

**ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA**

**Predicción de conteos microbiológicos en la
leche cruda con base en la prueba de azul
de metileno**

Sarahí De Los Ángeles Morales Vanegas

**Honduras
Diciembre, 2005**

**ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA**

Predicción de conteos microbiológicos en leche cruda con base en la prueba de azul de metileno

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Sarahí De Los Ángeles Morales Vanegas

**Honduras
Diciembre, 2005**

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reserva los derechos de autor.

Sarahí De Los Ángeles Morales Vanegas

HONDURAS
Diciembre, 2005

Predicción de conteos microbiológicos en leche cruda con base en la prueba de azul de metileno

Presentado por:

Sarahí De Los Ángeles Morales Vanegas

Aprobada:

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A la santísima trinidad y la virgen María por estar siempre conmigo en cada paso de mi vida.

A mi madre Milena Vanegas y mi padre Roberto Morales por haberme guiado siempre por el buen camino y depositar en mí toda su confianza.

A mis hermanos Milena Alejandra, Blanca Gabriela y Roberto Gabriel por su comprensión y amor.

A las familias Morales García y Vanegas Herrera por su amor y oraciones.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la virgen María por darme la bendición de culminar una meta de mi vida.

A mi familia por sus oraciones, comprensión, apoyo y sobre todo amor incondicional en mi vida y especialmente en los últimos cuatro años.

A mis asesores por todos sus consejos, apoyo y amistad en la realización de este proyecto.

Al Dr. Luís Fernando Osorio por sus consejos y enseñanzas dentro y fuera del salón de clases

A todos mis profesores en Zamorano y en el Instituto Sagrado Corazón de Jesús por el granito de arena que pusieron en mí para hacer de mí una buena profesional.

A Luís Sandoval por ser un compañero, un amigo verdadero y brindarme su amor y alegría en todo momento y sobretodo cuando más lo necesitaba.

A la familia Barahona por la amistad y alegría que me brindaron en los cuatro años.

A mis amigos Wendy, Eliana, Jacqueline, Carlos, Ulises, Jorge, Cecilia, Indira, Victor H., Victor N., Victor T., Grace, José M. y a todos aquellos que no menciono aquí por todos los momentos agradables que compartimos en Zamorano.

A mis vecinas y amigas de Rubén Darío en especial a Cecilia., Sofía, Diana G., Johana, Ximena y Nadia por haber hacer del ala a alta de Rubén Darío un verdadero hogar lejos de casa.

A todo el personal de la planta de lácteos en especial a Rigo Silva, Francisco Flores, Erick y Emilio por su colaboración, amistad y consejos.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mis padres por todos los esfuerzos que hicieron para darme la mejor herencia una excelente educación.

A food for progress IV por financiar parte de mis estudios en Zamorano

A la secretaría de agricultura y ganadería de la república de Honduras por financiar parte de mis estudios en Zamorano.

Al fondo dotal hondureño por financiar parte de mis estudios en Zamorano.

RESUMEN

Morales, Sarahí. 2005. Predicción de conteos microbiológicos de leche cruda con base en la prueba de azul de metileno. Proyecto de graduación del programa de ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana “Zamorano”, Honduras. 51 p.

La inspección y determinación de la calidad de la leche cruda es un paso importante en el proceso de recibo de la leche, en el cual deben ser evaluadas sus características físicas, químicas y microbiológicas. La mejor manera de medir la calidad bacteriológica de la leche es mediante recuentos totales de bacterias, sin embargo por su falta de practicidad se recurre a métodos indirectos como la prueba de azul de metileno. El azul de metileno mide indirectamente la población bacteriana presente en la leche, estableciendo una relación inversamente proporcional con el tiempo de pérdida del colorante. El objetivo del estudio fue obtener una ecuación que prediga el contenido bacteriano presente en la leche por el tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno. Se realizó un análisis de regresión lineal donde se comparó el contenido de microorganismos en la leche con el tiempo de reducción. La ecuación encontrada fue $y = 7.10292 - 0.51738x$ ($R^2 = 0.9014$). El modelo posee una correlación alta negativa (-0.95053). La ecuación obtenida brinda el contenido de microorganismos expresado en logaritmo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). La comprobación de la ecuación se llevó a cabo con las muestras de cada proveedor de la planta de industrias lácteas. Se analizaron los valores observados y pronosticados de las muestras. El análisis fue validado con una prueba t, indicando que no hay diferencias significativas entre los valores pronosticados y reales ($P < 0.05$). La ecuación desarrollada predice la carga de microorganismos en la leche sin mostrar diferencias significativas a los valores de referencia del método de recuento total de bacterias.

Palabras claves: calidad leche cruda, decoloración, mesófilos aerobios, población bacteriana.

Luís Fernando Osorio, Ph.D.

CONTENIDO

Portadilla	ii
Autoría	iii
Hoja de firmas.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
Resumen.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de cuadros	xi
Índice de figuras.....	xii
Índice de anexos.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición del problema	2
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Justificación del estudio.....	2
1.4 Límites y limitantes del estudio.....	3
1.4.1 Límite:.....	3
1.4.2 Limitantes:	3
1.5 Objetivos.....	3
1.5.1 Objetivo general.....	3
1.5.2 Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos microbiológicos de la leche.....	4
2.1.2 Fuentes de contaminación de la leche.....	4
2.2 Crecimiento bacteriano	7
2.3 Recuento de bacterias	8
2.3.1 Métodos basados en la reducción de colorantes	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Ubicación	12
3.2 Materiales y equipo.....	12
3.2.1 Materiales.....	12
3.2.2 Equipo.....	12
3.3 Metodología	13
3.3.1 Datos.....	13
3.3.2 Verificaciones	17
3.3.3 Clasificación leche recibida	17

3.3.4	Mediciones durante los análisis	17
3.3.4.1	Temperatura.....	17
3.3.4.2	Tiempo.....	17
3.3.4.3	Conteo bacteriano	17
3.4	Diseño experimental y análisis estadístico	18
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1	Desarrollo De La Ecuación.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2	Verificaciones	22
4.3	Clasificación de la leche cruda recibida.....	24
5.	CONCLUSIONES	25
6.	RECOMENDACIONES.....	25
7.	BIBLOGRAFIA.....	25
8.	ANEXOS	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Principales microorganismos presentes en la leche cruda	6
2.	Comparación tiempo de reducción y UFC/ml.	10
3.	Clasificación microbiológica de la leche cruda en Zamorano	10
4.	Clasificación leche cruda de acuerdo al tiempo de reducción en Zamorano.....	11
5.	Primera toma de datos para la obtención del modelo de regresión.....	19
6.	Segunda toma de datos para la obtención del modelo de regresión.....	20
7.	Tercera toma de datos para la obtención del modelo de regresión.....	20
8.	Comparación entre valor esperado con la ecuación y valor experimental con las siembras microbiológicas.	22
9.	Separación de medias de los proveedores.....	24
10.	Clasificación del grado de calidad	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Fases de la curva de crecimiento bacteriano..... 8
2. Diagrama para el desarrollo de una curva de crecimiento 14
3. Diagrama de flujo para las siembras microbiológicas. 15
4. Diagrama de proceso para la elaboración de la prueba
de azul de metileno. 16
5. Relación del tiempo de reducción de la prueba de azul
de metileno con la carga microbiana de aerobios totales..... 21

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Análisis en estadístico de los datos para obtener la ecuación 30
2. Resultados de los análisis para la verificación..... 34
3. Análisis estadístico de las verificaciones..... 36
4. Análisis estadístico para la clasificación de la leche 36

1. INTRODUCCIÓN

La leche es la secreción láctea, prácticamente libre de calostro, obtenida de un ordeño completo de una o varias vacas saludables. No debe contener menos de 8.25% de sólidos no grasos y no menos de 3.5% de grasa (International dairy food institute, 2004). De acuerdo con Enamorado (2003), para considerar la leche como un producto apto para el consumo humano debe cumplir una serie de requerimientos entre los que se encuentra una apariencia blanca, ausencia de olores desagradables, libre de sustancias anormales y un bajo conteo de bacterias y células somáticas.

