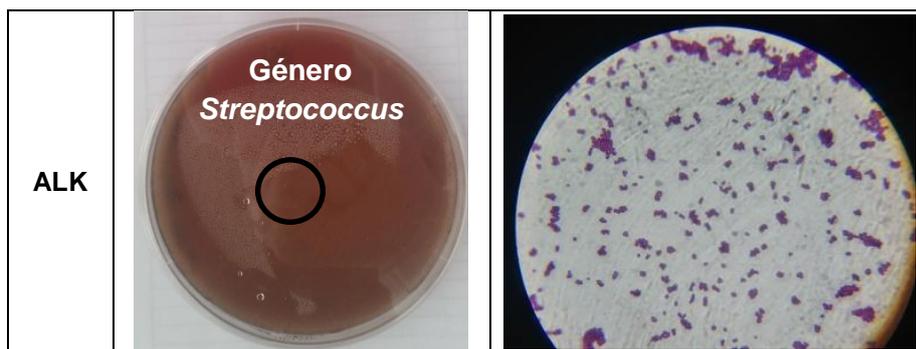
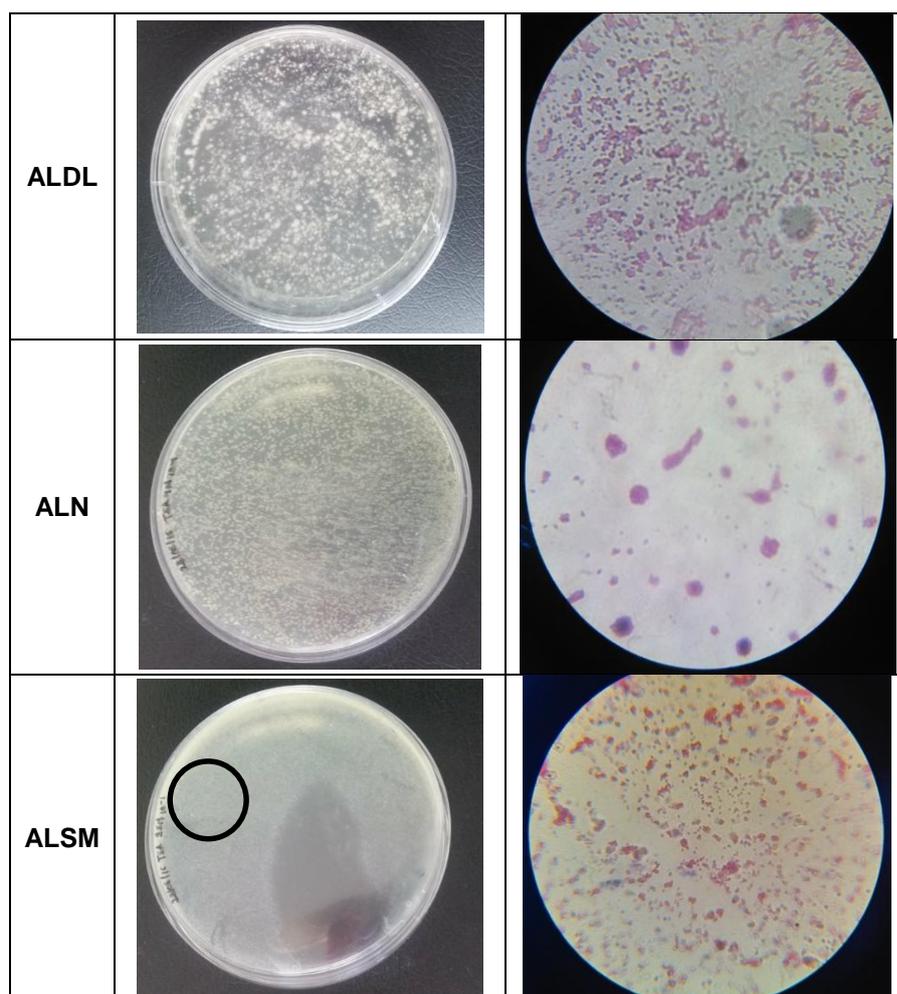


Figura 9. Géneros *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* y *Campylobacter* (agar sangre: placa Petri y tinción Gram)

En cuanto, a la bacteria *E. coli*, la tinción Gram realizada coincidió con lo descrito en la NTE INEN 1529-8:1990, referente, a que esta bacteria es de tipo Gram negativa (INEN, 1990), como se muestra en la Figura 10.



