



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



“Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes en leche cruda acopiada para el programa Vaso de Leche en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

Br. Nury Miluska Lopez Gomez

Br. Ney Kevy Marino Pérez Calderón

LAMBAYEQUE – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



“Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes en leche cruda acopiada para el programa Vaso de Leche en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

Br. Nury Miluska Lopez Gomez

Br. Ney Kevy Marino Pérez Calderón

LAMBAYEQUE – PERÚ

2019

“Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes en leche cruda acopiada para el programa Vaso de Leche en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

APROBADA POR:

**Dra. Gianina Llontop Barandiaran _____
PRESIDENTE**

**Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán _____
SECRETARIA**

**MSc. José Teodoro Reupo Periche _____
VOCAL**

**Dra. Graciela Albino Cornejo _____
PATROCINADOR**

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada con amor:

A Dios por ayudarme, guiarme y por ser quien me dio la voluntad para salir adelante. A mis padres, Teotista Gomez y Urbano Lopez, quienes han sido mi fuente de sustento e inspiración. Ellos son mi motor para seguir día a día y por los quienes, hoy gracias a su trabajo y esfuerzo puedo cumplir una de mis metas. Mamá, dedico este logro a tu amor, fortaleza, a tu valentía, a todos aquellos años de sacrificio y lucha fuera del país, por el calor maternal y protección que me hiciste sentir aun estando separadas por miles de kilómetros. Papá, dedico mi trabajo a tu esfuerzo diario, a tu alegría, tu amor y cariño, a tus conocimientos y al arte que posees en las manos, por enseñarme mi primer libro, por inculcarme el respeto y cuidado de la vida en todas sus formas. A mi hermana Lizeth y a mis sobrinos Tatiana y Daryl por el apoyo diario, alegrías, tristezas y por ser mi compañía durante todo este tiempo.

A Ney Kevy Pérez Calderón, por brindarme seguridad, amor, alegría, complicidad, confianza, amistad y por ser mi soporte durante tiempos difíciles y por todas esas metas trazadas a futuro, que con ayuda de Dios y nuestras familias lograremos satisfactoriamente.

Nury Miluska Lopez Gomez

DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este trabajo a Dios por darme la oportunidad de lograrlo. A mi abuelito Pedro León Balarezo, quien siempre dijo anhelar verme adulto y profesional cuando yo era pequeño, y que ahora me acompaña espiritualmente. A mi padre José Martín Gonzáles Vilca, por apoyarme siempre en mi formación profesional, e inculcarme la responsabilidad y dedicación al trabajo. A mis hermanos, José Adrián y María del Pilar, de quienes espero que vean en mí, motivación para lograr ser buenos profesionales. A mi tía Sonia del Carmen Román Araya, grandiosa amiga y ejemplo de mujer, que siempre me motivó y confió que lograría el objetivo de ser profesional. A mi primo Mario Alberto Bulnes León, de quien me siento muy orgulloso, considero como un hermano mayor, y a quien hoy por hoy veo como un ejemplo. A mi colega, compañera, mejor amiga y enamorada, Nury Miluska Lopez Gomez, quien increíblemente se convirtió en mi motivo ideal para superarme, y junto a ella, tenemos muchas metas trazadas a futuro para cumplir no menos objetivos de los que anhela todo buen profesional, siendo este trabajo una de las primeras metas.

Y, sobre todo, dedico este trabajo de manera especial a mi mamita, Natividad Calderón Bernilla, de quien siempre estaré eternamente agradecido por inculcarme la paciencia, perseverancia y amor en mi formación.

¡Te amo mamá! ¡Te mando un beso hasta el cielo!

Ney Kevy Marino Pérez Calderón

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Graciela Albino Cornejo, docente de Microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo por su asesoría, amistad y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Lic. Jorge Fupuy Chung, Profesor de Diseños experimentales por su humildad, amistad, y por contribuir con el manejo de datos estadísticos en los resultados del presente trabajo.

Al Lic. William David García Ramírez, encargado del laboratorio de bromatología, por su sincera amistad y por las facilidades brindadas para realizar esta investigación en la Subgerencia de Sanidad y Vigilancia Sanitaria de la Municipalidad Provincial de Chiclayo.

Al Br. Jhonatan Javier Córdova Suclupe, por su amistad y compartir su amplio conocimiento y experiencia en microbiología de alimentos.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	5
III. MATERIAL Y MÉTODOS	10
1.1. Población y Muestra	10
1.2. Metodología	10
1.2.1. Análisis Microbiológico.....	10
A. Preparación y dilución de las muestras de leche cruda	10
B. Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables en muestras de alimentos. Método de recuento estándar en placa o recuento en placa por siembra en todo el medio (ICMSF)	13
C. Numeración de bacterias coliformes. Recuento directo en placa de Agar Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta (ICMSF).....	15
D. Pruebas de identificación de organismos coliformes: IMViC (ICMSF)	17
1.3. Análisis de Datos	18
IV. RESULTADOS	20
V. DISCUSIÓN.....	28
VI. CONCLUSIONES.....	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
IX. ANEXOS.....	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables /mL de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo, comparado con la NTP 202.001:2016. Mayo – Octubre 2018.....	21
Tabla 2. Distribución y frecuencia de la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables /mL en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.....	22
Tabla 3. Resultados de la numeración de bacterias coliformes viables UFC/mL de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo, comparado con la NTP 202.001:2016. Mayo – Octubre 2018.....	23
Tabla 4. Distribución y frecuencia de la numeración de coliformes /mL en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	24
Tabla 5. Número y porcentaje de coliformes identificados en las muestras analizadas de leche cruda acopiadas para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	25
Tabla 6. Número y porcentaje de muestras, donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “no asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.....	26
Tabla 7. Número y porcentaje de muestras, donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cooler con las muestras de leche cruda.	11
Figura 2. Muestras de leche cruda tomada en los diferentes comités pertenecientes al programa “Vaso de Leche” de la ciudad de Chiclayo.	11
Figura 3. Diluciones de una muestra de leche cruda acopiada del programa “Vaso de Leche”.....	12
Figura 4. Diluciones preparadas de una muestra de leche cruda acopiada del programa “Vaso de Leche”.....	12
Figura 5. Procedimiento para la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables /mL. A. Inoculación de la alícuota de 1mL. en la placa. B. Vertido de Agar Plate Count, fundido y templado.	14
Figura 6. Procedimiento para la numeración de bacterias coliformes /mL en agar VRBA A. Inoculación de la alícuota de 1ml. en la placa. B. Vertido de agar VRBA.	16
Figura 7. Selección de 5 colonias coliformes de color rojo oscuro intenso.	19
Figura 8. Procedimiento para la identificación de microorganismos coliformes.	19
Figura 9. Representación de la numeración bacterias aerobias mesófilas viables/mL en muestras de leche cruda, acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.....	21
Figura 10. Representación de frecuencia de la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables /mL en leche cruda acopiada para el programa vaso de leche en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	22
Figura 11. Representación de la Numeración de coliformes /mL de muestras de leche cruda, acopiadas para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	23
Figura 12. Representación de la frecuencia de la numeración de coliformes /mL en leche cruda acopiada para el programa vaso de leche en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	24
Figura 13. Representación del porcentaje de bacterias coliformes, identificados de las muestras analizadas de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	25
Figura 14. Representación del porcentaje donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “no asociadas” por cada muestra de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.	26
Figura 15. Representación del porcentaje donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.....	27

ANEXOS

Anexo N° 1: Acta de inspección y toma de muestra.....	37
Anexo N° 2: Muestras recolectadas y debidamente refrigeradas.....	38
Anexo N° 3: Numeración de microorganismos mesófilos aerobios viables.....	38
Anexo N° 4: Lectura y selección de placas para la numeración de coliformes.	39
Anexo N° 5: Selección de placas correspondientes a una dilución que presenten entre 30 y 300 colonias.....	39
Anexo N° 6: Selección de placas que presentaron menos de 150 colonias característica.	40
Anexo N° 7: Pruebas bioquímicas para identificación de coliformes: IMViC (ICMSF).	40
Anexo N° 8: Laboratorio de la Subgerencia de Sanidad – MPCH.	42

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la numeración de bacterias aerobias mesófilas y coliformes en leche cruda acopiada para el “Programa Vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo, durante los meses de mayo a octubre del 2018.

El estudio se caracterizó por ser de tipo básico descriptivo, donde se analizaron 180 muestras de leche cruda, a las que se determinó la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y la numeración de coliformes, de acuerdo a los requisitos microbiológicos establecidos en la Norma Técnica Peruana NTP 202.001:2016 “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos”. Adicionalmente al estudio, se realizaron pruebas para la identificación de coliformes; todos estos métodos basados en la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF).

Se obtuvo como resultados en ambos tipos de análisis microbiológicos, promedios aritméticos de 1.58×10^6 UFC /mL para aerobios mesófilos viables, y 1.33×10^3 UFC /mL para coliformes. Las especies más frecuentemente aisladas fueron: *Enterobacter aerogenes* en 96%, *Enterobacter cloacae* en 5% y *Escherichia coli* en 39% de un total de 140 cepas aisladas en las muestras de leche cruda. Al comparar los resultados con la Norma Técnica Peruana 202.001:2016 “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos.”, se obtuvo que el 73,3% y 62,8% sobrepasaron los límites permisibles para la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes respectivamente, encontrándose leche cruda en mala calidad higiénica.

Palabras claves: aerobios mesófilos viables, coliformes, leche cruda, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the numbering of viable mesophilic aerobic bacteria and coliforms in raw milk acopied for the “Glass of Milk Program” in Chiclayo city, during the months of May to October 2018.

The study was characterized by being of a basic descriptive type, where 180 samples of raw milk were analyzed, where it was determined the numbering of viable mesophilic aerobic bacteria and coliforms, according to the microbiological requirements established by the Peruvian Technical Standard NTP 202.001:2016 “MILK AND DAIRY PRODUCTS”. Raw milk. Requirements”. In addition to the study, tests were carried out to identify coliforms; all these methods based on the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).

It is obtained as results in both types of microbiological analysis, arithmetic averages of 1.58×10^6 UFC /mL for viable mesophilic aerobic, and 1.33×10^3 UFC /mL for coliforms. The most isolated species were: *Enterobacter aerogenes* in 96%, *Enterobacter cloacae* in 5% and *Escherichia coli* in 39% of a total of 140 strains isolated from raw milk samples. When comparing the results with the Peruvian Technical Standard NTP 202.001:2016 “MILK AND DAIRY PRODUCTS”. Raw milk. Requirements”, it was obtained as a result that 73,3% and 37,2% exceeded the permissible limits for viable mesophilic aerobic and coliforms respectively, finding raw milk in poor hygienic quality.