La composición de la leche brinda un medio excelente para la proliferación de bacterias que provoca un cambio indeseable en la leche y por ende en la calidad de la misma. En el deterioro aparecen en la leche productos secretados por las bacterias a partir de los sustratos de la leche como las proteínas, grasa, etc. Según la FAO (1966), la aceptación de la leche como un alimento nutritivo y sin peligro para el mercado exige inocuidad, por lo tanto para que las plantas procesadoras la brinden deben exigir que sus materias primas sean de alta calidad. En el caso de los lácteos la principal materia prima en la que se debe tener una alta exigencia de calidad es la leche cruda.

La calidad microbiológica de la leche se puede determinar mediante métodos directos de recuento de bacterias totales así como por métodos indirectos basados en reducción de colorantes.

1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El uso de la prueba de azul de metileno actualmente no permite conocer con exactitud la cantidad de microorganismos presentes en la leche, únicamente brinda un aproximado de la posible cantidad de microorganismos presente en la leche cruda al momento de recibo.

En la planta de lácteos en Zamorano el monitoreo de la calidad de la leche cruda recibida se realiza mediante la prueba de azul de metileno dando resultados en rangos muy amplios sobre la cantidad de microorganismos presentes, dificultando el pago por la calidad de la leche recibida.

1.2 ANTECEDENTES

Actualmente en la planta de lácteos de Zamorano se realiza la prueba de azul de metileno con el objetivo de clasificar la leche cruda por su calidad bacteriológica castigando la falta de calidad con el precio de compra del litro de leche. La prueba de azul de metileno no proporciona la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC/ml).

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio permitirá a la planta de lácteos de Zamorano tener una mayor exactitud en la calidad de la materia prima recibida, evitando el recibo en la planta de aquella leche que no cumpla con los estándares microbiológicos establecidos con anterioridad y facilitará el pago por calidad de su materia prima más importante.

Este examen minucioso de la materia prima de la planta se verá reflejado en la calidad de sus productos terminados y disminuirá en el futuro la cantidad de producto devuelto.

1.4 LÍMITES Y LÍMITANTES DEL ESTUDIO

1.4.1 Limite:

- Obtención de una ecuación que permita predecir mediante un método indirecto, pero más rápido la detección de la carga de microorganismos presente en la leche entera cruda.

1.4.2 Limitantes:

- Falta de un área en el laboratorio de la planta de industrias lácteas destinada para los análisis microbiológicos.
- Falta de tiempo para la realización y toma de datos del estudio.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo General

- Establecer una ecuación que prediga la carga microbiana en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Establecer una ecuación que explique la relación entre los cómputos microbiológicos y la prueba de azul de metileno.
- Validar esa ecuación en el área de recibo en la planta de industrias lácteas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA HIGIENE DE LA LECHE

De acuerdo con Walstra et al. (2001), la leche adquiere en el transcurso del ordeño componentes que naturalmente no pertenecen a la misma soliendo alterar su calidad y consecuentemente su higiene. Se pueden distinguir tres tipos de higiene u alteraciones de la calidad en la leche:

- a) Higiene microbiológica, presencia de microorganismos que pueden causar infecciones y/o intoxicaciones.
- b) Alteración química, cambios químicos en los componentes de la leche como grasa, proteínas, entre otros.
- c) Alteración física, como consecuencia de las anteriores.

2.1.1 Higiene microbiológica

La cantidad y clase de microorganismos presente en la leche inicialmente refleja directamente la contaminación debido a las condiciones del ordeño, limpieza del equipo utilizado, enfriamiento de la leche después del ordeño, enfermedades del hato lechero, entre otros (Adams y Hope, 1989).

Una buena calidad de la leche cruda es requerida para el procesamiento de la misma. Los defectos de baja calidad no pueden ser mejorados en el procesamiento y frecuentemente afecta los productos terminados (Dairy science facts, 2002).

2.1.2 Fuentes de contaminación de la leche

La contaminación de la leche ocurre desde el ordeño hasta el momento que la leche es procesada. De acuerdo a Revilla (2000), se distinguen a continuación los principales agentes contaminantes de la leche:

- a) El animal: Los microorganismos entran en la vía mamaria mediante el canal del pezón y vía sanguínea. Normalmente una leche recién ordeñada contiene aproximadamente entre 1,000 a 2,000 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), el número de microorganismos que se pueden encontrar en la leche es mayor en los primeros chorros del ordeño a diferencia del resto. Debido a que la ubre se encuentra en contacto directo con el exterior, y en este caso el suelo, heno, y cualquier superficie donde las vacas se echen, se considera la ubre como uno de los principales factores de contaminación de la leche y fuente de enfermedades al momento del ordeño. Los animales enfermos, principalmente padecientes de problemas como mastitis clínica y sub-clínica provocan un incremento de UFC/ml. Una leche con mastitis tiene aproximadamente entre 6 a 7 millones de UFC/ml¹
- b) Utensilios y equipo: La flora microbiana adquirida por la leche después del ordeño depende de la higienización de los utensilios utilizados. Al cuantificar la contaminación por este medio se vuelve en una de las principales fuentes de contaminación. Los utensilios no deben tener formas angulares y rugosas que dificulten el proceso de higienización y favorezcan el crecimiento de las bacterias. El equipo debe ser desinfectado antes del ordeño y mantener la higiene antes, durante y después del ordeño.
- c) Personal: Se ha señalado al ordeñador como responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos, por lo tanto es clave que todo el personal que trabaje directamente con en el ordeño tenga buenos hábitos de higiene para lograr la obtención de un producto altamente higiénico.
- d) Agua: Es una fuente de contaminación muy importante, muchas bacterias patógenas son transmitidas por medio del agua. Es importante conocer la calidad del agua utilizada para la limpieza de los utensilios utilizados en el ordeño.

¹ Consulta personal, Luís Osorio, Ph.D. Zamorano. 2005.

Cuadro 1. Principales microorganismos presentes en la leche cruda

Nombre	Fuente	Patogenicidad
<i>Bacillus anthracis</i>	Vaca enferma, suelos	Ántrax
<i>Bacillus cereus</i>	Alimentación, estiércol, polvo, suelo	Intoxicación alimenticia
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i>	Alimentación, estiércol, polvo, suelo	Probablemente no
<i>Brucilla abortus</i>	Vaca enferma	Aborto en vacas, fiebre de malta en humanos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Estiércol, agua	Desordenes intestinales
<i>Clostridium botulinum</i>	Suelo, agua contaminada	Botulismo
<i>Clostridium perfringens</i>	Suelo, agua contaminada, estiércol	Desordenes intestinales
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Suelos, ensilajes, estiércol	No hay patogenicidad
Coliformes	Utensilios de ordeño, heces, agua contaminada	Mastitis, desordenes intestinales
<i>Corynebacterium Boris</i>	Canal del pezón	No hay patogenicidad
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Interior de la ubre, moscas	Mastitis
<i>Coxiella burnetti</i>	Ganado enfermo, estiércol	Mastitis
<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Utensilios de ordeño, sala de ordeño	No hay patogenicidad
<i>Leptospira</i>	Ganado infectado, orina, agua contaminada, aguas superficiales	Leptospirosis
<i>Listeria monocytogenes</i>	Suelo, alimentación, estiércol	Meningitis
<i>Microbacterium lacticum</i>	Utensilios de ordeño	No hay patogenicidad
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Enfermedad de la vaca o del ordeñador	Tuberculosis
<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	Estiércol, agua contaminada	Desordenes intestinales, mastitis
<i>Staphylococcus aureus</i>	Canal del pezón, interior de la ubre, piel del ordeñador enfermo	Intoxicación alimentaria, mastitis, úlceras
<i>Staphylococcus agalactilae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. uberis</i>	Interior de la ubre, sala de ordeño	Mastitis
<i>Vibrio cholerae</i>	Agua contaminada	Cólera

Fuente: Wastra et al. (2001).

2.2 CRECIMIENTO BACTERIANO

De acuerdo con Waltra et al. (2001), las bacterias presentan un crecimiento logarítmico. Evidentemente esto se refiere al aumento en el número de bacterias presentes en la leche.