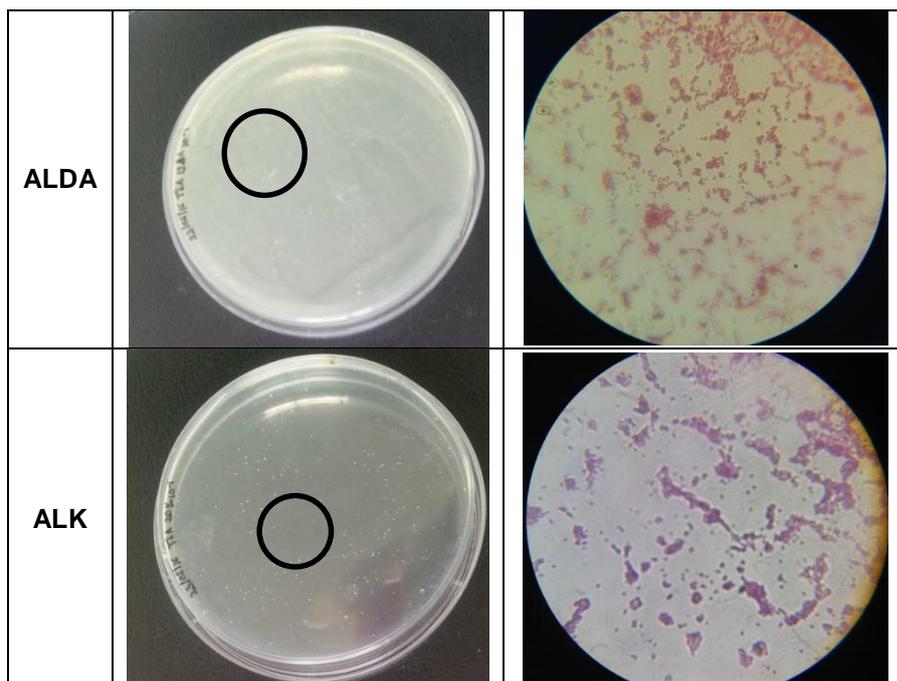
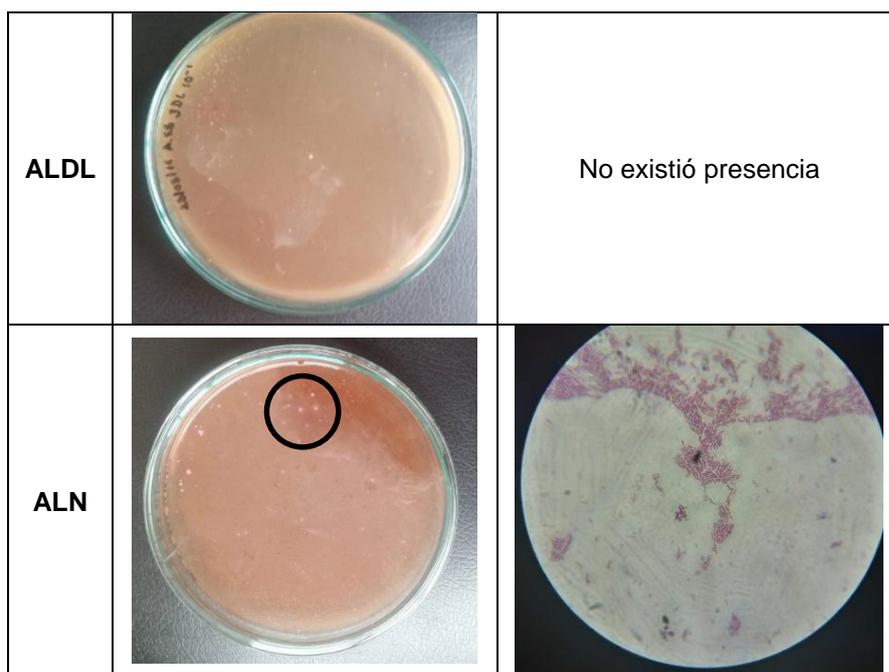


Figura 10. *Escherichia coli* (agar TSA: placa Petri y tinción Gram)

Los microorganismos del género *Salmonella*, según la NTE 1529-15:2009 pertenecen al grupo de bacterias Gram negativas (color rosa), por esta razón, al realizar la tinción Gram se confirmó dicha información teórica establecida por la normativa ecuatoriana, como se muestra en la Figura 11 (INEN, 2009).



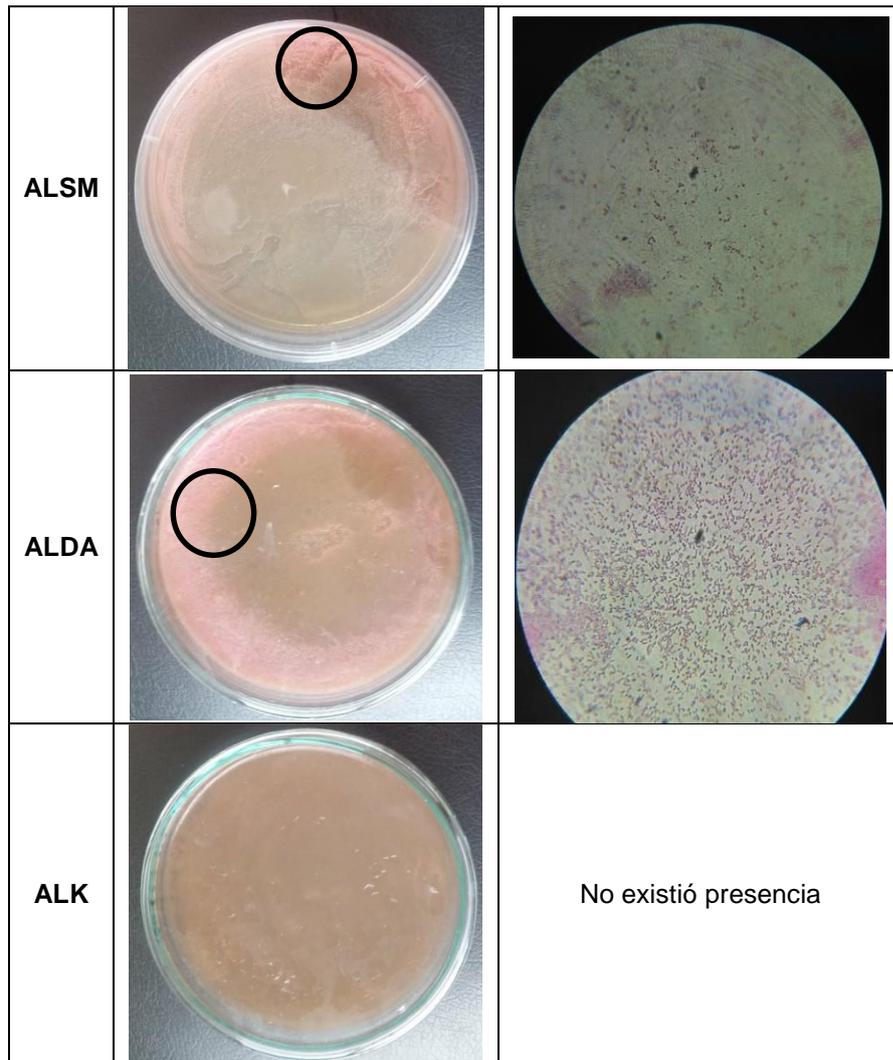


Figura 11. Género *Salmonella* (agar SS: placa Petri y tinción Gram)

La tinción Gram realizada sobre los inóculos obtenidos de género *Listeria*, permitió corroborar la información establecida en la Norma Oficial Mexicana 143-ssa1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*; acerca de que este tipo de microorganismos forman parte del grupo de bacterias Gram positivas (IMNC, 1995), manifestando una coloración rosada al microscopio óptico, como se muestra en la Figura 12.