Keywords: viable mesophilic aerobic, coliforms, raw milk, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*.

I. INTRODUCCIÓN

La leche es un producto natural agropecuario de alto valor nutritivo por estar constituida por proteínas, grasas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, lo que la hace esencial en el crecimiento y desarrollo del ser humano (Agudelo y Bedoya, 2004; Milke y Arroyo, 2013).

Desde el punto de vista legal “la leche es el producto íntegro y fresco del ordeño de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro y que cumpla con las características físicas y microbiológicas establecidas” (CODEX STAN 2 06-19991; Dirección General de Salud, 2017). Según el Codex Alimentarius, la leche cruda es aquella que no ha sido calentada a más de 40°C ni sometida a ningún tratamiento físico, químico y microbiológico, que tenga un efecto equivalente.

La leche al ser un producto rico en nutrientes, es propicia para el crecimiento de múltiples microorganismos (Cedeño *et al*, 2015; Magariños, 2000). Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) la leche cruda puede albergar microorganismos perjudiciales para la salud, la presencia de las bacterias en leche cruda no solo indica seguridad sino también calidad y aceptación del consumidor de productos lácteos (Vásquez, Loaiza y Olivera, 2017); es por este motivo que existen normas que establecen parámetros para determinar la calidad de la leche.

Los microorganismos indicadores de calidad higiénica son las bacterias aerobias mesófilas y coliformes (Brousett *et al*, 2015). Las bacterias mesófilas aerobias se relacionan con la contaminación de la materia prima y mala manipulación del sistema de leche, es decir, en conjunto indica la salubridad de la leche (Sánchez, 2013), según la Norma Técnica peruana 202.001:2016 los límites mínimos y máximos son de 5×10^5 y 1×10^6 UFC/mL respectivamente. Los microorganismos coliformes conforman una serie de bacterias de la familia enterobacteriaceae que incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, la presencia de estas bacterias es debido a una mala higiene en el ordeño y al contacto con heces (Martínez y Gómez, 2013; Moreno *et al*, 2007), según la NTP el recuento mínimo es de 100 UFC/mL y el máximo de 1000 UFC/mL.

En la actualidad, a pesar del uso de tecnologías avanzadas para el ordeño y control sanitario del ganado, en los establos de acopio no cuentan con tecnología adecuada; el

ordeño se realiza en condiciones higiénicas deficientes y por consiguiente la leche puede contaminarse fácilmente, provocando desde simples alteraciones organolépticas hasta el desarrollo de microorganismos; asimismo, la leche al ser transportada a los diferentes comités de acopio no se aplica una adecuada cadena de frío, por lo tanto, puede aumentar rápidamente el crecimiento microbiano, superando el número permisible de acuerdo a la “Norma Técnica Peruana 202.001:2016 LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos”, convirtiéndose en un alimento no apto para el consumo, por su elevado contenido microbiológico y alteración de las características organolépticas.

La Municipalidad Provincial de Chiclayo cuenta con un laboratorio de alimentos en el que se realizan distintos análisis a la leche cruda perteneciente al programa vaso de leche, sin embargo, no son lo suficientemente necesarios para determinar la calidad higiénica de la leche que se provee en ese programa. Por ello, se realizó el presente trabajo donde se determinó la numeración de bacterias aerobias mesófilas y coliformes en general.

En base a lo expuesto, se planteó el siguiente problema: ¿La numeración de bacterias mesófilas viables y coliformes cumplen con los parámetros establecidos de acuerdo a la Norma Técnica Peruana 202.001:2016 en la leche cruda acopiada para el “Programa Vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo? Siendo la hipótesis, que: La numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes en la leche cruda acopiada para el “Programa Vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo, no cumple con los parámetros establecidos de acuerdo a la Norma Técnica Peruana 202.001:2016. El objetivo principal de la presente investigación fue comparar y evaluar los resultados obtenidos en el análisis microbiológico con los límites permisibles de acuerdo a la Norma Técnica Peruana 202.001:2016, mientras que los objetivos específicos fueron determinar el número promedio de las muestras analizadas para la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y la numeración de coliformes, asimismo identificar las especies de bacterias coliformes más frecuentemente aisladas de las muestras analizadas.

II. ANTECEDENTES

Obregón *et al*, 2017, realizaron la evaluación microbiológica en 40 muestras de leche cruda, provenientes de cuatro establos que realizan venta al público del distrito de Puente Piedra, Lima. El análisis microbiológico fue realizado en los parámetros de determinación de aerobios mesófilos, obteniendo como resultado una concentración media 43×10^7 UFC/mL, oscilando entre la máxima de 3×10^9 UFC/mL y la mínima de 2×10^5 UFC/mL. El 95 % de las muestras de leche cruda supero el límite establecido para aerobios mesófilos según el Reglamento de Leche y Productos Lácteos.

Fora, 2015, evaluó la calidad microbiológica de la leche cruda del ganado vacuno del distrito de Sama Inclán de Tacna durante los meses de febrero a mayo del 2015. Analizó 150 muestras tomadas de los recipientes (porongos) donde los proveedores almacenaban la leche. En el recuento de aerobios mesófilos viables y coliformes totales mediante la utilización de placas Petrifilm, obteniendo un promedio de $20,6 \times 10^5$ UFC/mL y $10,4 \times 10^4$ UFC/mL respectivamente, concluyendo que un 80% de muestras no cumplen con los parámetros de calidad microbiológicos.

Cedeño *et al*, 2015, investigaron los factores que afectan la calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda comercializada en la parroquia Calceta del cantón Bolívar, Ecuador. Obtuvieron como resultados en el Recuento en placa de aerobios mesófilos $1,67 \times 10^6$ UFC/mL en el mercado municipal sobrepasando el límite permitido según la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE-INEM 9 – 2012) y $1,26 \times 10^6$ UFC/ml en las tiendas; recuentos de coliformes totales $7,78 \times 10^4$ UFC/mL (mercado municipal), $2,39 \times 10^4$ UFC/mL (tiendas) ambos resultados sobrepasando los límites permitidos. Concluyendo que la ausencia de higiene tanto en las personas, como en los utensilios y la inadecuada operación durante el ordeño, manejo y comercialización, afectan la calidad higiénica sanitaria de la leche cruda.

Brousett *et al*, 2015, determinaron la calidad microbiológica de leche cruda en 8 cuencas en la región Puno, durante los meses de agosto a septiembre. Las muestras de leche fueron tomadas una vez concluido el ordeño de la mañana, a partir de los recipientes de almacenamiento, la temperatura de la leche varió entre 20 a 22 °C, luego fueron transportadas a 4 °C. El análisis microbiológico se realizó mediante el recuento en placa para bacterias mesófilas aerobias. El aislamiento de *Escherichia coli* se realizó

inoculando la muestra en agar Mackonkey. Obtuvieron como resultados que 2 cuencas no cumplían con los valores establecidos según la Norma Técnica peruana (NTP) con recuentos de $2,15 \times 10^7$ y $1,43 \times 10^7$ UFC/mL para bacterias mesófilas aerobias; por otro lado, en la determinación de *E. coli*, ninguna de las cuencas cumplía con los parámetros, encontrándose una leche de baja calidad higiénica.

Abad, 2015, realizó un estudio microbiológico de leche cruda de 7 puestos de venta en Ecuador. Cuantificó los microorganismos en agar Farrell y se aislaron un total de 33 cepas en Agar Mueller Hinton. Para la identificación de género y especie se utilizaron sistemas múltiples de Analytical Profile Index (API). Las bacterias que encontraron fueron: 27,27% género *Bacillus*, 17,39% de *Brucella spp.* y *Aeromonas hidrófila*, 13,04% de *Enterobacter sakazakii* y 4,35% de *Serratia plymuthica*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus warneri*.

Buñay *et al*, 2015, realizaron el recuento de bacterias mesófilas aerobias de 168 muestras de leche cruda que ingresa a industrias Lacto Ochoa - Fernández en la ciudad de Cuenca, Ecuador. El propósito del trabajo fue determinar la carga microbiana de aerobios mesófilos en leche cruda, mediante la inoculación en placas Petrifilm y el Tiempo de Reducción del Azul de metileno (TRAM). Obteniendo como resultados que el 51,2 % del total, superaba el límite máximo permitido de carga microbiana para aerobios mesófilos y que el Tiempo de Reducción del Azul de metileno (TRAM) indica que el 67,9 % no cumplen con el criterio de buena calidad.

Elcorrobarrutia *et al*, 2014, determinaron la calidad sanitaria de leche cruda comercializada en la ciudad de Huacho. Utilizaron 13 muestras en los análisis sensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos. Respecto a los análisis microbiológicos se evaluó los ensayos de recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables con una media de $3,214 \times 10^3$ UFC/mL; numeración de coliformes con una media de $2,93 \times 10^2$ UFC/mL. Concluyendo que todas las muestras fueron conformes con los requisitos microbiológicos de numeración de microorganismo mesófilos, aerobios y facultativos viables y coliformes.

Castillo, 2014, analizó 24 muestras de leche cruda recolectas de lugares de expendio y de ganaderías en la ciudad de Iquitos. Determinó de la carga microbiana mediante la técnica de recuento estándar en placa para bacterias aerobias mesófilas; por otro lado, se

realizó la técnica del número más probable (NMP) para coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*. Obtuvieron como resultados según la carga microbiana, que el 75% de muestras no fueron aptas, ya que sobrepasaron los límites permisibles; del 75 % de muestras no aptas, el 58,3% corresponde a aerobios mesófilos y el 75% a coliformes totales. Encontrándose también coliformes fecales en el 100% de muestras y *E. coli* en el 66,7%. Concluyendo que las muestras de leche cruda no son aptas para el consumo humano.

Cohaila, 2013, analizó 64 muestras de leche cruda en la ciudad de Tacna, evaluando el número de bacterias aerobias mesófilas viables, coliformes totales y *Escherichia coli*. Obtuvo como resultado que el 92% y el 97% de las muestras sobrepasaban los valores según INDECOPI para aerobios mesófilos viables y coliformes totales respectivamente. Asimismo, hubo presencia de *Escherichia coli* en el 100% de las muestras.

