

CALIDAD HIGIENICA DEL AGUA Y SU RELACION CON EL CONTENIDO MICROBIANO DE LA LECHE¹

Hygienic quality of water and its relationship with milk bacterial content

Hernán Agüero E.², Carlos Pedraza G.³ y Selfa Godoy O.⁴

SUMMARY

In 10 dairy farms of the Region Metropolitana (Chile), samples of the water used to sanitize the milking equipment were collected at the same time with milk samples, that were kept for 48 hr at 4° C, simulating the process that takes place in a cooling tank. Methylene blue reduction test (MBRT), total bacterial (TBC), psychrotrophics (PC) and coliforms (CC) counts were determined in the milk samples; the same analysis were practiced in the water samples, with exception of MBRT. Correlation analysis between bacteriological variables in milk and water samples were made; also, milk samples were stratified, according to the water sanitary quality levels (good and poor), performing a t test for each of the variables.

Average water counts were 13,834/ml (TBC), 1,816/ml (PC) and 5,239/100 ml (CC); using different standards, the levels of hygienic acceptable samples fluctuated between 16.6 – 86.7, 36.7 – 80.0, and 0 – 50% for TBC, PC and CC, respectively. A significant relationship was obtained only between water PC and milk TBC ($r = 0.275$; $P \leq 0.001$); the milk bacterial content/ml and MBRT (hr) corresponding to poor and good water sanitary qualities were; TBC: 56,742a and 38,020a; PC: 27,178a and 43,208a; CC: 1,123a and 1,133a; MBRT: 6.19a and 6.41b ($P \leq 0.05$). Water did not fulfill the quality requirements for use in sanitizing milking equipments; in spite of this fact, it was not possible to isolate its effect on milk bacteriological quality.

INTRODUCCION

A raíz de la aplicación del Decreto N° 271 del Ministerio de Agricultura, que fija el sistema de control y clasificación de la leche según su calidad, en los últimos años se ha observado un mejoramiento notable de la calidad bacteriológica de la leche cruda en el país. En ello han incidido diversos factores, apreciándose de parte de los productores interés por mejorar los múltiples aspectos involucrados en la obtención de leche de buena calidad (Haverbeck, 1982). Sin embargo, un elemento que genera incertidumbre en el

mejoramiento de la calidad bacteriológica de la leche, es la calidad higiénica del agua. Antecedentes obtenidos en la Región Metropolitana, revelan un elevado contenido de bacterias totales y coliformes en el agua de las lecherías, lo que contribuiría a reducir la eficiencia de los procesos de higienización de los equipos de ordeña y, eventualmente, a incrementar el contenido microbiano de la leche (Pedraza, 1980). Además, el agua es considerada como una de las principales fuentes de microorganismos psicrotóxicos de la leche cruda, los cuales son importantes por sus implicancias tecnológicas, puesto que están estrechamente asociados a la capacidad de conservación de la leche y productos lácteos, debido fundamentalmente a sus acciones proteolíticas y lipolíticas, especialmente a través de enzimas termoestables, responsables de una gama de alteraciones en el sabor y olor de dichos productos (Cousin, 1982).

De lo anterior se desprende la necesidad de estudiar el problema que plantean las fuentes de agua de las le-

¹ Recepción de originales: 25 de marzo de 1986.

² Facultad de Ciencias Veterinarias, U. de Chile, Casilla 2, Correo 15, La Pintana, Santiago, Chile.

³ Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

⁴ Parte de los requisitos para postular al título de Médico Veterinario, U. de Chile.

cherías, ya que las posibilidades de lograr un mejoramiento de la calidad bacteriológica de la leche se venían limitadas desde el comienzo. Basta destacar que, generalmente, se practica un enjuague final de los equipos y utensilios de ordeña, sólo con agua, pudiendo quedar por esta razón cargas bacterianas elevadas adheridas a las paredes de éstos, las que serán arrastradas por la leche en la ordeña siguiente (Pedraza, 1980). Bockelmann (1981) encontró que el crecimiento de bacterias psicotróficas, en aguas residuales de los estanques de almacenamiento de leche, contribuye marcadamente a la contaminación cuantitativa de la leche y, como están en crecimiento activo, es probable que reduzcan la calidad y procesabilidad de la leche almacenada. Las aguas residuales pueden contener 10^7 microorganismos/lit, con una gran proporción de psicótrofos, lo que enfatiza la importancia de un buen drenaje de los equipos de ordeña (IDF, 1981).