El tiempo de generación microbiano se encuentra influenciado por factores como temperatura, cepa bacteriana, presión del oxígeno, pH, concentración de inhibidores y nutrientes, velocidad de reproducción, entre otros.

Según Walstra et al. (2001), en la curva de crecimiento bacteriano se distinguen cuatro fases principalmente:

- a) Fase de latencia: Las bacterias se inician un proceso de adaptación al medio donde se encuentran.
- b) Fase de crecimiento exponencial: La población bacteriana se duplica a intervalos regulares. El medio varía continuamente, los nutrientes son consumidos constantemente y los productos del metabolismo se empiezan a acumular. Durante esta fase el crecimiento se produce alta velocidad.
- c) Fase estacionaria: Se caracteriza por una disminución en la velocidad de reproducción. Los nutrientes se empiezan a carecer y los productos del metabolito aumentan. La tasa de crecimiento es igual a la tasa de mortalidad de las bacterias.
- d) Fase de declinación o muerte: Existe una disminución logarítmica de la población microbiológica.

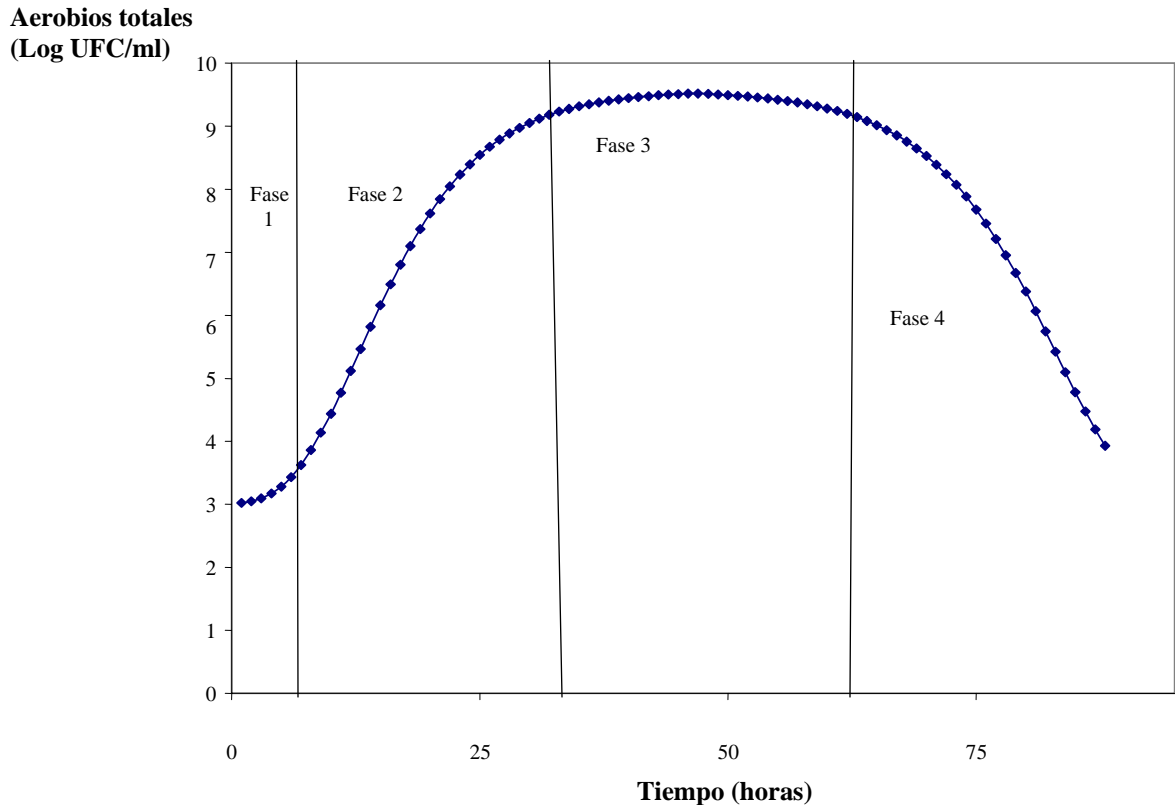


Figura 1. Fases de la curva de crecimiento bacteriano. Fases: 1 (latencia), 2 (exponencial), 3 (estacionaria), 4 (declinación o muerte).

Gráficamente el crecimiento microbiano inicia como se mencionó anteriormente con una fase de latencia donde el crecimiento es muy poco debido a las razones expuestas anteriormente, seguido de un crecimiento más acelerado en la fase de crecimiento exponencial hasta llegar al punto estacionario de la curva y finalmente una fase donde disminuye el crecimiento microbiano.

2.3 RECuento DE BACTERIAS

Según Dairy science facts (2002), el método estándar determina la cantidad de mesófilos aerobios presentes en la muestra con la capacidad de crecer y formar colonias contables.

Los métodos que se utilicen en la inspección y determinación de la calidad de la leche cruda deben ser elegidos de manera que permitan mostrar las condiciones sanitarias con las que llega la leche y se toma la muestra, estos métodos se ajustan a la conveniencia de la planta (FAO, 1966).

La mejor manera de calificar la calidad bacteriológica de la leche es mediante recuento total de bacterias, sin embargo en líneas de producción esta manera de identificación de microorganismos no es práctica así que se utilizan pruebas rápidas que muestran índices poco exactos y precisos pero proporcionales al nivel de contaminación existente en la

leche pudiendo ser indicadores de la calidad final esperada. Estos métodos poco precisos son:

1. Recuento de gérmenes viables,
2. Recuento microscópico,
3. Métodos basados en la reducción de colorantes.

Los tres métodos mencionados anteriormente muestran una exactitud similar, por lo que la elección del mismo se inclinará por la facilidad de su uso y factores económicos (FAO, 1966).

2.3.1 Métodos basados en la reducción de colorantes

Según Diliello (1982), las pruebas basadas en la reducción de colorantes son fáciles de realizar. Estos métodos determinan la actividad fisiológica o metabólica de la población de bacterias a examinar. El método más utilizado es la prueba de reducción del azul de metileno (TRAM), este método mide indirectamente la población bacteriana presente en la leche y establece una correlación entre el tiempo de decoloración y el conteo bacteriano resultado en una relación inversamente proporcional entre las variables (FAO, 1966).

Según Foster et al. (1957), la prueba de reducción de azul de metileno se basa en el potencial oxido-reducción de la leche, la leche cruda inicialmente posee potencial oxido-reducción entre +0.2 a +0.3 voltios. Por acción de las bacterias, especialmente durante la fermentación ácida láctica, se elimina el O₂ de la leche y se forman compuestos reductores. Por lo tanto, el potencial redox disminuye rápidamente, incluso hasta valores de -0.2 a -0.1 voltios (Waltra, *et al*, 2002).

El principio del método esta basado utilizar el colorante azul de metileno como un indicador de la oxido-reducción de la leche cruda. Cuando el colorante muestra un color azul, se encuentra en estado oxidado. La ausencia de color se manifiesta en el estado reducido, en éste último caso la leche tiene su color normal. El tiempo de reducción se interpreta cuando la muestra se decolora en cuatro quintos del total.

Es importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones para evitar imprecisiones:

- El cambio de la forma azul es reversible. Una agitación innecesaria hará que el tiempo de reducción se alargue dando resultados de una mayor calidad a la existente (falso negativo).
- Son varias las cepas bacterianas presentes en la leche que tienen la capacidad de secuestrar el oxígeno presente en el medio y por lo tanto generar la reducción del azul de metileno provocando una disminución en el color azul de la muestra.

- Debido a que el método es cualitativo está sujeto a la interpretación del laboratorista, basado en su experiencia, pudiendo generar resultados falsos positivos o falsos negativos.
- Mala homogenización en la toma de la muestra.

El tiempo de reducción se expresa como TRAM con la cantidad de horas de la reducción, internacionalmente la interpretación del TRAM se representa en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Comparación tiempo de reducción y UFC/ml.

TRAM (horas)	Aerobios totales (UFC /ml).
½ - 1	>5 millones
2 - 3 ½	700,000 - 5 millones
4 - 5 ½	200,000 - 700,000
> 8	<200,000

Fuente: Rosell y Gómez (1960).