Sánchez, 2013, analizó 1632 muestras de leche provenientes de los establos proveedores de la empresa Gloria S.A que poseían tanques de enfriamiento, en las zonas de Trujillo, Paiján y Virú. En la investigación se realizaron ensayos de recuento de bacterias mesófilas aerobias mediante la inoculación en placas Petrifilm, obteniendo la media aritmética de $2,79 \times 10^2$ UFC/mL y la media geométrica $1,42 \times 10^2$ UFC/mL, los valores obtenidos cumplían con la Norma Técnica Peruana (NTP) 202.001-2010.

Loyola *et al*, 2013, determinaron el número de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes totales de 60 muestras de leche cruda, 30 de ellas provenientes de los Comités del Programa social Vaso de leche, y 30 recolectadas al ordeño de productores que abastecían a dicho programa. Obteniendo en el caso del número de Aerobios mesófilos viables para ambos lugares de muestreo, que sus promedios fueron mayores al máximo permitido según la Norma Técnica Peruana. En el caso de Coliformes totales el 83,33 % de muestras provenientes del Programa Vaso de Leche y el 86,67 % obtenida de los productores, mostraron resultados > 1100 UFC/mL los cuales no cumplían con los parámetros establecidos. Concluyendo que la leche distribuida en el programa social no cumplía con las características establecidas según la NTP, y por consecuencia dicho programa se debió replantear.

Luigi *et al*, 2013, determinaron la calidad higiénica sanitaria de leche cruda y pasteurizada en zonas de Carabobo en Venezuela. Analizando 40 muestras de leche cruda extraídas del ordeño matutino y 100 de leche pasteurizada. En la leche cruda, el recuento

en placa de bacterias aerobias mesófilas, el 72,5 % de las muestras no fueron aptas para el consumo humano según las normativas de calidad venezolana, lo que indicó contaminación bacteriana en el proceso de ordeño, manipulación y almacenamiento de la leche cruda.

Figuerola, 2012, evaluó la calidad higiénica de 80 muestras de leche cruda comercializada en los puestos ambulatorios del distrito de Tacna durante los meses de marzo a julio del 2012. El objetivo fue determinar la carga microbiana de la leche mediante el recuento de bacterias aerobias mesófilas y el recuento de bacterias coliformes totales; obteniendo como resultados que el 12,50 % de las muestras, presentaron valores que sobrepasaron el rango permitido, fluctuando estos valores entre 10×10^5 a 20×10^5 UFC/mL y el 91,25 % de las muestras analizadas para coliformes totales, presentaron valores que sobrepasaron el rango permitido entre 20×10^3 a 29×10^4 UFC/mL. Por lo que concluyeron que la leche expendida en puestos ambulatorios poseía una calidad higiénica deficiente.

Bonzano, 2012 analizó 240 muestras en 3 establos de estratificación con diferentes grupos tecnológicos (alta, medio, baja). El método utilizado para la determinación de mesófilos aerobios y coliformes fue mediante inoculación en Placas Petrifilm. Los resultados obtenidos fueron: el promedio para bacterias mesófilas aerobias de 277×10^3 UFC/mL para establos con alta tecnología, 204×10^3 UFC/mL y $1,78 \times 10^6$ UFC/mL para establos con media y baja tecnología respectivamente, siendo los dos primeros los que cumplían con las normas vigentes establecidas; para coliformes totales el promedio fue de $1,45 \times 10^3$ UFC/mL, $4,3 \times 10^3$ UFC/mL y 49×10^3 UFC/mL para establos con alta, media y baja tecnología respectivamente, en este caso ninguno de los tres establos cumplían con las normas. En el recuento de *E. coli* se obtuvo $1,2 \times 10^2$ UFC/mL para baja tecnología, $1,28 \times 10^2$ para mediana tecnología y $9,6 \times 10$ UFC/mL para alta tecnología.

Pinzón, 2006, analizó 30 muestras de leche cruda para determinar el índice de bacterias aerobias mesófilas, obteniendo como resultados que 70% de las muestras cumplían con la Norma Técnica Colombiana (7×10^5 UFC/mL) mientras que el 30% no la cumplían.

Incio *et al*, 2003, determinaron la calidad Microbiológica de leche fresca a nivel de establos proveedores del Programa Vaso de leche de la ciudad de Chiclayo, con un total de 60 muestras de leche fresca analizadas. En la determinación del número total de

bacterias, el promedio fue de $2,44 \times 10^7$ UFC/mL. En el recuento de coliformes totales el 48% fueron calificadas como aptas y el 52% como inaptas para el consumo humano. Concluyendo que la calidad microbiológica de leche fresca a nivel de establos proveedores del vaso de leche del distrito de Chiclayo, es deficiente.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en laboratorio de alimentos de la Subgerencia de Sanidad y Vigilancia Sanitaria de la Municipalidad Provincial de Chiclayo durante los meses de Agosto a Noviembre del 2018.

1.1. Población y Muestra

La población u objeto de estudio estuvo constituida por las muestras de leche cruda que fueron tomadas de los diferentes comités pertenecientes al programa “Vaso de Leche” en la ciudad de Chiclayo.

Se tomaron 180 muestras de leche cruda, perteneciente al programa “Vaso de Leche” las cuales fueron recolectados en frascos de vidrio debidamente esterilizados en un volumen de 250 mL, y transportados en cadena de frío a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ al laboratorio de alimentos de la Subgerencia de Sanidad y Vigilancia Sanitaria de la Municipalidad Provincial de Chiclayo para el respectivo análisis. (Figuras 1, 2)

1.2. Metodología

1.2.1. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó siguiendo el protocolo según la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF).

A. Preparación y dilución de las muestras de leche cruda

El análisis de las muestras se realizó lo más pronto posible después de la llegada al laboratorio, por lo contrario, se refrigeraron a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ si es que no pudo ser estudiada inmediatamente.

Se agregó 50 mL de leche cruda a un frasco de vidrio estéril y vacío, luego se adicionó 450 mL de agua peptonada, de este modo obtuvimos la dilución 10^{-1} . Se homogeneizó la mezcla y se procedió a realizar las diluciones.

Medimos 1mL de la dilución 10^{-1} evitando la formación de espuma y pasamos a uno de los blancos de dilución conteniendo 9 mL de agua peptonada. Agitamos la dilución y las siguientes enérgicamente 25 veces en un arco de 30 cm con ayuda de un agitador de tipo vórtex. Repetimos esta operación utilizando las diluciones progresivamente más elevadas para preparar las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . (Figuras 3, 4)



Figura 1. Cooler con las muestras de leche cruda.



Figura 2. Muestras de leche cruda tomada en los diferentes comités pertenecientes al programa “Vaso de Leche” de la ciudad de Chiclayo.



Figura 3. Diluciones de una muestra de leche cruda acopiada del programa “Vaso de Leche”.



Figura 4. Diluciones preparadas de una muestra de leche cruda acopiada del programa “Vaso de Leche”.

B. Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables en muestras de alimentos.
Método de recuento estándar en placa o recuento en placa por siembra en todo el medio (ICMSF)

Una vez preparadas las diluciones, se pipeteó por duplicado en placas Petri, alícuotas de 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y una alícuota de 0,1 mL de la dilución 10^{-5} , lo que supuso la siembra por placa de 10^{-1} a 10^{-6} gramos de alimento.

Se fundió el agar para recuento en placa y se mantuvo en baño maría a una temperatura de $44^{\circ}\text{C} \pm 2$, y se controló cuidadosamente su temperatura para que al ser mezclado con la dilución del alimento no sean inactivados los microorganismos. Luego vertimos inmediatamente en las placas Petri 10 mL – 15 mL del medio fundido y templado. El periodo de tiempo transcurrido entre la realización de las diluciones y el vertido del medio no superó los 20 minutos.

Después, se mezcló el inóculo con el medio fundido, inclinando y girando las placas de la siguiente manera: se imprimió a la placa movimientos de vaivén 5 veces en una dirección, luego se hizo girar 5 veces en sentido de las agujas del reloj, después se volvió a realizar movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y finalmente se giró 5 veces en sentido contrario a las agujas del reloj.

Con el fin de controlar la esterilidad se preparó una placa del medio y el diluyente sin inocular. Una vez que solidificado el agar, se invirtieron las placas para posteriormente incubarlas a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

Se eligieron dos placas correspondientes a una dilución que presenten entre 30 y 300 colonias, para realizar este recuento se utilizó un contador de colonias y se procedió a dar el valor obtenido como el recuento estándar en placa.

El valor obtenido como recuento estándar en placa en UFC /mL, fue igual a la media aritmética de dos valores por el factor de dilución. (Figura 5)

A.



B.



Figura 5. Procedimiento para la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables /mL. A. Inoculación de la alícuota de 1mL. en la placa. B. Vertido de Agar Plate Count, fundido y templado.

C. Numeración de bacterias coliformes. Recuento directo en placa de Agar Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta (ICMSF)

Se agregó 1 mL de cada dilución del homogeneizado en placas Petri estériles. Luego se añadió a cada placa Petri conteniendo el inóculo 10–15 mL de agar bilis rojo neutro cristal violeta (VRBA), a una temperatura de 45 ± 1 °C.

Se mezcló el contenido de las placas con movimientos de balanceo y rotación. Se dejó solidificar la mezcla (5-10 minutos) sobre una superficie nivelada. A continuación, se añadió otros 3-4 mL de medio fundido, de tal modo que se formó una capa que cubrió la superficie del medio solidificado, evitando así la formación de colonias superficiales.

Se incubaron las placas invertidas a 36 ± 1 °C durante 24 horas. Se consideraron únicamente como pertenecientes a bacterias coliformes las colonias de un color rojo oscuro, cuyo tamaño, medido en las placas no presentaron un número excesivo de colonias, sea superior a 0,5 mm de diámetro. Para contar las colonias, se eligió, siempre que sea posible, únicamente aquellas placas que presentaron menos de 150 colonias característica.

Se calcularon el número de organismos coliformes por gramo de muestra, multiplicando el número de colonias por la dilución correspondiente. (Figura 6)

A.



B.



Figura 6. Procedimiento para la numeración de bacterias coliformes /mL en agar VRBA A. Inoculación de la alícuota de 1ml. en la placa. B. Vertido de agar VRBA.

D. Pruebas de identificación de organismos coliformes: IMViC (ICMSF)

Se tomaron al azar 5 colonias de un color rojo oscuro, característico de colonias enterobacterias, cuyo tamaño, medido en las placas no presentaron un número excesivo de colonias, sin ser superior a 0,5 mm de diámetro, donde cada una de ellas fueron sometidas a las pruebas respectivas de identificación. (Figuras 7, 8).

- **Técnica para a prueba del indol (Kovacs, 1928)**

Se inocularon utilizando un asa de platino en agua de peptona a partir de cultivos puros y se incubaron los tubos sembrados a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Se añadió a cada tubo 0,2 – 0,3 mL del reactivo para el indol y posteriormente se agitó.