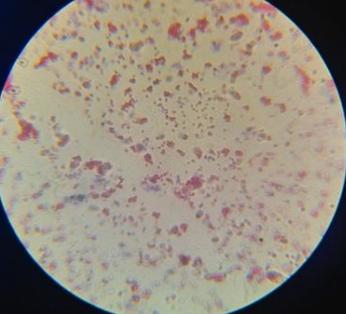
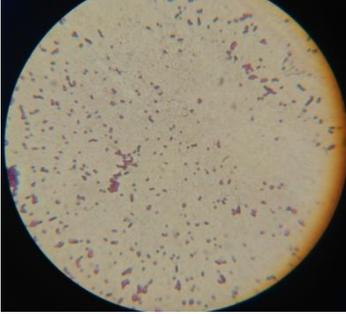
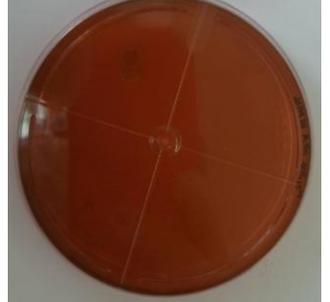
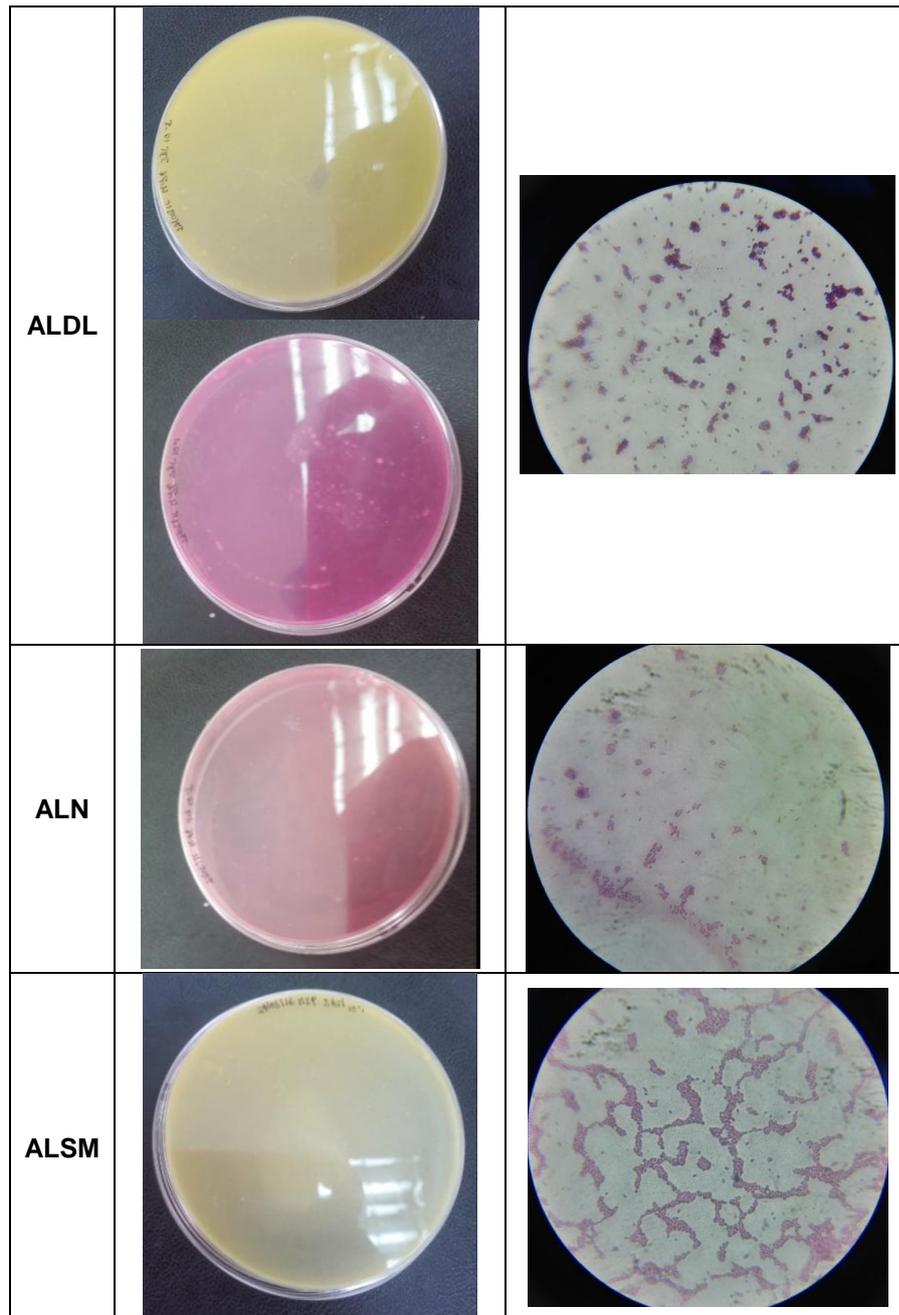
ALDL		No existió presencia
ALN		
ALSM		
ALDA		
ALK		No existió presencia

Figura 12. Género *Listeria* (agar Oxford: placa Petri y tinción Gram)

Finalmente, para el género *Bacillus*, como se muestra en la Figura 13, las coloraciones obtenidas fueron del tipo Gram positivas (color violeta), confirmando así, la información establecida en la NTE INEN – ISO 21871 (primera edición) Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de números bajos de presuntos *Bacillus cereus*. Técnica del número más probable y método de detección (INEN, 2014).