Según Foster *et al* (1957), los tiempos de reducción pueden verse afectados por:

- La etapa de crecimiento de la bacteria, pero esta posible variación es mínima y no representa un cambio significativo en el conteo bacteriano.
- Distribución irregular de las bacterias.

Este método es bastante usado en la industria para la clasificación de la leche cruda por la sencillez y la escasa cantidad de equipos y materiales usados en el análisis. La leche se clasifica de acuerdo a su contenido bacteriano de la siguiente manera:

Cuadro 3. Clasificación microbiológica de la leche cruda en Zamorano²

Grado de Calidad	Calidad Microbiológica	Pago Lempiras/litro
A	Hasta 400,000 UFC/ml	6.00
B	400,001 - 800,000 UFC/ml	5.50
C	800,001 - 1,000,000 UFC/ml	4.00

Tomando en cuenta la clasificación anterior se ha determinado la clasificación de la leche cruda de acuerdo al tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno.

² Consulta personal, Luís Osorio, Ph.D. Zamorano. 2005.

Cuadro 4. Clasificación leche cruda de acuerdo al tiempo de reducción en Zamorano³

Clasificación calidad de la leche	Tiempo de reducción azul de metileno (horas)
Muy Buena	>6
Buena	4 – 6
Mala	2 – 4
Muy mala	<2

³ Consulta personal, Luís Osorio, Ph.D. Zamorano. 2005.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio se llevó acabo en las instalaciones de la planta de industrias lácteas de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, ubicada en el valle de Yaguare, kilómetro 30 al este de la ciudad de Tegucigalpa, Honduras.

3.2 MATERIALES Y EQUIPO

3.2.1 Materiales

1. Leche entera cruda.
2. Reactivo de azul de metileno.
3. Medio de cultivo para mesófilos aerobios totales.
4. Agua destilada.
5. Agua petonada.

3.2.2 Equipo

1. Termómetro.
2. Frascos de dilución de 99 ml.
3. Tubos de ensayo
4. Platos petri de vidrio con un diámetro exterior de 100 mm y un diámetro interno de 91 mm, profundidad de 15 mm.
5. Cucharón de fondo redondo de acero inoxidable con capacidad de 10 ml.
6. Gradilla de metal laminado o de alambre inoxidable.
7. Pipetas de 10 ml
8. Micropipeta de 200 – 1000 μ l (0.2 – 1 ml)
9. Baño maría con una fuente de calor controlada con termostato para mantener las muestras entre 35 – 37 °C.
10. Autoclave.
11. Incubadora 37 \pm 1°C
12. Contador de colonias.

3.3 METODOLOGÍA

Se evaluó el contenido microbiológico presente en la leche cruda entera mediante el método de reducción del azul de metileno y se comparó con conteos de siembras microbiológicas.

3.3.1 Datos

Se buscaron muestras de leche que presentarán altos y bajos conteos microbiológicos, así como cortos y largos tiempos de reducción del azul de metileno respectivamente utilizando el principio de las curvas de crecimiento. El procedimiento utilizado para desarrollar las curvas de crecimiento se explican en la Figura 2. y se detalla a continuación:

1. Recibo de la leche de los proveedores de la planta de procesamiento.
2. Toma de una muestra de 1000 ml de leche cruda.
3. Esterilización de la muestra en el autoclave a 121°C por 15 minutos.
4. Enfriamiento de la leche cruda estéril hasta 42°C
5. Inoculación de la leche cruda estéril con 1 ml de leche cruda.
6. Realización de las pruebas detalladas en las figuras 3 y 4. La toma de datos se realizó con intervalos de 20 minutos en la primera y segunda curva y cada 30 minutos en la tercera toma de datos, la variación en la frecuencia se hizo con el fin de obtener más diferenciación en los análisis entre cada tiempo, hasta las siete horas. El contenido de UFC/ml se expresó como logaritmo de UFC/ml para una mejor visualización de la curva y análisis de los resultados.
7. Higienización de materiales utilizados.

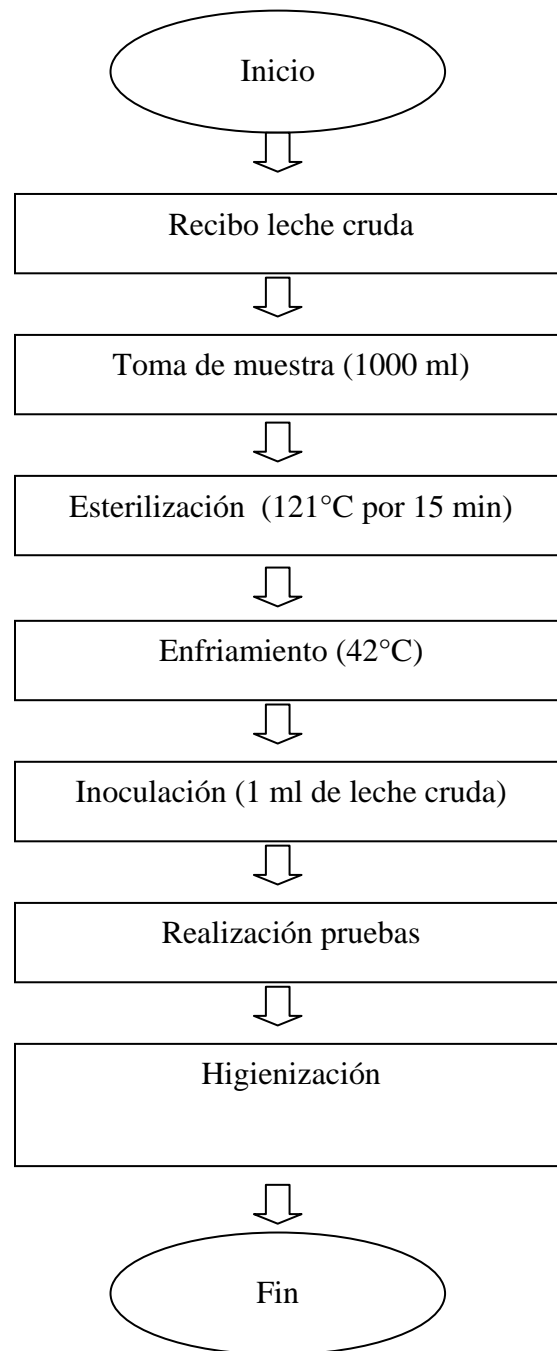


Figura 2. Diagrama para el desarrollo de una curva de crecimiento.⁴

⁴ Consulta personal, Wilfredo Domínguez, M.Sc. Zamorano. 2005.