Se dejó reposar durante unos 10 minutos y se observó los resultados. Si apareció un color rojo oscuro en la superficie de la capa de alcohol amílico, la prueba fue positiva.

- **Técnica para la prueba del rojo de metilo (Ljutov, 1961)**

Se inocularon tubos de caldo glucosa tamponado a partir de cultivos puros e incubaron los tubos sembrados a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

Luego se pipeteo 5 mL de cada cultivo en tubos vacíos, y se añadió a cada tubo 5 gotas de la solución de rojo de metilo. Posteriormente se agitó.

Se anotó como positivo al aparecer un color rojo bien definido y como negativo si el color era amarillo.

- **Técnica para la prueba de Voges - Proskauer (Ljutov, 1963; Levine, 1916)**

Se inocularon tubos de caldo glucosa tamponado a partir de cultivos puros y se incubaron a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Se pipeteo 1mL de cada cultivo en tubos vacíos y se añadió a cada uno de ellos 0,6 mL de la solución naftol y 0,2 mL de la solución hidróxido de potásico.

Se agitaron los tubos y se dejaron en reposo durante 24 horas. Observamos los resultados.

La aparición en la mezcla de un color rosa a carmesí se anotó como prueba positiva.

- **Técnica para la prueba del citrato sódico (Simmons, 1926)**

Se inoculó en tubos de calco citrato de Simmons a partir de cultivos puros. Se utilizó para ello un asa en punta con la finalidad de sembrar un inóculo pequeño, ya que de otro modo la transferencia de nutrientes con el inóculo podría invalidar la reacción. Se sembró por picadura en la columna de agar y por estría en la superficie inclinada y se incubó a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Se anotaron como positivo si el crecimiento fue visible y negativa cuando no lo fue. El crecimiento se manifestó, generalmente por el cambio del color verde claro del medio al azul.

1.3. Análisis de Datos

Los datos fueron registrados y analizados en una hoja de cálculo como base de datos en el programa Microsoft Excel 2016. Se realizó un análisis descriptivo de las variables presentadas como frecuencias y porcentajes.

En el análisis se realizó la comparación de la Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL y Numeración de coliformes UFC/mL con la Norma Técnica Peruana NTP 202.001:2016 “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos”, desarrollando así mismo la Prueba T de Student.



Figura 7. Selección de 5 colonias coliformes de color rojo oscuro intenso.



Figura 8. Procedimiento para la identificación de microorganismos coliformes.

IV. RESULTADOS

A. Determinación de la Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL (ICMSF)

En las muestras de leche cruda acopiadas para el programa “Vaso de Leche”, se realizó la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC /mL, comparando los resultados con la Norma Técnica Peruana NTP 202.001:2016 “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos.”, obtuvimos que el 73,3% (132 muestras) superaban el límite permisible, y que el 26,7% (48 muestras) no superaban el límite permisible de acuerdo a la norma, además se obtuvo un número promedio de 1.58×10^6 UFC /mL (Tabla 1 y Figura 9). Asimismo, con los resultados obtenidos, se realizó la distribución de las 180 (100%) muestras de leche cruda en una tabla de frecuencias, obteniendo que 2,8% (5 muestras) estuvieron en un rango de $10^4 - 10^5$ UFC /mL, 23,9% (43 muestras) en un rango de $10^5 - 10^6$ UFC /mL y 73,3% (132 muestras) en un rango $> 10^6$ UFC /mL. (Tabla 2 y Figura 10)

B. Numeración de bacterias coliformes UFC/mL. Recuento directo en placa de Agar Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta (ICMSF)

Para la numeración de bacterias coliformes se obtuvo que, los resultados al ser comparados con la Norma Técnica Peruana 202.001:2016 “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos”, para la numeración de bacterias coliformes UFC/mL, obteniendo que el 62,8% (113 muestras) superaban el límite permisible, y que 37,2% (67 muestras) no superaban el límite de acuerdo a la norma, además se obtuvo un número promedio de $1,33 \times 10^3$ UFC /mL (Tabla 3 y Figura 11). También se realizó la distribución de los resultados en una tabla de frecuencias observando que, el 1,7% (3 muestras) estuvieron en el rango de $7 \times 10^2 - 8 \times 10^2$ UFC /mL, 14,4% (26 muestras) en $8 \times 10^2 - 9 \times 10^2$ UFC /mL, 15% (27 muestras) en $9 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ UFC /mL y 62,8% (113 muestras) mayor de 1×10^3 UFC /mL. (Tabla 4 y Figura 12)

C. Identificación de bacterias coliformes: IMViC (ICMSF)

Se realizó la identificación de 140 cepas de bacterias coliformes, siendo las más frecuentes: *Enterobacter aerogenes* en 96%, *Enterobacter cloacae* en 5% y *Escherichia coli* en 39% (Tabla 5 y Figura 13). Asimismo, se identificaron bacterias coliformes “no asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda. (Tabla 6 y Figura 14) y, se identificaron bacterias coliformes “asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda. (Tabla 7 y Figura 15)

Tabla 1

Resultados de la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo, comparado con la NTP 202.001:2016. Mayo – Octubre 2018

Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL	Norma técnica peruana 202.001:2016	Número de muestras	Porcentaje (%)	Calidad de leche
> 1 000 000 Promedio $1,58 \times 10^6$ UFC/ mL		132	73.3	SUPERIOR AL LÍMITE
	Max 1 000 000 UFC/ mL			
< 1 000 000 Promedio $9,8 \times 10^5$ UFC/ mL		48	26.7	MENOR AL LÍMITE

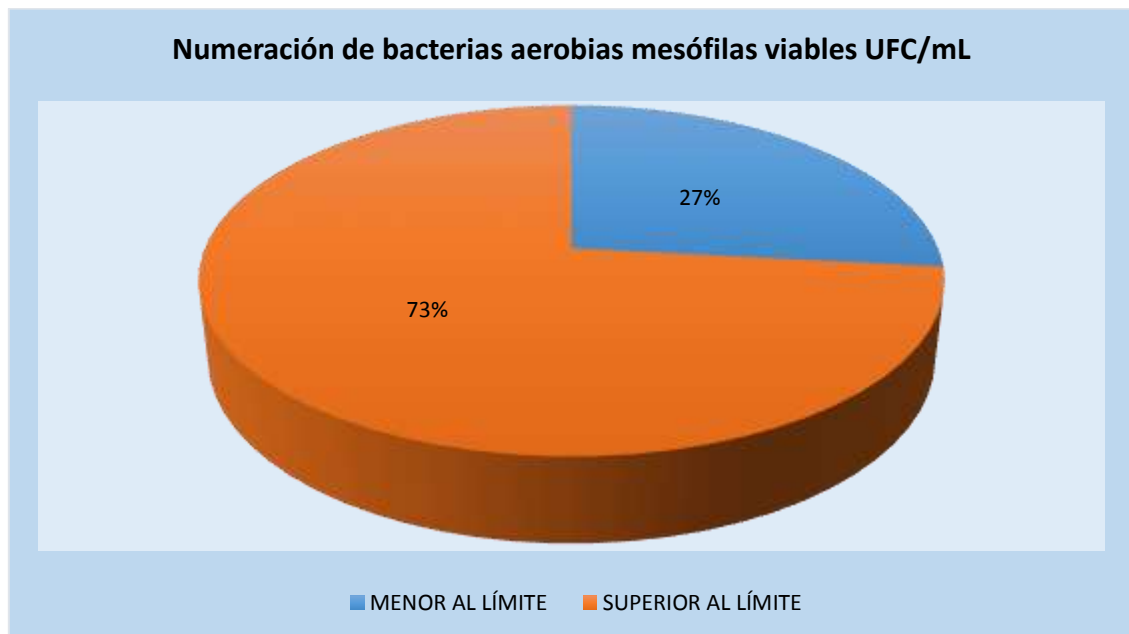


Figura 9. Representación de la numeración bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL en muestras de leche cruda, acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Tabla 2

Distribución y frecuencia de la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL	Muestras	
	Número	Porcentajes (%)
$10^3 - 10^4$	0	0
$10^4 - 10^5$	5	2.8
$10^5 - 10^6$	43	23.9
$> 10^6$	132	73.3
Total	180	100

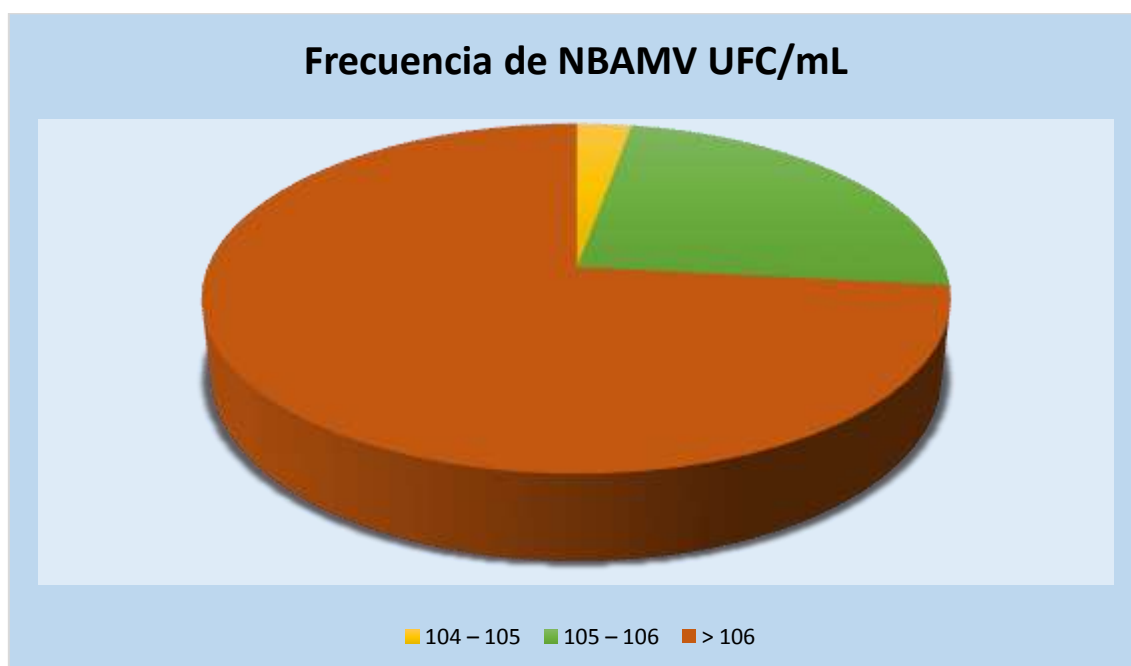


Figura 10. Representación de frecuencia de la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables UFC/mL en leche cruda acopiada para el programa vaso de leche en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Tabla 3