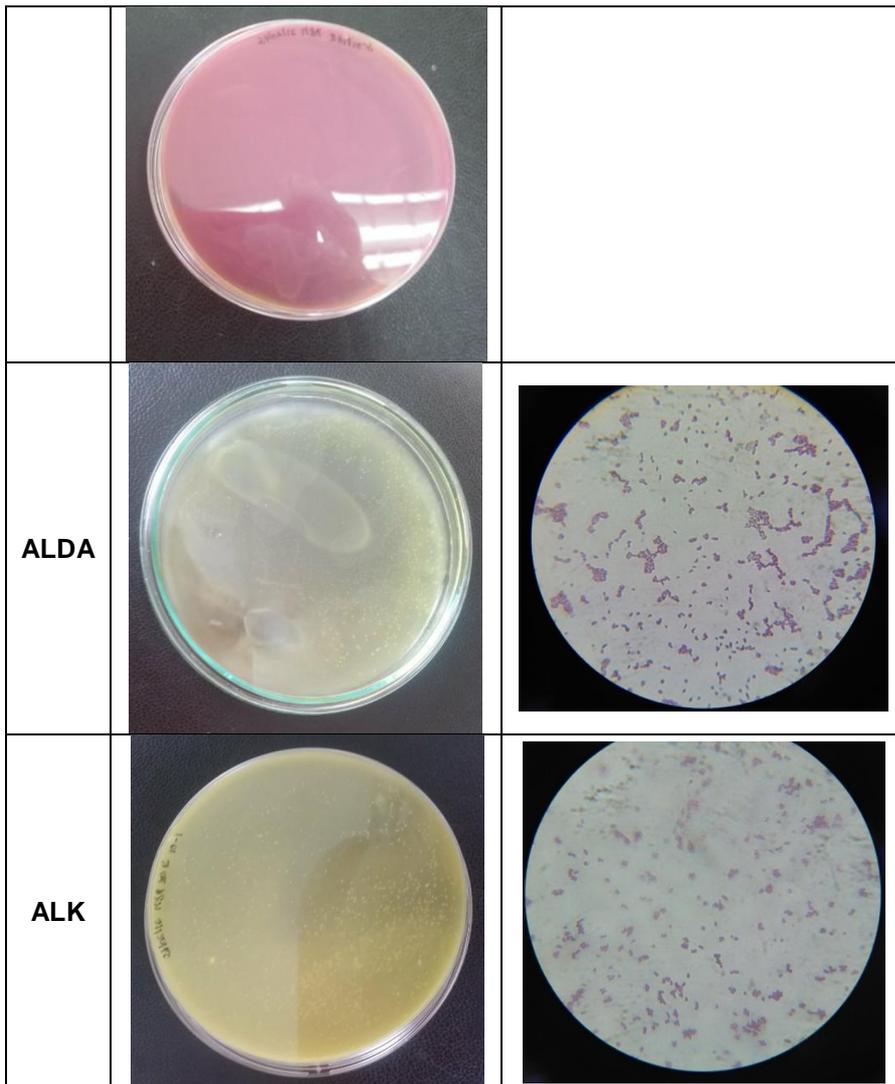


Figura 13. Género *Bacillus* (agar MYP: placa Petri y tinción Gram)

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se determinó la línea de base del proyecto de lactosuero, que será punto de partida para la planificación acciones concretas. La información recibida, resultó de gran importancia para el conocimiento de los principales indicadores de producción en la industria lechera del cantón Mejía.
- Se identificaron cinco productores lácteos del cantón Mejía, pertenecientes a la parroquia Machachi, con un rango de producción diaria de 500 – 1000 litros de lactosuero.
- La calidad de los lactosueros, correspondientes, a los cinco productores lácteos analizados, es deficiente en términos de inocuidad y no cumple con los parámetros microbiológicos establecidos por la normativa ecuatoriana. Sin embargo, no están determinadas claramente las fuentes de origen de la flora microbiana, que en la mayoría de los casos se ha evidenciado es patógena.
- La bacteria de origen fecal *E. coli*, presentó crecimiento en las muestras de los cinco productores lácteos analizados. Los valores altos encontrados son indicadores de falta de higiene durante el proceso de elaboración y obtención de queso fresco y lactosuero, por lo que, se estaría comprometiendo la inocuidad alimentaria, y por ende, la salud del consumidor.
- La presencia de microorganismos aerobios mesófilos y levaduras en productos, en este caso específico, suero de leche, sugiere la alteración del mismo, en cuanto, a su vida útil. Además, en el caso

concreto de las levaduras, su existencia tiene estrecha relación con la higiene del sitio en el que se elabora el queso fresco y se obtiene el lactosuero.

- La existencia de bacterias de género *Bacillus*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*, indica patogenicidad. Por esta razón, la presencia de estos microorganismos en las muestras de lactosuero, advierte la probable ocurrencia de enfermedades alimentarias, si existe consumo humano de este producto.

5.2 RECOMENDACIONES

- Garantizar análisis microbiológicos permanentes, tanto de materias primas, como de productos terminados y subproductos, así como a nivel interno en las empresas del cantón Mejía.
- Realizar estudios microbiológicos similares de las materias primas (leche) utilizadas en las industrias lácteas analizadas, utensilios involucrados en el proceso de los quesos frescos elaborados en el cantón Mejía, y finalmente, a los manipuladores involucrados directamente en el proceso; con la finalidad, de determinar la fuente de contaminación microbiológica exacta de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, L., & Poveda, J. (2008). Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el mercado y Placas Perifilm 3M para el análisis de alimentos. Recuperado el 3 de mayo del 2016, de: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
- Barrionuevo, M. (2011). Desarrollo de la tecnología para elaborar bolos a partir de suero de leche dulce con la adición de pulpa de fruta, azúcar y gelatina. Recuperado el 5 de mayo del 2016, de: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3109/1/PAL246.pdf>
- Becton, Dickinson y Company. (2003). DIFCO™ Oxford medium base DIFCO™ Oxford antimicrobial supplement DIFCO™ modified Oxford. Recuperado el 3 de mayo del 2016, de: [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/S11931JAA\(0103\).pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/S11931JAA(0103).pdf)
- Buñay , N., & Peralta, F. (2015). Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que ingresa a industrias lacto Ochoa - Fernández Cia. Ltda. Recuperado el 7 de junio del 2016, de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/21584>
- Campos, J., Rodríguez , C., Sierra , A., & Arias, Á. (2003). Estudio microbiológico de las comidas servidas en los comedores escolares de la Isla de Tenerife. Recuperado el 3 de mayo del 2015, de: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272003000600008
- Chams , L., Cury, K., & Aguas, Y. (2012). Evaluación microbiológica de suero costeño y valoración higiénica en puntos de venta en Montería, Córdoba. Recuperado el 10 de mayo del 2016, de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4167608>
- Chávez, A., & Romero, Á. (2006). Diagnóstico de las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas del queso costeño producido en el