El problema que lo anterior plantea, aparte de las consecuencias tecnológicas indicadas, es que los productores y la industria pueden tener una falsa sensación de seguridad, en relación a la calidad microbiológica de la leche, evaluada a través de la prueba de reducción del azul de metileno (TRAM), puesto que la flora psicotrófica de la leche presenta un bajo poder reductor del azul de metileno (Cousin, 1982).

Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar la calidad bacteriológica de las fuentes de agua de lecherías e investigar su relación con la calidad bacteriológica de la leche.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó basado en muestras de leche y de agua obtenidas en 10 lecherías de la Región Metropolitana, entre abril y agosto de 1983, ambos meses inclusive. Estas se seleccionaron a partir de un listado de proveedores de SOPROLE S.A., que incluía sólo predios con estanque enfriador y un sistema similar de higienización del equipo de ordeña.

En cada lechería se practicó, en tres oportunidades sucesivas y con una frecuencia mensual, muestreos coincidentes de agua y leche. Las muestras de agua correspondieron a la destinada al lavado e higienización de los equipos de ordeña mecánica y estanques enfriadores, las que se almacenaron en frascos estériles, enfriados inmediatamente a 5° C, y se mantuvieron en estas condiciones hasta su entrega al laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile. Las muestras de leche se obtuvieron desde el estanque enfriador, una vez terminada la ordeña y descendida la temperatura a 5° C, almacenándose en frascos higienizados y enfriados, hasta su recepción en el Laboratorio Central de SOPROLE S.A.,

donde se mantuvieron en cámara fría, a una temperatura de 4° C durante 2 días, con el objeto de simular lo que ocurre con la calidad bacteriológica de leche almacenada en estanques prediales, a medida que transcurre el tiempo hasta el momento de su recolección.

En la leche se determinó recuento de bacterias totales (RBT) psicotróficas (RP), coliformes (RC) y tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM), a las 0, 24 y 48 hr de almacenamiento refrigerado. Con excepción del TRAM, en las muestras de agua se efectuaron las mismas determinaciones, pero en forma única (sin considerar el factor tiempo). Todas las determinaciones, tanto en agua como en leche, se hicieron en duplicado y se trabajó con los promedios.

En las muestras de agua y de leche, los RBT se realizaron mediante el método estándar de recuento en placa con incubación por 48 hr a 32° C, y los RP, según el método estándar de recuento en placa con incubación durante 10 días a 6° C. Para el RC en el agua, se usó el método del NMP (número más probable), en medio de cultivo líquido (caldo lactosado bilis 2% verde brillante) e incubación a 35° C por 48 hr, en tanto que en leche, se empleó el recuento en placa con agar bilis rojo violeta e incubación por 24 hr a 32° C (Magariños, 1978). El TRAM se realizó con leche incubada a 36° C, correspondiendo la ejecución e interpretación de esta prueba a la descrita por Magariños (1978).

El análisis de resultados incluyó la descripción estadística de los recuentos bacterianos del agua, calculándose el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), y la caracterización de su calidad higiénica, basada en normas y recomendaciones bibliográficas. La relación entre las variables de calidad bacteriológica del agua y de la leche, se analizó mediante regresión y correlación simples; además, las muestras de leche se clasificaron en dos grupos, según el contenido bacteriano de las muestras de agua correspondientes (buena y mala calidad higiénica), realizándose pruebas de t, para cada una de las variables de interés en la leche (Sokal y Rohlf, 1969).

RESULTADOS Y DISCUSION

Calidad higiénica del agua

Los RBT, RP y RC de las muestras de agua, alcanzaron los promedios señalados en el Cuadro 1, observándose una amplia variación en la calidad higiénica del agua, como lo demuestran los CV y los rangos en los tres tipos de recuentos.

CUADRO 1. Recuentos bacterianos de las fuentes de agua de 10 lecherías de la Región Metropolitana

TABLE 1. Bacterial counts of the water supply in 10 dairy farms of the Region Metropolitana (Chile)

	Recuento Bacteriano/total/ml	Recuento de Psicrótrofos/ml	Recuento de Coliformes/100 ml
\bar{X}	13.834	1.816	5.239
S	44.656	5.451	19.974
CV	323 %	300 %	381 %
Rango	10-230.000	1-29.000	3-110.000

La carga bacteriana total del agua se compara desfavorablemente con los resultados encontrados por Pedraza (1980), que indica un promedio de 1.145 colonias/ml, para muestras obtenidas, también, en lecherías de la Región Metropolitana. Por otra parte, el promedio de los RBT está por debajo del calculado a partir de los datos informados por Morse y otros (1968a), para 27 predios lecheros de Canadá, del orden de las 40.000 bacterias/ml. Sin embargo, al incluir un mayor número de observaciones, el RBT, correspondiente a 48 predios distribuidos en tres regiones de Canadá (Edmonton, Winnipeg y Guelph), fue de 3.000, 1.200 y 140/ml, respectivamente (Morse y otros, 1968b).