Resultados de la numeración de bacterias coliformes viables UFC/mL de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo, comparado con la NTP 202.001:2016. Mayo – Octubre 2018

Numeración de coliformes UFC/mL	Norma técnica peruana 202.001:2016	Número de muestras	Porcentaje (%)	Calidad de leche
>1 000 Promedio $1,33 \times 10^3$ UFC /mL	Max 1 000 UFC/ ml	113	62.8	SUPERIOR AL LÍMITE
<1000 Promedio $9,3 \times 10^2$ UFC /mL		67	37.2	MENOR AL LÍMITE

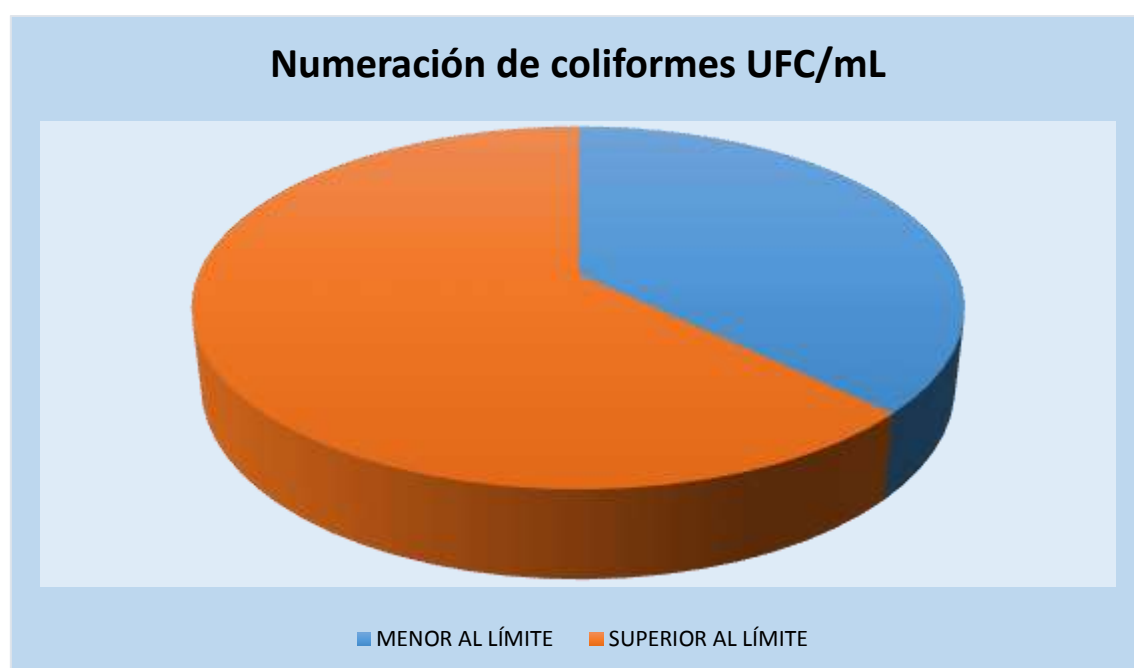


Figura 11. Representación de la Numeración de coliformes UFC/mL de muestras de leche cruda, acopiadas para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Tabla 4

Distribución y frecuencia de la numeración de coliformes UFC/mL en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Numeración de bacterias Coliformes UFC/ml.	Muestras	
	Número	Porcentajes (%)
$6 \times 10^2 - 7 \times 10^2$	3	1.7
$7 \times 10^2 - 8 \times 10^2$	11	6.1
$8 \times 10^2 - 9 \times 10^2$	26	14.4
$9 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	27	15
$> 1 \times 10^3$	113	62.8
Total	180	100

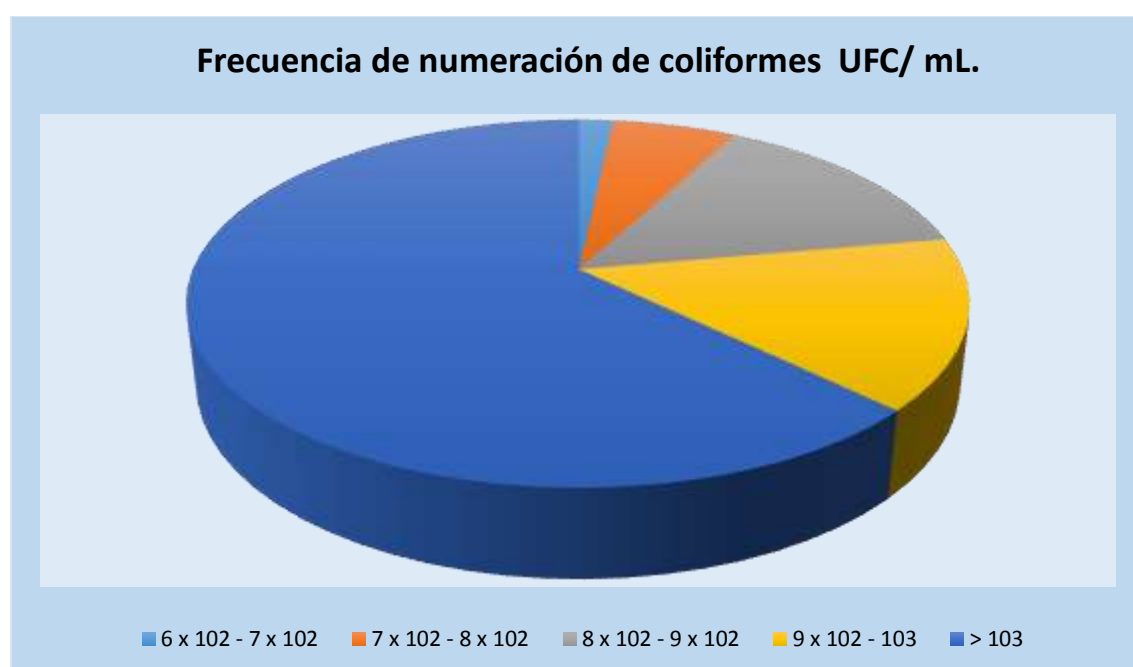


Figura 12. Representación de la frecuencia de la numeración de coliformes UFC /mL en leche cruda acopiada para el programa vaso de leche en leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Tabla 5

Número y porcentaje de coliformes identificados en las muestras analizadas de leche cruda acopiadas para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

COLIFORMES	CEPAS AISLADAS	
	Número de cepas	Porcentaje (%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	96	68.6
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	3.6
<i>Escherichia coli</i>	39	27.8
Total	140	100

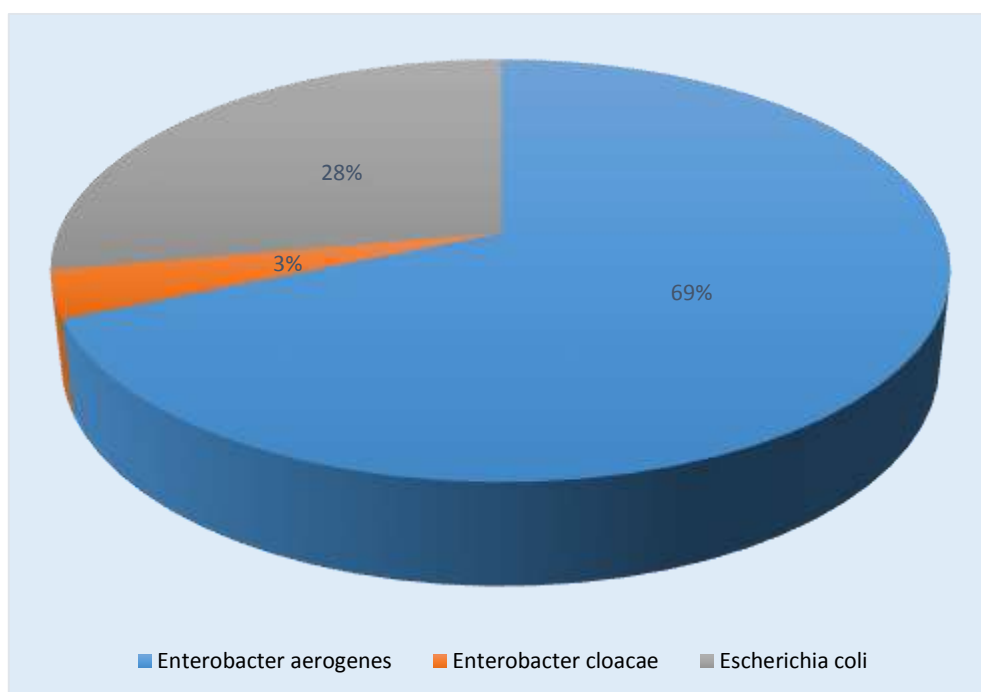


Figura 13. Representación del porcentaje de bacterias coliformes, identificados de las muestras analizadas de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018.