Municipio de Sincé - Sucre (Colombia). Recuperado el 5 de mayo del 2016, de: <http://unisucre-repositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/263/2/T637.32%20C512.pdf>

Córdoba, R. (2013). Metodología alternativa para la reutilización del suero de queso en base a derivados de la industria cañera. Recuperado el 15 de mayo del 2016, de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/33718/1/cordobamarquezruben.pdf>

DIFCO. (2009). DIFCO & BBL Manual. Recuperado el 3 de mayo del 2016, de: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/274720.pdf

Doutoum, A., Tidjani , A., Balde , M., Abdelaziz , I., Sylla , K., Seydi , M., y otros. (2013). Identification of Lactic Bacteria of Milk Quail in Chad. Recuperado el 2 de mayo del 2016, de: http://jabonline.in/admin/php/uploads/18_pdf.pdf

Dpto Química Orgánica Universidad de Buenos Aires. (2012). Microbiología de Alimentos. Recuperado el 5 de mayo del 2016, de: http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/2012/08/Guia_Medios_2012.pdf

Dpto Química Orgánica Universidad de Buenos Aires. (2013). Microbiología de Alimentos: Módulo II. Recuperado el 5 de mayo del 2016, de: http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/2013/02/Guia-Micro-Alim-Mod-II_2013.pdf

Duque, C. (2014). Formulación de una solución melaza-bacterias para el tratamiento de lixiviados en el relleno sanitario de Machachi cantón mejía. Recuperado el 8 de junio del 2016, de: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4671/1/56631_1.pdf

- Endara, F. (2002). Elaboración de una bebida a partir del suero de queso y leche descremada con sabor a mango. Recuperado el 20 de mayo del 2016, de:
<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1536/1/T1523.pdf>
- Faría , J., Valero, K., D' Pool, G., García, A., Allara, M., & Morales, D. (2005). Agentes bacterianos y contaje de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del estado Zulia, Venezuela. Recuperado el 10 de junio del 2016, de:
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28292/2/art9.pdf>
- Faría , J., Coromoto , A., & Hernández, A. (2002). Efecto de la tecnología quesera sobre la composición del suero lácteo. Recuperado el 6 de junio del 2016, de:
<http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/multiciencias/article/view/16571/16544>
- Faría , J., Valero, K., D'Pool , G., García, A., & Allara, M. (2005). Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. Recuperado el 3 de junio del 2016, de:
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28313/2/art5.pdf>
- Fernández , L., Rojas, N., Roldán , T., Ramí, M., Zegarra , H., Uribe, R., y otros. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos. Recuperado el 5 de mayo del 2016, de:
<http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/509.pdf>
- Gómez, C., Villarruel, A., Torres, M., & Castro, J. (2012). The role of foods in *Salmonella* infections. In: *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen*. Recuperado el 1 de junio del 2016, de:
<http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/producto.php?producto=4749>

- González, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., & Villarreal, J. (2010). Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección. Recuperado el 10 de junio del 2016, de: <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/5458/5594>
- Grandos , C., Acevedo, D., & Torres, R. (2012). Calidad de la leche y del suero costeño de los municipios Turbaco, Arjona y Carmen de Bolívar – Colombia. Recuperado el 12 de junio del 2016, de: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/966/1/132-137.pdf>
- Hernández, M., & Vélez, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Recuperado el 17 de mayo del 2016, de: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-82-Hernandez-Rojas-et-al-2014.pdf>
- Hernández, R. (2013). Caracterización fisicoquímica de un producto tipo cajeta elaborado a partir del suero dulce de quesería. Recuperado el 17 de junio del 2016, de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/33720/1/hernandezmateosraymundo.pdf>
- IMNC. (1995). NOM-143-ssa1:1995 Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Recuperado el 5 de junio del 2016, de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>
- INEN. (1990). NTE INEN 1529-8:1990 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E. coli*. Recuperado el 5 de junio del 2016, de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.8.1990.pdf>
- INEN. (2009). NTE INEN 1529-15:2009 Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*. Método de detección. Recuperado el 5 de junio

del 2016, de:
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.15.1996.pdf>

INEN. (2013). NTE INEN 1529-14:2013 Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie. Recuperado el 5 de junio del 2016, de:
<http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-14-1R.pdf>

INEN. (2014). NTE INEN-ISO 21871:2014 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de números bajos de presuntos *Bacillus cereus*. Técnica del número más probable y método de detección (iso 21871:2006, idt). Recuperado el 5 de junio del 2016, de: http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/DRO/nte_inen_iso_21871extracto.pdf

INEN. (2011). NTE INEN 2594:2011 Suero de leche líquido. Requisitos. Recuperado el 12 de mayo del 2016, de:
<http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/2594.pdf>

INEN. (2013). NTE INEN 1529-10:1998 Control microbiológico de los alimentos. mohos y levaduras viables. recuentos en placa por siembra en profundidad. Recuperado el 14 de junio del 2016, de:
http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/ACO/17122014/nte-inen-1529-10-1r.pdf

INEN. (2013). NTE INEN 1529-2:2013 Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Recuperado el 8 de mayo del 2016, de:
<http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-2-1R.pdf>

INEN. (2015). NTE INEN 21:1984 Leche pasteurizada contaje de bacterias coliformes. Recuperado el 5 de mayo del 2016, de:
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0021.1985.pdf>