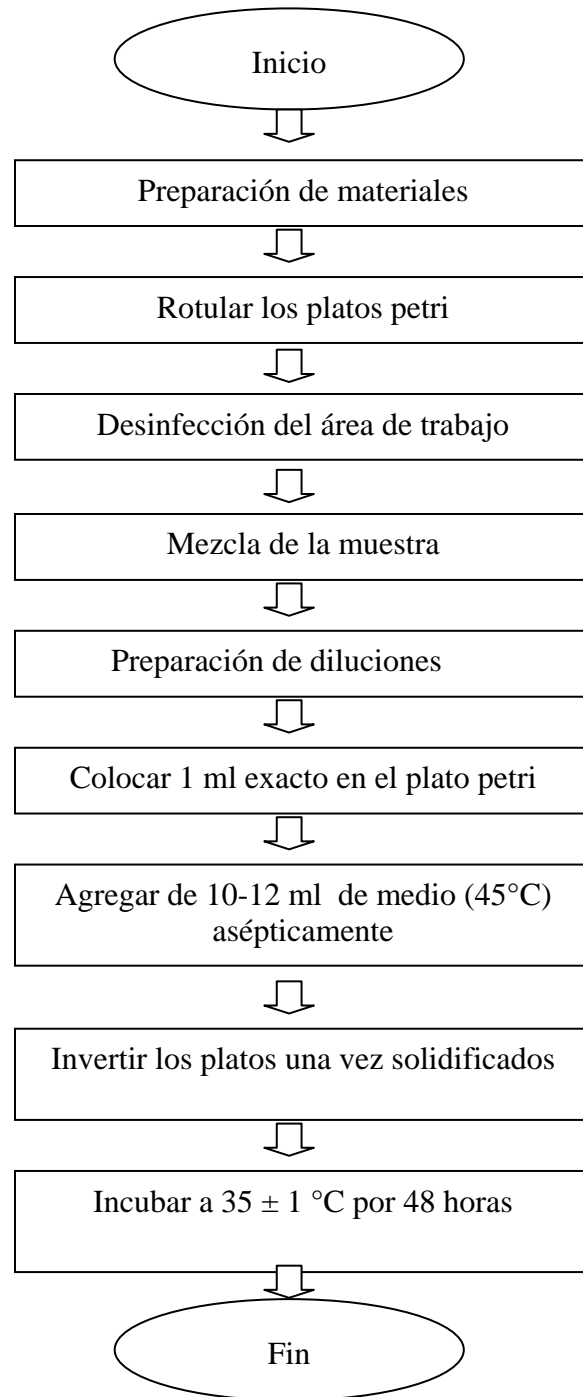


Figura 3. Diagrama de flujo para las siembras microbiológicas.

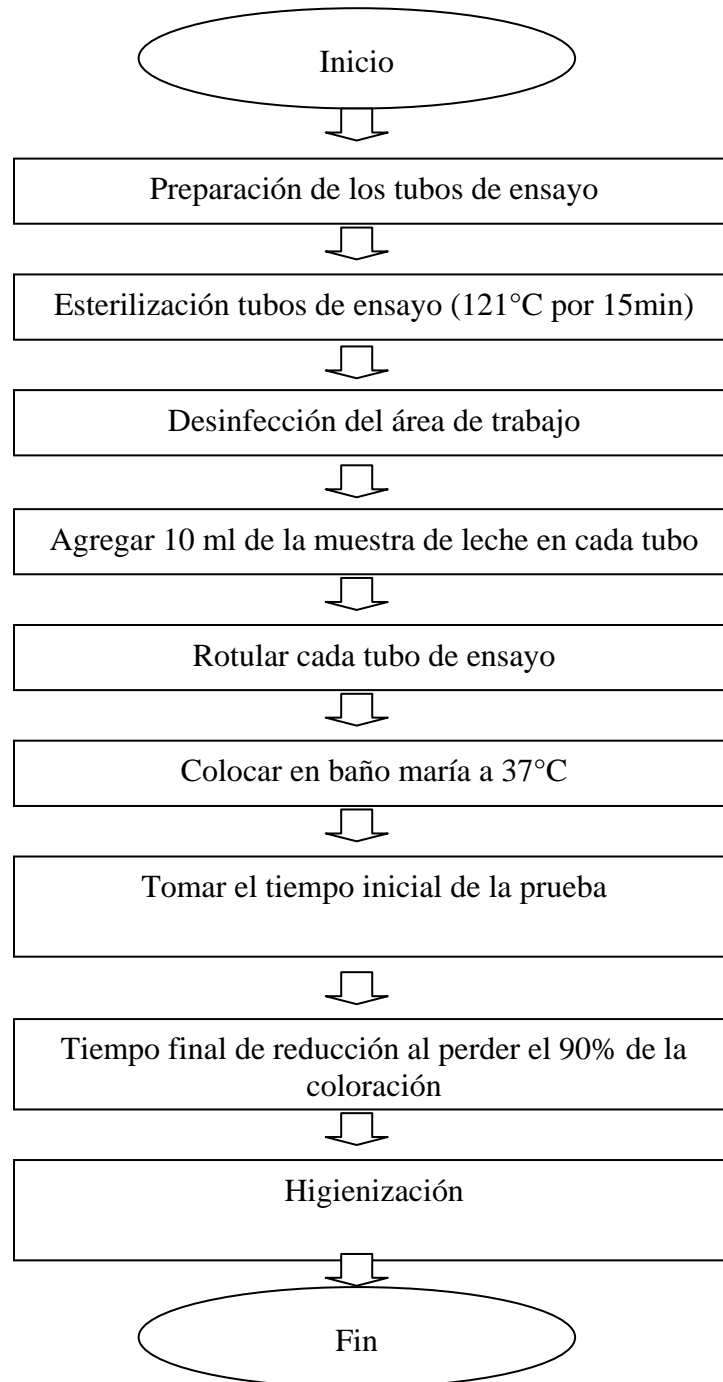


Figura 4. Diagrama de proceso para la elaboración de la prueba de azul de metileno.

3.3.2 Verificaciones

Se realizaron análisis a los proveedores de la planta con sus respectivas repeticiones con el propósito de verificar los resultados brindados por la curva obtenida. El procedimiento seguido para la realización de las pruebas se describe en las figuras 3 y 4.

3.3.3 Clasificación leche recibida

La planta de industrias lácteas cuenta con una clasificación determinada por la calidad microbiológica de la leche recibida, castigando la calidad con el precio de pago por litro.

Se utilizaron las muestras de la verificación para clasificar la leche según su grado de calidad.

3.3.4 Mediciones durante los análisis

3.3.4.1 Temperatura. En el desarrollo de la curva de crecimiento fue determinante mantener el cultivo madre a una temperatura de 35°C para lograr tiempos de generación esperados cada 20 minutos de acuerdo a la metodología explicada anteriormente.

Así mismo para la prueba de azul de metileno mantener la temperatura del baño maría a 35°C fue determinante. Se realizó una verificación de temperatura cada 20 minutos con el propósito de impedir algún cambio térmico que afectara los resultados de la prueba de azul de metileno.

3.3.4.2 Tiempo. La medición del tiempo se realizó mediante un cronómetro durante horas consecutivas en el caso del desarrollo de la curva de crecimiento, las pruebas descritas anteriormente se realizaron cada 20 minutos medidos de igual manera con el cronómetro.

La prueba de azul de metileno expresa sus resultados basados en tiempos de reducción, se tomó el dato inicial y el tiempo final cuando la muestra se decoloraba en cuatro quintos, expresando el resultado en horas. Se utilizó el mismo cronómetro para todas las mediciones.

3.3.4.3 Conteo bacteriano. El recuento de unidades formadoras de colonia se realizó a las 48 horas con un contador de colonias.

Las pruebas se realizaron por duplicados, tomando en cuenta únicamente aquellos platos donde el resultado oscilaba entre 25 a 250 unidades formadoras de colonias.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tres curvas de crecimiento con el propósito de evaluar y comparar el contenido microbiológico desde bajos hasta altos niveles microbiológicos mediante recuentos de bacterias totales y la prueba de reducción del azul de metileno, y así desarrollar mediante una regresión lineal una ecuación que indique el contenido más exacto de microorganismos presentes en la muestra evaluada.

Las variables consideradas para el análisis de regresión lineal fueron el recuento total de bacterias (logaritmo de unidades formadoras de colonia) como la variable independiente y el tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno como la variable dependiente. Se espera obtener una ecuación de esta forma:

$$y = mx + b$$

Una vez obtenida la ecuación se realizaron verificaciones de la misma con los proveedores de la planta de industrias lácteas. Los datos fueron analizados mediante una prueba t para observar existen diferencias significativas entre el valor pronosticado y el real, utilizando un nivel de significancia de 0.05.

Los datos obtenidos para las verificaciones fueron analizados mediante una separación de medias tukey, por proveedor para clasificar la leche cruda en la planta de lácteos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DESARROLLO DE LA ECUACIÓN

Se tomaron datos que con el propósito de obtener contenidos microbiológicos y tiempos de reducción que abarcaron la curva de microorganismos deseada.