Tabla 6

Número y porcentaje de muestras, donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “no asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

COLIFORMES	MUESTRAS	
	Número de muestras	Porcentaje (%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	69	83.1
<i>Escherichia coli</i>	12	14.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2.4
Total	83	100

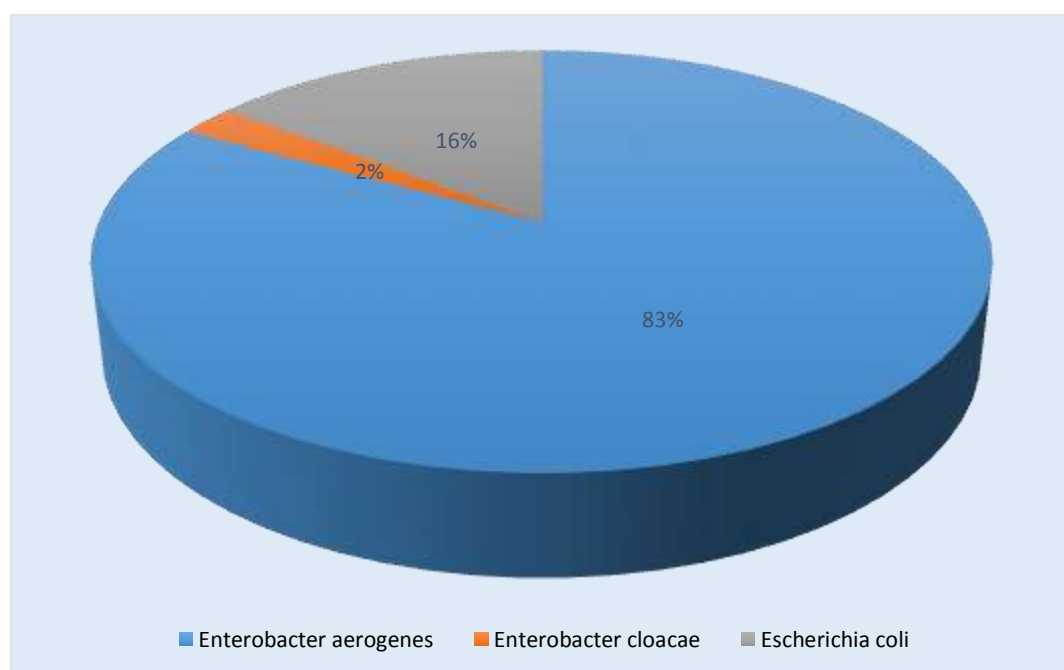


Figura 14. Representación del porcentaje donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “no asociadas” por cada muestra de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

Tabla 7

Número y porcentaje de muestras, donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

COLIFORMES	MUESTRAS	
	Número de muestras	Porcentaje (%)
<i>Enterobacter aerogenes</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	1	3.6
<i>Enterobacter aerogenes</i> + <i>Escherichia coli</i>	25	89.2
<i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	3.6
<i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3.6
Total	28	100

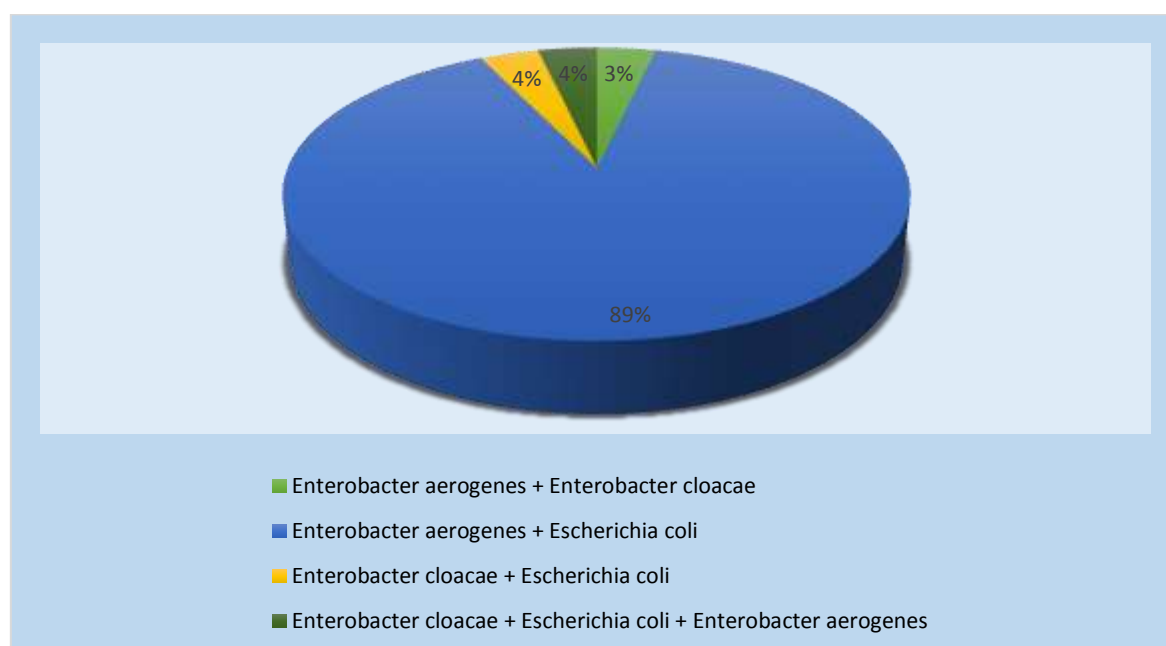


Figura 15. Representación del porcentaje donde se encontraron e identificaron bacterias coliformes “asociadas” por cada muestra analizada de leche cruda acopiada para el “Programa vaso de Leche” en el distrito de Chiclayo. Mayo – Octubre 2018

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó el número de bacterias aerobias mesófilas viables, recuento e identificación de coliformes en leche cruda acopiada para el programa vaso de leche en la ciudad de Chiclayo. Los resultados obtenidos fueron comparados según el actual reglamento de leche y productos lácteos (NTP 202.001:2016) el cual establece el límite máximo permisible de 1×10^6 UFC/mL para bacterias aerobias mesófilas viables y 1×10^3 UFC/mL para coliformes.

El 73.3% de muestras de leche cruda analizadas en este trabajo, sobrepasaban los parámetros permisibles establecidos por la norma en la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables. Según reportes internacionales acerca de leche cruda con elevados resultados en la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables, Buñay *et al* (2015) y Luigi *et al* (2013) indicaron que el 51,2 % y el 72,5 % de muestras analizadas respectivamente, no cumplían con la norma técnica establecida en su país. Dentro de los reportes nacionales, Castillo (2014) obtuvo que el 58,3 % de las muestras de leche cruda analizadas a partir de establos y lugares de expendio superaban el límite permisible, de las cuales los recuentos más altos pertenecían a los lugares de expendio. Determinó la relación tiempo y temperatura de almacenamiento sobre el crecimiento de los microorganismos, evidenciando una deficiencia en la refrigeración post ordeño, en el transporte y almacenamiento de la leche.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de Cohaila (2013), quien reportó que el 95% de muestras superaban los parámetros establecidos de acuerdo a la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables. La diferencia entre ambos estudios es debido a que el autor citado, analizó muestras procedentes de expendios y no de establos, lo que estuvo sujeto a muchos factores que condicionaban sus resultados como la higiene de los expendedores, limpieza del lugar y factores externos asociados a la venta del producto como el tránsito de personas, vehículos, animales, etc.

Distintos factores han influido para obtener en este trabajo recuentos sobre aerobios mesófilos superiores a 10^6 UFC/mL, los cuales son similares a los resultados obtenidos por Obregón *et al* (2017) registrando que el 95% de muestras poseían recuentos de 43×10^7 UFC/mL, de igual manera que Fora (2015), Brousett *et al*, (2015) y Figueroa (2012) con recuentos de 2×10^6 ; $2,15 \times 10^7$ y 2×10^6 UFC/mL respectivamente, todas estas

superando el límite máximo permisible. Los autores mencionados, relacionaron los conteos elevados de bacterias aerobias mesófilas con el inadecuado manejo durante la recolección y recepción de la leche, debido a la mala higiene por la falta de capacitación en buenas prácticas de ordeño; deficiente limpieza de utensilios y equipos, estado de salud del ganado, deficiente calidad del agua con la que se higienizan los utensilios y un inadecuado transporte del producto.

Para determinar el número de bacterias que contaminan la leche se realizó el recuento estándar en placa el cual indicó el grado de contaminación general de la leche, pero sin definir específicamente su origen, pudiendo así numerar las bacterias que pueden crecer de 0 a 35°C, provenientes de diferentes puntos de contaminación ya sea de los pezones de las vacas, de los utensilios y equipos, de las heces, manos de los ordeñadores, etc (Incio *et al*, 2003). Según Bonzano (2012) el recuento de microorganismo aerobios mesófilos determina la calidad, más no cumple la función diagnóstica de orientar sobre el origen de la contaminación.

Los recuentos elevados en la NAMV según Bonzano (2012) tienen relación con el nivel de tecnología del establo ya que en su estudio obtuvo promedio de bacterias aerobias mesófilas de $1,78 \times 10^6$ UFC/mL para establos con media y baja tecnología siendo estos los que no cumplían los parámetros establecidos debido a los factores ya mencionados anteriormente. Esto es corroborado por Sánchez (2013) el cual analizó muestras provenientes de los establos proveedores de la empresa Gloria S.A, los cuales estaban implementados correctamente, es por esto que los valores obtenidos para la NAMV cumplían con la NTP.

En nuestra región Incio *et al* (2003) reportó que 40% de las muestras provenientes del programa vaso de leche no se encontraban aptas para el consumo, dando a conocer que la calidad higiénica de la leche fresca a nivel de establos proveedores del programa social es deficiente.

Los resultados obtenidos en la Numeración de bacterias coliformes /mL en 180 muestras de leche cruda, las cuales fueron acopiadas para el programa vaso de leche en la ciudad de Chiclayo, mostraron que el 62,8% de las muestras analizadas no cumplían con los parámetros establecidos según la Norma Técnica Peruana NTP 202.001:2016 “Leche y Productos Lácteos”, clasificándose como no aptas para el consumo humano. Fora (2015), evaluó la calidad microbiológica de 150 muestras de leche cruda en el

distrito de Sama Inclán – Tacna, donde obtuvo como resultados, utilizando placas Petrifilm, un promedio de $10,4 \times 10^4$ UFC/mL para coliformes, donde un total de 80% de las muestras no cumplían con los parámetros de calidad microbiológicos. Asimismo, en los trabajos con respecto al análisis microbiológico de coliformes totales en leche cruda, realizados por Castillo (2014), Cohaila (2013) y Figueroa (2012), obtuvieron como resultados que el 75%, 97% y 91,25% respectivamente, fueron consideradas como no aptas para el consumo humano, detectándose leche cruda de mala calidad higiénica.

Cedeño *et al* (2015), investigaron los factores que afectan la calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda comercializada en la parroquia Calceta del cantón Bolívar – Ecuador, realizando el análisis correspondiente de Recuento de coliformes totales en el mercado municipal y tiendas, concluyendo que la ausencia de higiene tanto en las personas como en los utensilios, la inadecuada operación durante el ordeño, manejo y comercialización, afectan la calidad higiénica sanitaria de la leche cruda, y donde además, en ambos lugares obtuvieron que los resultados microbiológicos sobrepasaban los límites permisibles de acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana NTE – INEM 9 – 2012. En este trabajo para realizar el análisis microbiológico de Numeración de Coliformes, nos basamos en la Norma Técnica Peruana 202.001:2016 obteniendo como resultado que el 62,8% sobrepasaron el límite máximo permisible (1000 UFC/ mL), las cuales fueron consideradas como no aptas para el consumo.