- Jácome, E., & Molina, S. (2008). Efecto de la Leche Concentrada por Microfiltración Tangencial en la Calidad de Queso Semimaduro para Sánduche, Utilizando Dos Líquidos Lavado y Diferentes Tipos de Grasa. Recuperado el 5 de junio del 2016, de: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123>
- Juan, A., De la O, R., Vázquez, M., Ríos, M., & Rosas, B. (2011). Dinámica de *Listeria monocytogenes* y cambios concurrentes en la microbiota asociada, pH y acidez durante la elaboración y almacenamiento de queso panela. Recuperado el 25 de mayo del 2016, de: <http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/antologiainocuidadalimentaria.pdf>
- Juan, A., Vázquez, M., & Rosas, B. (2011). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco panela y queso fresco rancho que se expenden en mercados de Guadalajara, Jalisco. Recuperado el 22 de mayo del 2016, de: <http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/antologiainocuidadalimentaria.pdf>
- Juan, A., Vázquez, M., Rosas, B., & De la O, R. (2011). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco panela y queso fresco rancho que se expenden en mercados de Guadalajara, Jalisco. Recuperado el 28 de mayo del 2016, de: <http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/antologiainocuidadalimentaria.pdf>
- Konosonoka, I., Jemeljanovs, A., Ikaunieca, D., Osmane, B., & Gulbe, G. (2012). Incidence of *Listeria spp.* in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. Recuperado el 1 de junio del 2016, de: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/435187/citations/>
- Londoño, M., Sepúlveda, J., Hernández, A., & Parra, J. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus*

casei. Recuperado el 1 de junio del 2016, de:
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24741>

Lundén , J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2004). Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. Recuperado el 9 de junio del 2016, de: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(04\)70056-9/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(04)70056-9/abstract)

Manual de la OIE sobre animales terrestres. (2008). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Recuperado el 11 de junio del 2016, de: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.03.%20Campilobacter%20jejuni.pdf

Martínez, M., & Gómez, C. (2014). Calidad composicional e higiénica de la leche cruda recibida en industrias lácteas de Sucre, Colombia. Recuperado el 1 de junio del 2016, de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612013000200011&script=sci_arttext&tlng=es

Merckmillipore. (2016). *Oxford Listeria* Selective Agar, Base. Recuperado el 19 de mayo del 2016, de: [http://www.merckmillipore.com/INTL/es/product/Agar-selectivo-para-Listeria-Oxford-\(base\),MDA_CHEM-107004](http://www.merckmillipore.com/INTL/es/product/Agar-selectivo-para-Listeria-Oxford-(base),MDA_CHEM-107004)

Ministerio de Salud y Protección Social, UERIA, & Instituto Nacional de Salud INS. (2011). Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Recuperado el 5 de junio del 2016, de: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf>

MINSA. (2007). NTS N° - MINSA/DIGESA-V.01:2007 Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano . Recuperado el 15

de junio de 2016, de
http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/RM%20615-2003MINSA.pdf

Morales, A. (2015). Efecto antimicrobiano del aceite esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta. Recuperado el 11 de junio del 2016, de:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/50994/1/1044503145.2015.pdf>

Morales, R. (2011). Elaboración de una bebida de tipo funcional para la alimentación a partir de lactosuero. Recuperado el 2 de junio del 2016, de:
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/32478/1/moraleslozano.pdf>

Moreno, M. (2015). Optimización del proceso de fabricación de queso fresco con sustitución parcial de requesón. Recuperado el 2 de junio del 2016, de:
<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/9368/1/AL%20560.pdf>

Mulky, Y. (2012). Desarrollo del proceso de elaboración del queso crema para impulsar la industrialización de la leche en la parroquia el Chaupi - Machachi. Recuperado el 2 de junio del 2016, de:
http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4984/1/51187_1.pdf

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2008). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Recuperado el 4 de junio del 2016, de:
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.03.%20Campilobacter%20jejuni.pdf

Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Recuperado el 7 de junio del 2016, de:
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>

Pimienta, A., & Vergara, J. (2007). Caracterización e identificación de los microorganismos causantes de la fermentación en el suero costeño utilizando leche de vaca de dos regiones diferentes. Recuperado el 1 de junio del 2016, de:

<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/16070/43991079.pdf?sequence=2>

Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. Recuperado el 8 de junio del 2016, de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0717-75182013000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Rodríguez, G. (2008). Géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. Recuperado e 5 de junio del 2016, de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>

Rodríguez, J., & Torres, L. (2006). Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias acidolácticas aisladas de suero costeño. Recuperado el 4 de junio del 2014, de: <http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/4749/130508.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sánchez, G., Gil, M., Gil, M., Giral, F., Millán, L. d., & Villada, M. (2009). Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes. Recuperado el 15 de mayo del 2016, de: <http://www.lasallista.edu.co/fxcul/media/pdf/RevistaLimpia/Vol4n2/65-74.pdf>

Sharup , E., & Tepán, J. (2009). Estandarización de procesos para la elaboración de yogurt, queso fresco y mozzarella en la empresa de lácteos “Doña Celeste” (Coprogrirón). Recuperado el 18 de mayo del 2016, de: <http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/tq995.pdf>

Sistema Nacional de Información. (2015). Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento y ordenamiento territorial. Recuperado el 4 de junio del 2016, de: <http://app.sni.gob.ec/visorseguimiento/DescargaGAD/data/sigadplusdi>

agnostico/1760003760001_DIAGN%C3%93STICO%20ACTUALIZAD
O%20MARZO_11-03-2015_16-37-03.PDF

Toalombo, M. (2011). Estudio de nisina en la vida útil de queso tipo Ricotta. Recuperado el 3 de junio del 2016, de: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/844/1/AL449%20Ref.%203343.pdf>

Universidad de Sevilla. (2013). Microbiología Clínica: Medios de cultivo. Recuperado el 2 de junio del 2016, de: <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>

Vanegas , M., González , L., Martínez , A., & Buitrago, F. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos de Bogotá. Recuperado el 19 de mayo del 2016, de: <http://www.redalyc.org/pdf/693/69311191003.pdf>

Vega, G. (2012). Elaboración y control de calidad de una bebida a base de suero de leche y avena (avena sativa), para producoop "El Salinerito". Recuperado el 15 de mayo del 2016, de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2600/1/56T00377.pdf>

Veral*, N. G., Totosaus, A., Hernandez, J. F., Soto, S., & Bolaños, E. N. (2008). Propiedades de textura de masa y pan dulce tipo "concha" fortificados con proteínas de suero de leche. Recuperado el 1 de junio del 2016, de: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612009000100011&script=sci_arttext