Cuadro 5. Primera toma de datos para la obtención del modelo de regresión

Tiempo de toma de datos (Horas)	Aerobios totales (Log UFC/ml)	Tiempo de reducción (Horas)
0.00	3.176	7.466
0.55	3.415	7.268
0.66	3.447	7.030
1.00	3.462	6.570
1.33	3.833	6.417
1.66	3.914	6.180
2.00	4.114	5.030
2.33	4.255	4.500
2.66	4.653	4.850
3.00	4.940	4.200
3.33	5.322	3.740
3.66	5.380	3.180
4.00	5.477	2.830
4.33	5.799	1.100
4.66	5.944	2.310
5.00	5.826	2.660
5.33	6.255	0.780
5.66	6.531	0.220
6.00	7.114	0.200

Cuadro 6. Segunda toma de datos para la obtención del modelo de regresión.

Tiempo Toma de muestra (Horas)	Aerobios totales (Log UFC/ml)	Tiempo de reducción (Horas)
0.0	3.002	9.08
0.3	2.778	9
0.7	3.658	8.42
1.0	3.481	8
1.3	3.415	7.62
2.3	3.556	6.78
2.7	4.633	5.5
4.0	4.477	4.35
4.3	5.491	3.13
4.7	5.531	2.38
5.0	5.884	1.12
5.3	6.152	0.5
5.7	7.057	0.48
6.0	7.217	0.4
6.2	7.607	0.38
6.4	8.172	0.25

Cuadro 7. Tercera toma de datos para la obtención del modelo de regresión

Tiempo toma de muestras (Horas)	Aerobios totales (Log UFC/ml)	Tiempo de reducción (Horas)
0	2.796	6.3
0.5	2.916	6.317
1	3.854	6.2
1.5	4.196	5.65
2	4.169	4.95
2.5	4.299	4.3
3	5.427	3.73
4	5.796	2.6
5	6.55	1.16
5.5	6.602	1.7
6.5	7.55	0.13
7	7.934	0.1

En los cuadros 4, 5 y 6 se muestra la frecuencia de los tiempos en los que se hicieron los análisis para cada curva, asimismo la carga microbológica de aerobios totales (Log UFC/ml) y el tiempo de reducción de cada muestra.

Utilizando los datos de los cuadros mostrados se logró obtener la correlación existente entre la carga microbiana y el tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno. Durante ese tiempo la muestra se mantuvo a una temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

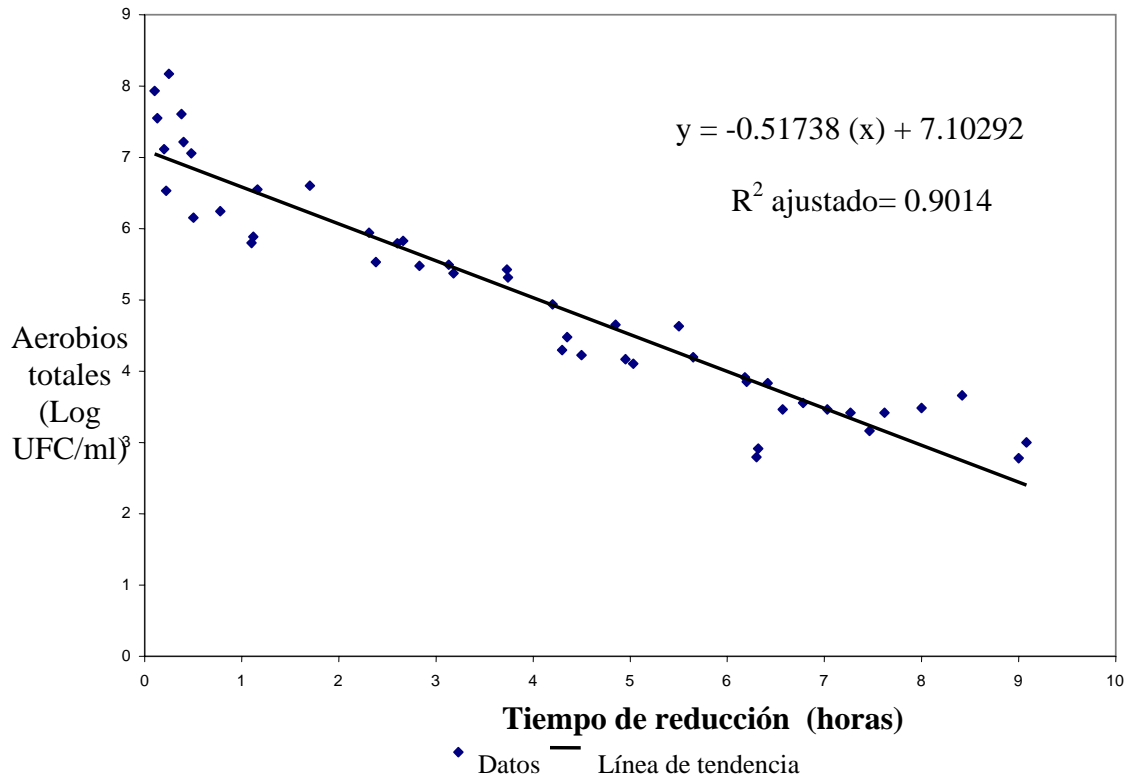


Figura 5. Relación del tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno con la carga microbiana de aerobios totales.

En el gráfico se muestra el comportamiento de la prueba de azul de metileno con respecto a la carga microbiana de aerobios totales. De acuerdo con el gráfico existe una relación inversamente proporcional entre ambas variables, el modelo muestra un coeficiente de correlación de Pearson de -0.950053 indicando que existe una correlación alta negativa; Es decir que a mayor tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno menor es el contenido de microorganismos en la leche. Los valores analizados cubren los rangos de los conteos microbiológicos con la que llega la leche a la planta de lácteos.

De igual manera el modelo fue analizado mediante un modelo de regresión para obtener una ecuación que explique el contenido de aerobios totales (Log UFC/ml) y el tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno (horas). La ecuación encontrada fue la siguiente:

$$y = -0.51738(x) + 7.10292$$

En la ecuación se muestra la variable y como el contenido de logaritmos de colonias formadoras de colonias, el intercepto 7.10292, el coeficiente -0.51738 y la variable x que representa el tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno expresado en horas.

Se puede apreciar que el modelo explica la mayor parte de las variaciones de los datos, o sea que la regresión se ajusta bien a los datos (R^2 ajustado= 0.9014).

4.2 VERIFICACIONES

El análisis de la prueba t muestra que no existen diferencias significativas entre el valor pronosticado y el valor experimental ($P=0.0765$). Este resultado comprueba que la ecuación explica el contenido de logaritmos de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) bastante bien.

Cuadro 8. Comparación entre valor esperado con la ecuación y valor experimental con las siembras microbiológicas.

Aerobios totales observados (Log UFC/ml)	Aerobios totales pronosticados (Log UFC/ml)
3.9031	4.1778
4.7924	4.9104
5.4472	5.4278
4.8195	4.8675
5.8692	5.8504
5.1072	5.1432
5.0719	5.0571
5.0043	4.9363
5.3802	5.5572
6.0969	6.1349
5.7559	5.8557
6.0170	5.9022
5.7160	5.3847
5.1790	5.2105
5.6628	5.6434
5.0212	5.0398
5.0719	5.0225
6.0569	5.9883
5.9243	5.8589
5.1430	5.2122
6.5315	6.5057
4.7924	4.7639
5.0492	5.1088
5.4472	5.5744
4.5798	4.6172
5.2765	5.3847

5.4472	5.3416
4.2041	4.3439
6.6232	6.5919
4.2175	3.9619
3.8921	3.8326
6.5563	6.7213
3.7324	3.8842
3.6532	3.7205
5.0086	4.9708
5.1461	5.1950
5.6232	5.5799
6.0792	6.0228
4.3010	4.4362
4.5682	4.9363
5.7160	5.6218
4.3222	4.5224
3.5051	3.7463
4.5798	4.6517
4.5051	4.6517
5.1206	5.0736
5.3424	5.5176
4.5563	4.5224
4.3655	4.5294
5.8388	5.8158
4.2788	4.3930
3.8129	3.6428

4.3 CLASIFICACIÓN DE LA LECHE CRUDA RECIBIDA

La clasificación fue realizada con los conteos microbiológicos de aerobios totales y se realizó una separación de medias tukey.

Cuadro 9. Separación de medias de los proveedores.