En el presente trabajo la leche cruda, la cual fue tomada como muestra, se transportó almacenada en porongos de aluminio a los centros de acopio a una temperatura ambiente de 19°C – 21°C, luego fueron tomadas y transportadas al laboratorio a una temperatura óptima de refrigeración de 4°C. Brousett *et al* (2015), determinaron la calidad microbiológica de leche cruda en 8 cuencas en la región Puno durante los meses de agosto a septiembre, donde las muestras de leche también fueron tomadas a partir de recipientes de almacenamiento a una temperatura de 20 a 22°C y fueron transportadas al laboratorio a una temperatura de 4°C, obteniendo como resultado en el análisis microbiológico de acuerdo a la Norma Técnica Peruana, que ninguna de las cuencas cumplía con los parámetros establecidos, encontrándose leche de mala calidad.

En la presente investigación basándonos en la Norma ICMSF “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” realizamos la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y la numeración de bacterias coliformes en leche

cruda comparando los resultados con la NTP 202.001:2016, adicionalmente a ello, utilizando la prueba IMViC, realizamos la identificación de género y especie de los coliformes, donde aislamos 140 cepas, siendo las bacterias más frecuentes: 68,6% de *Enterobacter aerogenes*, 3,6% de *Enterobacter cloacae* y 27,8% de *Escherichia coli*. Abad (2015), realizó un estudio microbiológico de leche cruda de 7 puestos de venta en Ecuador, cuantificó los microorganismos en agar Farrell y se aislaron un total de 33 cepas en Agar Mueller Hinton. Para la identificación de género y especie utilizó sistemas múltiples de Analytical Profile Index (API). Las bacterias que encontró fueron: 27,27% género *Bacillus*, 17,39% de *Brucella spp.* y *Aeromonas hidrófila*, 13,04% de *Enterobacter sakazakii* y 4,35% de *Serratia plymuthica*, *Escherichia coli*, *Burkhoderia cepacia*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus warneri*.

VI. CONCLUSIONES

Finalizado el presente trabajo de investigación se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Al comparar los resultados de las muestras analizadas con la Norma Técnica Peruana 202.001:2016 “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Leche cruda. Requisitos”, se obtuvo que el 73,3% y 62,8% sobrepasaron los límites permisibles para la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y coliformes respectivamente.
- El número promedio para las muestras que sobrepasaron los límites permisibles fue de $1,58 \times 10^6$ UFC y $1,33 \times 10^3$ UFC /mL. para la numeración de bacterias aerobias mesófilas viables y de coliformes, respectivamente.
- Las especies más frecuentemente aisladas fueron: *Enterobacter aerogenes* en 96%, *Enterobacter cloacae* en 5% y *Escherichia coli* en 39% de un total de 140 cepas aisladas en las muestras de leche cruda.

VII. RECOMENDACIONES

- A la municipalidad: realizar un mayor control higiénico-sanitario del transporte y almacenamiento de la leche acopiada para el programa “Vaso de Leche”, haciendo cumplir los reglamentos sanitarios establecidos y aplicar programas de control sanitario con la finalidad de asegurar una adecuada calidad del producto.
- A los proveedores: mejorar los procesos higiénicos de recolección, transporte y almacenamiento de la leche cruda. Asimismo, ser constantes con las buenas prácticas de manufactura en la leche cruda expendida e implementar programas operativos de saneamiento en los establecimientos y vehículos donde se procesa y transporta respectivamente, el alimento.
- A los estudiantes: investigar sobre la calidad de los alimentos presentes en nuestra región.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, L. (2015). *Estudio microbiológico de la leche cruda comercializada en mercados populares de la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Agudelo, D. y Bedoya, O. (2004). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 38-42. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/695/69520107.pdf>
- Bonzano, S. (2012). *Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda fría producida en establos con diferentes niveles tecnológicos en el norte del Perú* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Brousett, M., Torres, J., Chambi, R., Mamani, V., y Gutiérrez, S. (2015). Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno -Perú. *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 165-176. doi: 10.17268/sci.agropecu.2015.03.03
- Buñay, N. y Peralta, F. (2015). *Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que ingresa a industrias lacto Ochoa - Fernández CIA. LTDA* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Cohaila, A. (2013). *Calidad microbiológica de leche cruda expedida a los alrededores de los mercados del distrito de Tacna, provincia de Tacna* (tesis de pregrado). Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
- CODEX STAN 206-19991. Norma general para uso de términos lecheros.
- Castillo, M. (2014). *Determinación de residuos de antibióticos y carga microbiana de la leche cruda, que se expende en la ciudad de Iquitos, 2013* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía peruana, Iquitos.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Leche cruda*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/lechecruda/index.html>
- Cedeño, A., Vera, M., Gavilanes, P., Saltos, J., Loor, R., Zambrano, J., Demera, F., Almeida, A. y Moreira, J. (2015). Factores que afectan la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda comercializada en Calceta-Bolívar-Manabí, Ecuador. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 19 (3), 37-54. Recuperado de <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2015/sept/4.pdf>
- Elcorrobarrutia, K. y Espejo, M. (2014). *Determinación de la calidad sanitaria de la leche cruda que se comercializa en la ciudad de Huacho* (tesis de pregrado). Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho.

- Figuerola, C. (2012). *Calidad higiénica de la leche cruda comercializada en los puestos ambulatórios del distrito de Tacna* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
- Fora, G. (2015). *Evaluación de la calidad microbiológica y fisicoquímica de la leche cruda del ganado vacuno del distrito de Sama Inclán – Tacna, 2015* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
- ICMSF. (2000). *Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos enumeración* (Segunda ed., Vol. I). Zaragoza: Acribia.
- Incio, M., y Rojas, K. (2003). *Determinación de la calidad microbiológica de leche fresca a nivel de establos proveedores del Programa Vaso de Leche del distrito de Chiclayo. Enero - Noviembre del 2002* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.
- Luigi, T., Rojas, L., y Valbuena, O. (2013). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus*, 17 (1), 25-33. Recuperado de <http://www.scielo.org.ve/pdf/s/v17n1/art06.pdf>
- Loyola, O., y Velásquez, J., (2013). Calidad de la leche cruda producida y expendida en la ciudad de Cutervo, Cajamarca, Perú. *Pakamuros*, 1(2), 29-39. Recuperado de <https://unj.edu.pe/ojs/index.php/pakamuros/article/download/20/pdf>
- Magariños, H. (2000). *Producción Higiénica de Leche Cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa* (1.^a ed.). Guatemala.
- Martínez, M. M., y Gómez, C. A. (2013). Calidad composicional e higiénica de la leche cruda recibida en industrias lácteas de sucre, colombia. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 93-100. Recuperado de <http://revistabioteologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/bioteologia/article/viewFile/309/263>
- Milke, M. y Arroyo, P. (2013). Leche y productos lácteos: evidencias y recomendaciones en la salud y la enfermedad. *Gaceta médica de México*, 99(2), 1212-1218. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2016/gms161a.pdf>
- Moreno, F., Rodríguez, G., Méndez, V., Osuna, L., y Vargas, M. (2007). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de medicina veterinaria*, 1 (14), 61-83. Recuperado de [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-AnalisisMicrobiologicoYSuRelacionConLaCalidadHigie-4943762%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-AnalisisMicrobiologicoYSuRelacionConLaCalidadHigie-4943762%20(4).pdf)
- Obregón, D., y Zambrano, Z. (2017) *Evaluación microbiológica (aerobios mesófilos, Bacillus cereus y Staphylococcus aureus) y químico - toxicológica de metales*

pesados (pb, hg) en leche para consumo humano en el distrito de Puente Piedra – Lima (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Pinzón, A. (2006). *Determinación del Índice de Bacterias Mesófilas Aerobias Presentes en la Leche Cruda Versus Leche Pasteurizada que se Comercializan en la Zona Urbana de la Ciudad de Popayán* (tesis de Grado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Popayán.

Sánchez, A. (2013). *Calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca en los Establos de la cuenca lechera de La Libertad. Trujillo* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.

U.S. Food and Drug Administration (2017). *Los peligros de la leche cruda: La Leche sin Pasteurizar Puede Representar un Riesgo Grave Para la Salud*. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm210577.htm>

Vásquez, J., Loaiza, E. y Olivera, M. (2017). Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Orinoquia*, 16(2), 13. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89626049004>

IX. ANEXOS

Anexo N° 1: Acta de inspección y toma de muestra.

MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE CHICLAYO
SUBGERENCIA DE SANIDAD Y VIGILANCIA SANITARIA
LABORATORIO DE BROMATOLOGIA
ACTA DE INSPECCION Y TOMA DE MUESTRA DE LECHE CRUDA ENTERA
PROGRAMA VASO DE LECHE

NOMBRE DE LA EMPRESA Y/O ASOCIACION.....
NOMBRE DEL PROVEEDOR
NOMBRE DEL REPARTIDOR (CHOFER)
NOMBRE DEL AYUDANTE

HIGIENE PERSONAL DEL REPARTIDOR AYUDANTE

- | | | |
|---|----|----|
| • Cabello y barba (si tuviera) debidamente recortado | SI | NO |
| • Manos sin granos, hongos, vendajes o curitas sucias | SI | NO |
| • Uñas recortadas | SI | NO |
| • Vestimenta adecuada (gorro, mandil, botas) | SI | NO |

DE LOS PORONGOS

- | | | |
|---|----|----|
| • Se encuentran limpios, sin oxido | SI | NO |
| • Todos los porongos presentan tapas de aluminio | SI | NO |
| • Algunos porongos presentan tapas de plástico, usan plástico, tela u otro objeto para tapar los porongos | SI | NO |

DE LOS UTENSILLOS

- | | | |
|--|----|----|
| • Las jarras, baldes, coladores, litros u otros objetos que usa El repartidor, se encuentran en buen estado de conservación que no presenten roturas, abolladuras, oxido, etc. | SI | NO |
| • Los objetos arriba mencionados se encuentran limpios (libre de suciedad, tierra, etc) | SI | NO |

DEL VEHICULO

- | | | |
|---|----|----|
| • Estado de limpieza del vehículo, (presenta tierra guano, etc) | SI | NO |
|---|----|----|

DE LA TOMA DE MUESTRA

N° de muestra	Hora	Comité Receptor	Litros
.....
.....
.....
.....
.....
.....

OBSERVACIONES.....
.....
.....

Chiclayo,.....de.....de 20....