Villacís, M. (2011). Elaboración y evaluación nutricional de una bebida proteica para infantes a base de lactosuero y leche de soya. Recuperado el 5 de junio del 2016, de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1583/1/56T00264.pdf>

Zambrano, M. (2014). Determinación de la presencia de *Salmonella* en queso fresco comercializado en el cantón Chone provincia de Manabí entre Mayo y Julio del 2014. Recuperado el 5 de junio del 2016, de: <http://repositorio.ucsg.edu.ec:8080/handle/123456789/2592>

ANEXOS

ANEXO I

ENCUESTA REALIZADA A PRODUCTORES LÁCTEOS

<u>DATOS GENERALES</u>	
NOMBRE DE LA EMPRESA:	
NOMBRE Y APELLIDOS DEL RESPONSABLE:	
CARGO QUE DESEMPEÑA:	
UBICACIÓN DE LA EMPRESA	
PROVINCIA:	
CANTÓN:	
PARROQUIA:	
DIRECCIÓN:	
TELÉFONO:	CELULAR:
CORREO ELECTRÓNICO:	
CATEGORIZACIÓN MIPRO:	
ARTESANAL <input type="checkbox"/>	PEQUEÑA EMPRESA <input type="checkbox"/>
MICROEMPRESA <input type="checkbox"/>	MEDIANA EMPRESA <input type="checkbox"/>
OTRO <input type="checkbox"/>	GRAN EMPRESA <input type="checkbox"/>
NÚMERO DE TRABAJADORES:	
VENTAS ANUALES (USD):	

1. ¿Cuántos litros de leche procesa diariamente?

0 – 500 500 – 1000 1000 – 5000 5000 – 10000

Mayor a 10000

2. ¿Cuántos proveedores de leche tiene?

Menor a 10 11-20 21-30 31-50 Mayor a 50

3. ¿Qué parámetros utiliza para la selección de sus proveedores?

Precio Cantidad Calidad Disponibilidad Otro

4. ¿Dispone de un laboratorio de recepción de leche?

Sí No

5. ¿Qué pruebas realiza para la recepción de la leche?

Alcohol Acidez Densidad pH Reductasa

Ebullición Otro

6. ¿Qué tipo de productos elabora, en qué cantidad y con qué frecuencia?

Producto	Sí/No	Cantidad	Frecuencia
Leche pasteurizada			
Queso fresco			
Yogur			
Manjar			
Mantequilla			
Quesos maduros			
Otros			

7. Si elabora queso fresco. Describa el proceso que utiliza.

- a. _____
- b. _____
- c. _____
- d. _____
- e. _____
- f. _____
- g. _____
- h. _____

8. ¿Qué cantidad de suero de quesería obtiene y con qué frecuencia?

0 – 500 500 – 1000 1000 – 5000 5000 – 10000

Mayor a 10000

Diario Semanal Mensual

9. ¿Qué hace con el suero de quesería?

Vende Desecha Alimentación animal Otro

10. Si desecha el suero. ¿Dónde lo desecha?

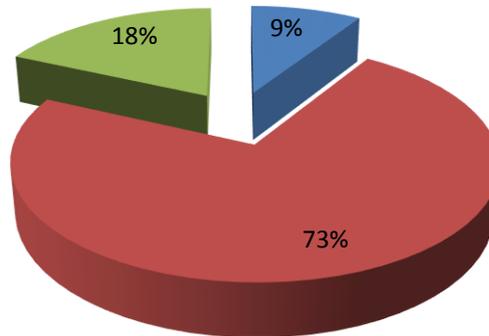
Alcantarillado Acequia Otro

ANEXO II

RESULTADOS DE LA ENCUESTA

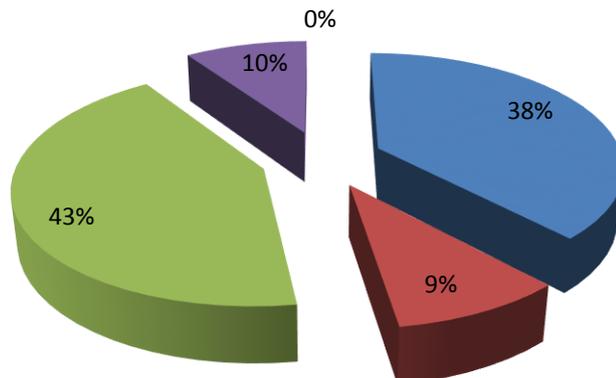
¿Cuántos litros de leche procesa diariamente?

■ 0-500 ■ 500-1000 ■ 1000-5000 ■ 5000-10000 ■ mayor a 10000



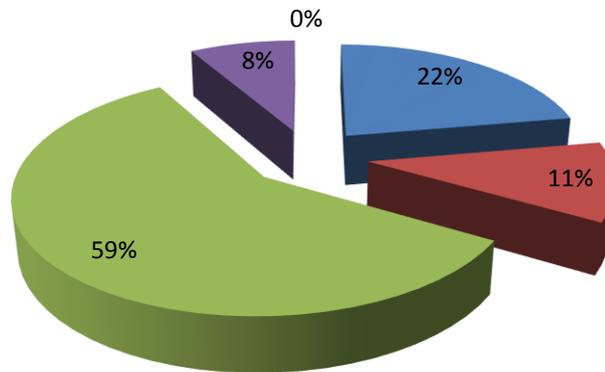
¿Cuántos proveedores de leche tiene?

■ menor a 10 ■ 11-20 ■ 21-30 ■ 31-50 ■ mayor a 50



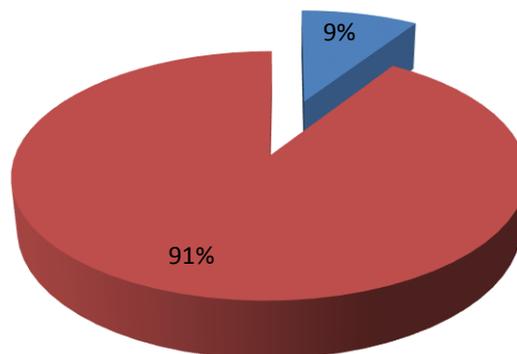
¿Qué parámetros utiliza para la selección de sus proveedores?