Proveedor	Aerobios totales (Log UFC/ml) observado	Separación de medias tukey P > 0.05
Establo	3.74	A
G Barahona	4.63	AB
Casco	4.65	AB
R Barahona	4.87	AB
Maier	5.19	B
Montoya	5.34	B
JR Barahona	5.34	B
Vasquez	5.64	B
Agaza	5.67	B

*Proveedores seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

La separación de medias muestra la clasificación de los proveedores de acuerdo a la carga microbiana. En este caso se puede apreciar que la leche del establo de la escuela Agrícola Panamericana presenta el menor contenido microbiológico, a la vez muestra que no hay diferencias estadísticas entre el establo, G Barahona y Casco en ese momento, sin embargo el contenido bacteriano de la leche de todos los proveedores exceptuando el establo es estadísticamente igual.

Cuadro 10. Clasificación del grado de calidad

Proveedor	Log UFC/ml promedio	UFC/ml	Grado de calidad
Establo	3.74	6.9×10^3	A
G Barahona	4.63	5.3×10^4	A
Casco	4.65	5.4×10^4	A
R Barahona	4.87	9.1×10^4	A
Maier	5.19	1.2×10^5	A
Montoya	5.34	2.2×10^5	A
JR Barahona	5.34	2.3×10^5	A
Vasquez	5.64	4.5×10^5	B
Agaza	5.67	4.8×10^5	B

*Proveedores seguidos de diferente letra son significativamente diferentes.

Se muestra en el cuadro 8 los detalles de la clasificación de la leche analizada utilizando los parámetros detallados en el cuadro 4, Los resultados de esta clasificación resultan satisfactorios para la planta de industrias lácteas.

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una ecuación que predice el contenido de UFC/ml en la leche cruda con base en el tiempo de reducción de la prueba de azul de metileno expresado en horas. La ecuación obtenida es $y = 7.10292 - 0.51738(x)$.
- El uso de la ecuación desarrollada facilitará la clasificación de la calidad microbiológica de la planta de industrias lácteas en el recibo diario de la leche cruda.
- La leche cruda recibida en la planta de lácteos de Zamorano es 75% grado A y 25% grado B.

6. RECOMENDACIONES

- El análisis debe profundizarse con más toma de datos con el propósito de verificar si existen otras variables que afectan el modelo.
- Realizar la clasificación de la calidad microbiológica de la leche recibida en la planta utilizando la prueba de reducción del azul de metileno como control de la planta y retroalimentación con los proveedores.
- Capacitar a las personas que trabajen en el laboratorio de la planta de lácteos sobre la prueba y como realizarla para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos.

7. BIBLOGRAFÍA

Adamberg, K; Kask, S; Laht, T.; Paalme, T. 2003. International Journal of Food Microbiology 85, 171-183.

Adams, M; Hope, C. 1989. Rapid methods in food microbiology: progress in industrial microbiology. Edit. Elsevier publishing company. Holanda. v. 26. 204-217 p.

APHA technical committee on microbiological methods for food. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Edit Carl Vanderzant, Don F. Splittstoesser. 3 ed. Edit Edwads brothers inc. Estados Unidos. 1-48, 75-94, 837-853, 1093-1102 p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1997. Methods of Analysis of the AOAC International. 3 ed. Volumen II. Maryland USA.

Cottrino, V. Gaviria, B. Como se determina la calidad microbiológica de la leche. (en línea). Consultado el 20 de octubre 2004. disponible en: <http://lmvltda.com/programas>

Dairy science facts. 2002. Importance of raw milk quality and processed dairy products. (en línea). Edit Cornell University. Consultado el 17 de agosto 2005. Disponible en: <http://www.foodscience.cornell.edu>

Diliello, L. 1982. Methods in food and dairy microbiology: a laboratory training manual for quality control test. Edit The avi publishing company. Estados Unidos. 28-30, 67-68 p.

Enamorado, C. 2003. Evaluación microbiológica de la leche cruda recibida y de la línea de procesamiento de la leche fluida en bolsa al 2% de grasa en la planta de lácteos de Zamorano. Tesis Ing. Agroindustrial. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 3-6 p.

FAO. 1966. Higiene de la leche. Edit. Ginebra: Organización mundial de la salud. España. 5-29 p.

Foster, D. Doetsch, R. Nelson, F. Olson, J. Speck, M. 1957. Microbiología de la leche. Edit Herrero. S.A, México. 43-69 p.

Keating, P y Rodríguez, H. 2002. Introducción a la lactología. 2 ed. Editorial Limusa. Mexico. 12-35 p.

REVILLA, A. 2000. Tecnología de la leche. 3a. Ed. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras, Centro América. 37-67 p.

Rosell, J. Gomez, J. 1960. Manual de análisis lactológicos y fabricación de quesos y mantecas. Edit. Trofos. España. 45-78 p.

Walstra, et al. 2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Trad. Rosa María Oria. Edit Acribia S. A. España. 12-14, 151-163 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de los datos para obtener la ecuación.

The CORR Procedure

2 Variables: logUFC TRAM

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
logUFC	47	5.04377	1.51460	237.05700	2.77800	8.17200
TRAM	47	3.97996	2.78261	187.05800	0.10000	9.08000

Pearson Correlation Coefficients, N = 47
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	logUFC	TRAM
logUFC	1.00000 <.0001	-0.95053
TRAM	-0.95053 <.0001	1.00000

The REG Procedure

Model: MODEL1

Dependent Variable: logUFC

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	95.34230	95.34230	421.37	<.0001
Error	45	10.18209	0.22627		
Corrected Total	46	105.52439			

Root MSE	0.47568	R-Square	0.9035
Dependent Mean	5.04377	Adj R-Sq	0.9014
Coeff Var	9.43099		

Parameter Estimates

Variable	Parameter DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	7.10292	0.12197	58.23	<.0001
TRAM	1	-0.51738	0.02520	-20.53	<.0001

The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: logUFC

Output Statistics

Obs	Dep Var Predicted		Std Error		Std Error		Residual	Residual	
	LogUF	Value	Mean Predict	95% CL Mean	95% CL Predict	Residual			
1	3.1760	3.2402	0.1120	3.0147	3.4656	2.2559	4.2244	-0.0642	0.462
2	3.4150	3.3426	0.1081	3.1249	3.5603	2.3601	4.3251	0.0724	0.463
3	3.4470	3.4657	0.1036	3.2572	3.6743	2.4852	4.4462	-0.0187	0.464
4	3.4620	3.7037	0.0953	3.5118	3.8956	2.7266	4.6808	-0.2417	0.466
5	3.8330	3.7829	0.0927	3.5962	3.9695	2.8068	4.7590	0.0501	0.467
6	3.9140	3.9055	0.0888	3.7266	4.0844	2.9309	4.8801	0.008496	0.467
7	4.1140	4.5005	0.0743	4.3509	4.6501	3.5308	5.4702	-0.3865	0.470
8	4.2550	4.7747	0.0706	4.6325	4.9169	3.8061	5.7433	-0.5197	0.470
9	4.6530	4.5936	0.0728	4.4471	4.7402	3.6244	5.5628	0.0594	0.470
10	4.9400	4.9299	0.0696	4.7897	5.0701	3.9617	5.8982	0.0101	0.471
11	5.3220	5.1679	0.0696	5.0276	5.3082	4.1996	6.1362	0.1541	0.471
12	5.3800	5.4576	0.0723	5.3121	5.6032	4.4886	6.4267	-0.0776	0.470
13	5.4770	5.6387	0.0752	5.4873	5.7902	4.6688	6.6087	-0.1617	0.470
14	5.7990	6.5338	0.1004	6.3316	6.7361	5.5546	7.5130	-0.7348	0.465
15	5.9440	5.9078	0.0812	5.7443	6.0712	4.9359	6.8797	0.0362	0.469
16	5.8260	5.7267	0.0769	5.5717	5.8817	4.7562	6.6972	0.0993	0.469
17	6.2550	6.6994	0.1064	6.4851	6.9137	5.7176	7.6811	-0.4444	0.464
18	6.5310	6.9891	0.1175	6.7525	7.2257	6.0023	7.9759	-0.4581	0.461
19	7.1140	6.9994	0.1179	6.7621	7.2368	6.0124	7.9865	0.1146	0.461
20	3.0020	2.4051	0.1461	2.1109	2.6993	1.4029	3.4073	0.5969	0.453
21	2.7780	2.4465	0.1443	2.1558	2.7371	1.4453	3.4477	0.3315	0.453
22	3.6580	2.7466	0.1317	2.4814	3.0118	1.7525	3.7407	0.9114	0.457
23	3.4810	2.9639	0.1228	2.7165	3.2112	1.9744	3.9533	0.5171	0.460
24	3.4150	3.1605	0.1150	2.9288	3.3922	2.1748	4.1462	0.2545	0.462
25	3.5560	3.5951	0.0990	3.3957	3.7944	2.6165	4.5737	-0.0391	0.465
26	4.6330	4.2573	0.0793	4.0977	4.4170	3.2861	5.2286	0.3757	0.469
27	4.4770	4.8523	0.0700	4.7113	4.9933	3.8839	5.8207	-0.3753	0.470