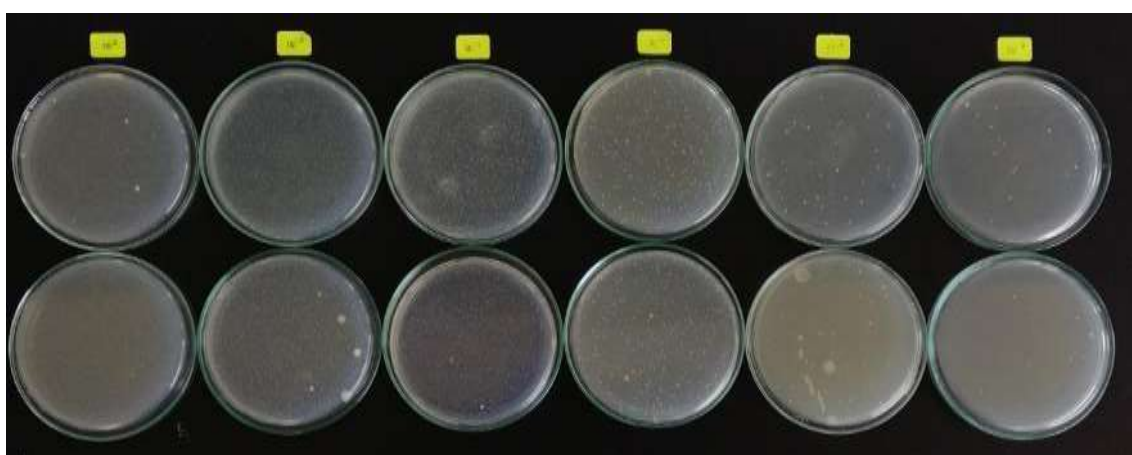
Responsable de la toma de muestra.....

..... Firma del Repartidor Promotor Vaso de Leche Inspector
DNI:.....	DNI:.....	DNI:.....

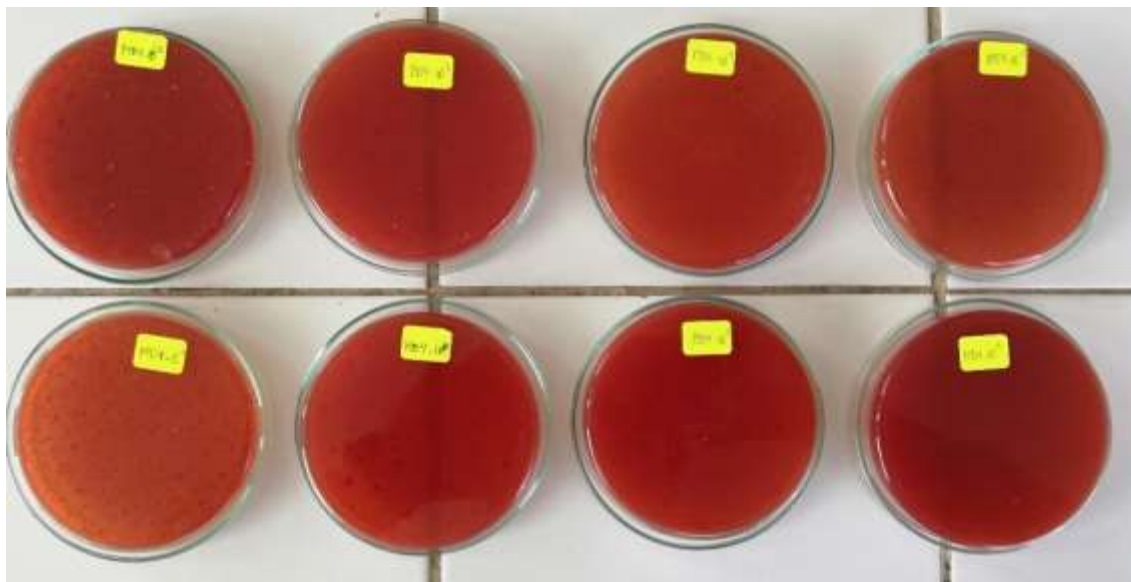
Anexo N° 2: Muestras recolectadas y debidamente refrigeradas.



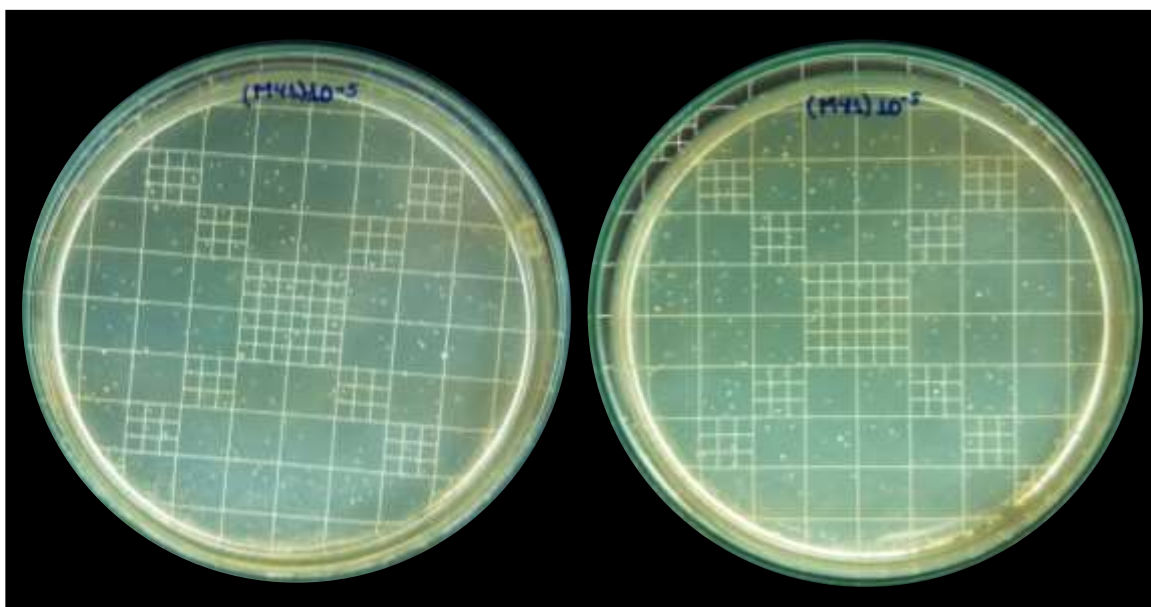
Anexo N° 3: Numeración de microorganismos mesófilos aerobios viables.



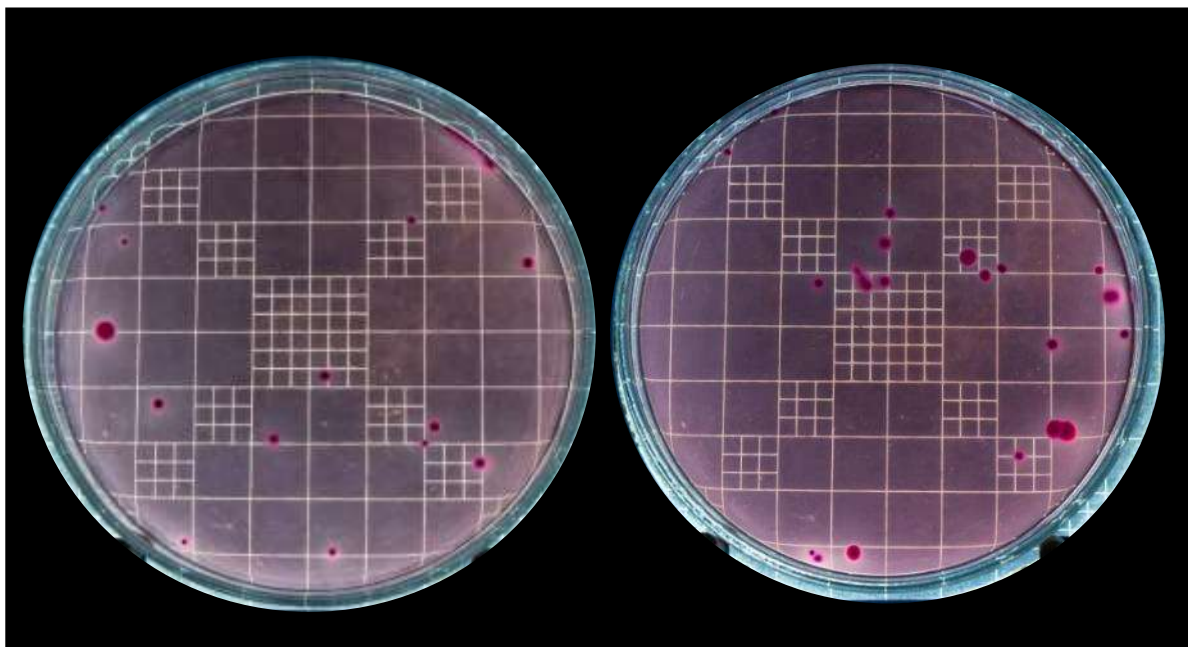
Anexo N° 4: Lectura y selección de placas para la numeración de coliformes.



Anexo N° 5: Selección de placas correspondientes a una dilución que presenten entre 30 y 300 colonias.



Anexo N° 6: Selección de placas que presentaron menos de 150 colonias característica.



Anexo N° 7: Pruebas bioquímicas para identificación de coliformes: IMViC (ICMSF).

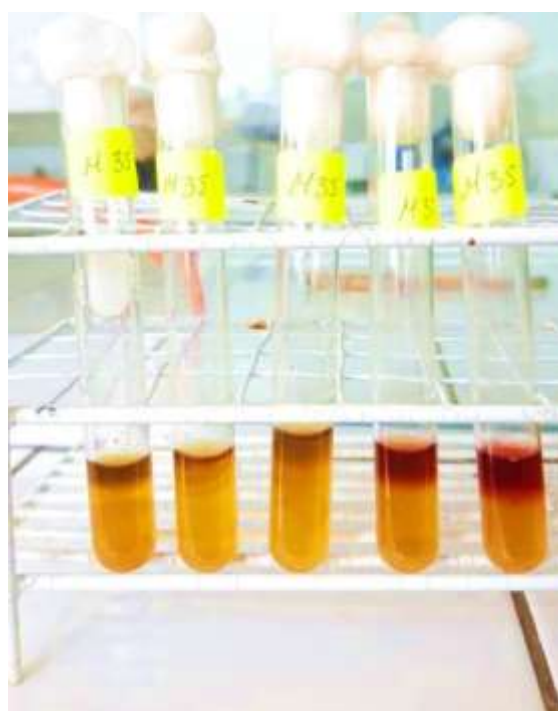
a) Prueba de Indol



b) Prueba de Rojo de Metilo



c) Prueba de Voges Proskauer



d) Prueba de Citrato de Simmons



Anexo N° 8: Laboratorio de la Subgerencia de Sanidad – MPCH.