■ Precio ■ Cantidad ■ Calidad ■ Disponibilidad ■ Otro

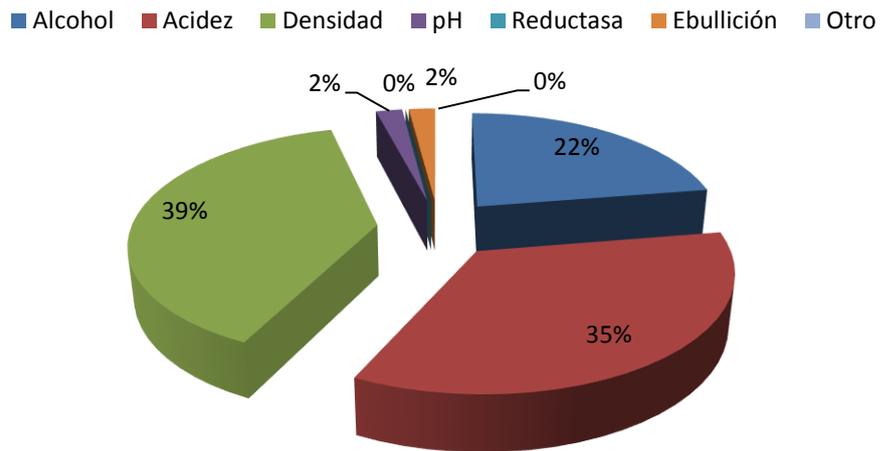


¿Dispone de un laboratorio de recepción de leche?

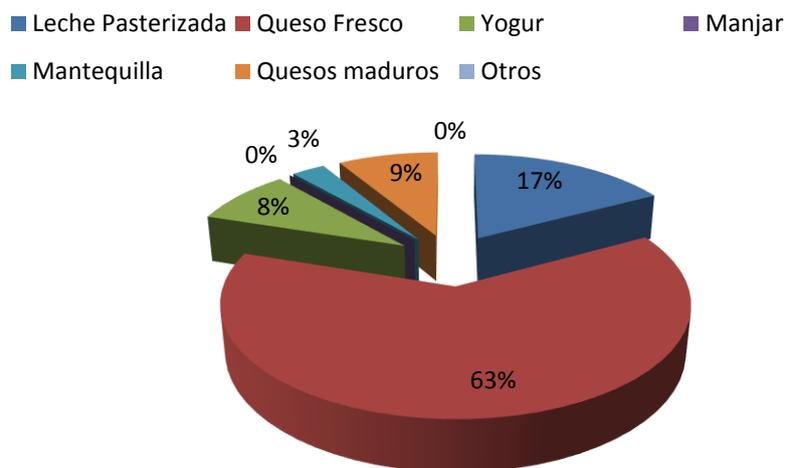
■ SI ■ NO



¿Qué pruebas realiza para la recepción de la leche?

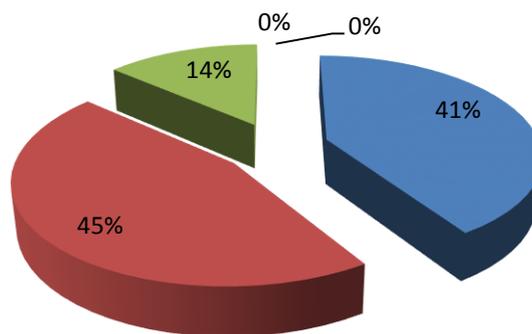


¿Qué tipo de productos elabora, en qué cantidad y con qué frecuencia?



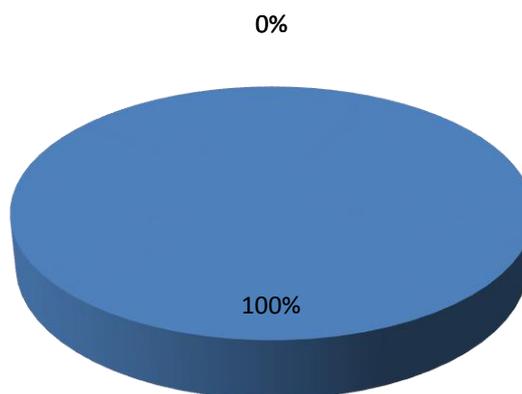
¿Qué cantidad de suero de quesería obtiene?

■ 0-500 ■ 500-1000 ■ 1000-5000 ■ 5000-10000 ■ mayor a 10000



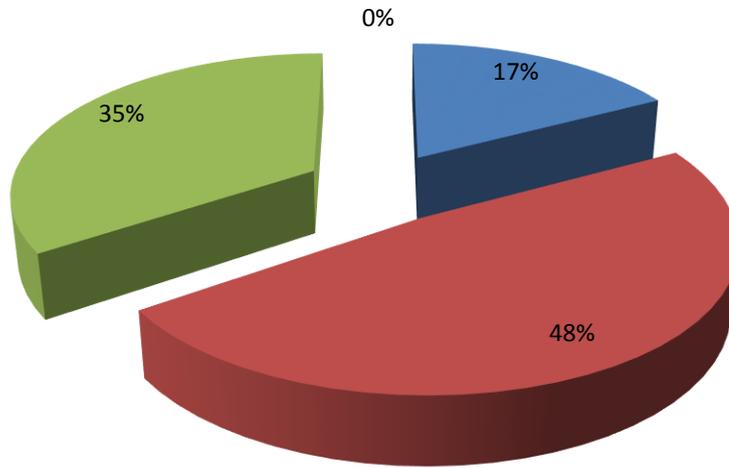
¿Con qué frecuencia obtiene suero de quesería?

■ diario ■ semanal ■ mensual



¿Qué hace con el suero de quesería?

■ Vende ■ Desecha ■ Alimentación animal ■ Otro



Si desecha el suero. ¿Dónde lo desecha?

■ Alcantarillado ■ Acequia ■ Otro