28	5.4910	5.4835	0.0726	5.3373	5.6298	4.5144	6.4527	0.007482	0.470
29	5.5310	5.8716	0.0803	5.7099	6.0332	4.9000	6.8432	-0.3406	0.469
30	5.8840	6.5235	0.1001	6.3219	6.7250	5.5444	7.5025	-0.6395	0.465
31	6.1520	6.8442	0.1118	6.6190	7.0695	5.8600	7.8284	-0.6922	0.462
32	7.0570	6.8546	0.1122	6.6285	7.0806	5.8702	7.8389	0.2024	0.462
33	7.2170	6.8960	0.1138	6.6667	7.1252	5.9109	7.8811	0.3210	0.462
34	7.6070	6.9063	0.1142	6.6763	7.1364	5.9210	7.8916	0.7007	0.462
35	8.1720	6.9736	0.1168	6.7382	7.2089	5.9870	7.9601	1.1984	0.461
36	2.7960	3.8434	0.0907	3.6607	4.0262	2.8681	4.8188	-1.0474	0.467
37	2.9160	3.8346	0.0910	3.6513	4.0179	2.8592	4.8101	-0.9186	0.467
38	3.8540	3.8952	0.0891	3.7156	4.0747	2.9204	4.8699	-0.0412	0.467
39	4.1960	4.1797	0.0812	4.0163	4.3432	3.2078	5.1516	0.0163	0.469
40	4.1690	4.5419	0.0736	4.3937	4.6901	3.5724	5.5113	-0.3729	0.470
41	4.2990	4.8782	0.0699	4.7375	5.0189	3.9098	5.8465	-0.5792	0.471
42	5.4270	5.1731	0.0697	5.0328	5.3134	4.2048	6.1414	0.2539	0.471
43	5.7960	5.7577	0.0776	5.6014	5.9141	4.7870	6.7285	0.0383	0.469
44	6.5500	6.5028	0.0993	6.3027	6.7028	5.5240	7.4815	0.0472	0.465
45	6.6020	6.2234	0.0901	6.0419	6.4048	5.2483	7.1985	0.3786	0.467

Anexo 2. Resultados de los análisis para la verificación.

Proveedor	Siembras microbiológicas aerobios totales (UFC/ml)	Tiempo de reducción (Horas)	Aerobios totales pronosticados (Log UFC/ml)	Aerobios totales (UFC/ml) pronosticado
R Barahona	80x10 ²	5.666	4.177816	15060
Montoya	62x10 ³	4.25	4.910427	81271
JR Barahona	28x10 ⁴	3.25	5.427807	267350
Agaza	66 x10 ³	4.333	4.867484	78703
Maier	74 x10 ⁴	2.4333	5.850351	708519
Casco	128 x10 ³	3.8	5.143248	139075
Vasquez	118 x10 ³	3.9666	5.057052	114039
G Barahona	101 x10 ³	4.2	4.936296	86356
R Barahona	240 x10 ³	3	5.557152	360705
Montoya	125 x10 ⁴	1.8833	6.134910	1364269
JR Barahona	57 x10 ⁴	2.423	5.855680	717266
Agaza	104 x10 ⁴	2.333	5.902244	794328
Maier	52 x10 ⁴	3.3333	5.384709	239883
Casco	151 x10 ³	3.67	5.210507	162181
Vasquez	46 x10 ⁴	2.8333	5.643399	436516
G Barahona	105 x10 ³	4	5.039772	109396
R Barahona	118 x10 ³	4.0333	5.022543	105293
Montoya	114 x10 ⁴	2.1667	5.988284	972747
JR Barahona	84 x10 ⁴	2.4167	5.858939	722670
Agaza	139 x10 ³	3.6667	5.212214	162181
Maier	34 x10 ⁵	1.1667	6.505664	3162278
Casco	62 x10 ³	4.5333	4.763853	57544
Vasquez	112 x10 ³	3.86667	5.108754	125893
G Barahona	28 x10 ⁴	2.9667	5.574380	371535
R Barahona	189 x10 ³	3.33	5.384692	239883
Montoya	28 x10 ⁴	3.42	5.341577	219572
JR Barahona	160 x10 ²	5.35	4.343895	21878
Agaza	42 x10 ⁵	1.00	6.591912	3890451
Maier	165 x10 ²	6.08	3.961897	9120
Casco	78 x10 ²	6.33	3.832552	6761
Vasquez	36 x10 ⁵	0.75	6.721257	5248075
G Barahona	54 x10 ²	6.23	3.884232	7586
R Barahona	102 x10 ³	4.13	4.970788	93325
Montoya	140 x10 ³	3.7	5.194986	154882
JR Barahona	42 x10 ³	2.96	5.579916	379315
Agaza	120 x10 ⁴	2.10	6.022794	1053659

Maier	200×10^2	5.17	4.436162	27290
Casco	37×10^3	4.20	4.936296	86298
Vasquez	52×10^4	2.88	5.621824	418601
G Barahona	210×10^2	5.00	4.522392	33296
R Barahona	38×10^3	4.75	4.651737	44668
Montoya	32×10^3	4.75	4.651737	44668
JR Barahona	132×10^3	3.93	5.073629	45193
Agaza	220×10^3	3.08	5.517572	328852
Maier	36×10^3	5.00	4.522392	33113
Casco	232×10^2	4.99	4.529376	33806
Vasquez	69×10^4	2.50	5.815842	653131
G Barahona	190×10^2	5.25	4.393047	24547

Anexo 3. Análisis estadístico de las verificaciones.

The TTEST Procedure

Statistics

Variable	N	Lower CL		Upper CL		Lower CL		Upper CL		Minimum	Maximum
		Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev	Std Dev	Std Err			
dif	52	-0.067	-0.032	0.0035	0.1062	0.1267	0.1572	0.0176	-0.368	0.3313	

T-Tests

Variable	DF	t Value	Pr > t
dif	51	-1.81	0.0768

Anexo 4. Análisis estadístico para la clasificación de la leche

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
proveedor	9	Agaza Casco Establo GBarahon JRBaraho Maier Montoya RBarahon Vasquez

Number of observations 54

The GLM Procedure

Dependent Variable: LogUFC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	15.92697377	1.99087172	5.33	<.0001
Error	45	16.81155166	0.37359004		
Corrected Total	53	32.73852543			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LogUFC Mean
0.486490	12.10444	0.611220	5.049554

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
provedor	8	15.92697377	1.99087172	5.33	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
provedor	8	15.92697377	1.99087172	5.33	<.0001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LogUFC

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	45
Error Mean Square	0.37359
Critical Value of Studentized Range	4.60630
Minimum Significant Difference	1.1494

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	proveedor
A	5.6857	6	Agaza
A			
A	5.6614	6	Vasquez
A			
A	5.3703	6	Montoya
A			
A	5.3566	6	JRBaraho
A			
A	5.1102	6	Maier
A			
B A	4.9608	6	RBarahon
B A			
B A	4.7360	6	Casco
B A			
B A	4.7250	6	GBarahon
B			
B	3.8400	6	Establo