El RP promedio en el agua es superior a los obtenidos por Morse y otros (1968b), quienes informan valores de 10, 300 y 560 psicrótrofos/ml, para muestras de agua utilizada en el lavado de equipos de ordeña en Edmonton, Winnipeg y Guelph, respectivamente. Cousin (1982) indica que en el agua de lecherías se han encontrado RP $\geq 10^7$ /ml, especialmente en agua que es cambiada o clorinada infrecuentemente. En cambio, las aguas tratadas pueden tener RP relativamente bajos, comprobándose en aguas clorinadas casos con 100 psicrótrofos/ml.

Al igual que para los otros tipos de recuentos, los resultados presentados en el Cuadro 1 revelan una calidad higiénica inferior del agua, en términos de su contenido de microorganismos coliformes, en comparación a lo informado en la literatura. Por ejemplo, Pedraza (1980) comunica un promedio de 1.300 bacterias coliformes/100 ml de agua, para lecherías de la Región Metropolitana.

A continuación se cotejan los recuentos bacterianos de las muestras de agua con normas y recomendaciones bibliográficas, a objeto de visualizar mejor la condición bacteriológica del agua destinada a la higienización de los equipos lecheros.

Utilizando el estándar de no más de 20 bacterias totales/ml, recomendado para el agua de predios lecheros de Vermont, Morse y otros (1968b) comprobaron

que menos del 17% de los predios satisfacían dicha norma. Al aplicar el mismo criterio al presente trabajo, un 16,6% de las muestras podría considerarse aceptable, en cuanto a su contenido bacteriano total. De acuerdo a Medina y Kaempffer (1978), el RBT debería ser menor a 100 colonias/ml, lo que se cumple en un 33,3% de las muestras analizadas; dicho valor es similar al informado por Novello (1973), el cual comprobó recuentos totales inferiores a 100 bacterias/ml en un 46,30 y un 30,56% de las muestras de agua, tomadas en dos puntos de las fuentes de agua de predios e industrias lecheras. Si se disminuye el grado de exigencia y se califican las muestras de agua del presente estudio, según el criterio empleado por Morse y otros (1968b), en buenas ($< 10^4$ colonias/ml) y malas ($\geq 10^4$ colonias/ml), un 86,7% de ellas quedarían incluidas en la primera categoría y el 13,3% de deficiente calidad higiénica.

Para determinar la proporción de muestras de agua higiénicamente aceptables, según su contenido de microorganismos psicrótróficos, se compatibilizó la información proporcionada por diversos autores (Thomas, 1958; Morse y otros, 1968b; Cousin, 1982). En base a ello, las fuentes de agua podrían calificarse como adecuadas en un 36,7 u 80,0% de las observaciones, al considerar $< 10^2$ ó $< 10^3$ psicrótrofos/ml, respectivamente.

Con respecto al contenido de coliformes en el agua, cabe destacar que en ninguna de las lecherías incluidas en este trabajo se obtuvo un recuento inferior a 2 colonias/100 ml, como lo establecen Medina y Kaempffer (1978). Empleando como referencia la Norma Chilena para fuentes de abastecimiento y obras de captación de aguas, la cual indica que éstas se califican como buenas cuando su recuento promedio mensual es ≤ 100 coliformes/100 ml (Chile-INN, 1971), la proporción de muestras que se ajusta a dicha norma alcanza a un 50%.

De la discusión anterior se desprende que, en general, los diferentes tipos de recuento bacteriano en el agua son semejantes o más altos que los informados en

otras investigaciones. Ello se traduce en niveles de contaminación más elevados que los establecidos en diferentes normas y recomendaciones, razón por la cual las fuentes de agua de las lecherías podrían calificarse globalmente como insatisfactorias, en cuanto a su calidad higiénica. Sin embargo, considerando individualmente las lecherías, la situación es extremadamente variable, contrastando aquéllas que cuentan con fuentes de agua de excelente calidad, con otras donde ésta es francamente deficiente.

Dependiendo de los valores de referencia utilizados, la proporción de muestras de agua higiénicamente aceptables, según los RBT, RP y RC, fluctúa entre 16,6–86,7; 36,7–80,0 y 0–50,00/o, respectivamente.

El alto grado de contaminación bacteriana detectado en el agua, estuvo dentro de lo previsible, puesto que un estudio realizado en la misma zona, ya había suministrado evidencia en ese sentido, pero no se esperaba encontrar promedios tan elevados, ya que las lecherías incluidas en la investigación están entre las mejores de la región, tanto en su manejo general como en lo referente a obtención y almacenamiento de la leche. Ello indicaría que, aun en este tipo de predios, se debe prestar más atención a la calidad bacteriológica de las fuentes de agua de los locales de ordeña, siendo recomendable la ejecución de estudios adicionales, destinados a determinar las causas de los recuentos elevados, en aquéllos que exhiben una situación deficiente.

Relación entre la calidad bacteriológica de la leche y la calidad higiénica del agua

Con excepción de la relación observada entre el RP del agua y el RBT de la leche ($r = 0,275$; $P \leq 0,001$), no hubo asociación entre las variables de calidad bacteriológica del agua y de la leche. Aun cuando la relación indicada resultó estadísticamente significativa, su coeficiente de determinación es demasiado bajo

(0,076), para indicar asociación entre el RP del agua y el RBT de la leche. Tampoco se registraron diferencias entre los recuentos bacterianos de leches, correspondientes a muestras de agua calificadas como de buena y mala calidad higiénica, en base a los tres tipos de recuentos; en cuanto al TRAM, si bien la diferencia es de escasa magnitud, las leches correspondientes a las muestras de agua de mala calidad higiénica, exhiben un promedio significativamente menor, en comparación al registrado cuando el agua es calificada como de buena calidad higiénica (Cuadro 2).

Los resultados de este trabajo difieren un tanto de los encontrados por Morse y otros (1968b), quienes estudiando 48 predios en Canadá, indican que a primera vista parecía plausible asociar la respuesta del RBT de la leche a la pre-incubación, con RP generalmente altos en el agua. Sin embargo, ello ocurriría sólo en una de las tres regiones investigadas por dichos autores, en tanto que en las otras dos hubo una dispersión considerable de los RP del agua, que no permitió evidenciar su relación con el RBT de la leche.

En un trabajo anterior, que comprendía sólo 27 predios, estos mismos autores comprobaron que dos de las tres lecherías con los menores RBT en la leche, correspondían a muestras de agua con RBT muy bajo ($< 100/\text{ml}$) y sugieren que la contaminación del agua podría estar asociada con la de la leche (Morse y otros, 1968a). Al incluir en el análisis los 48 predios, hubo cierta evidencia de una relación positiva del recuento bacteriano de la leche con el recuento bacteriano total de las muestras de agua. Dicha relación no fue aparente en los predios de Winnipeg ni en los de Guelph, mientras que en los de Edmonton se comprobó, con bastante claridad, mediante el aumento del recuento total después de someter la leche a pre-incubación. Para recuentos totales en agua $< 10.000/\text{ml}$, el incremento promedio en contenido de bacterias totales de la leche correspondió a un factor de 1,4; en cambio, cuando el recuento total del agua era $\geq 10.000/\text{ml}$,

CUADRO 2. Promedios de recuentos bacterianos y tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM), en leche correspondiente a dos estratos de calidad higiénica de agua

TABLE 2. Average bacterial counts and methylene blue reduction test (MBRT) in milk, according to two water hygienic quality levels

Calidad del agua	Recuentos bacterianos en la leche (colonias/ml)			TRAM (hr)
	Coliformes	Totales	Psicotróficos	
Buenas	1.133 a	38.020 a	43.208 a	6,41 b
Malas	1.123 a	56.742 a	27.178 a	6,19 a

Buenas: Recuentos de bacterias coliformes, totales y psicotróficas $\leq 100/100 \text{ ml}$, $\leq 100/\text{ml}$ y $\leq 300/\text{ml}$, respectivamente.

Malas: Valores mayores a los indicados en uno o más tipos de recuentos bacterianos.

a, b: Letras distintas en columnas indican promedios estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

el promedio de aumento del número de bacterias totales de la leche fue 4 veces (Morse y otros, 1968b). Analizando globalmente los resultados, estos autores concluyen que la evidencia combinada de las regiones incluidas en su investigación no permitiría establecer una relación simple entre el contenido bacteriano de la leche y el recuento de psicrótrofos del agua, pero favorecería alguna relación con el recuento bacteriano total de las fuentes de agua de las lecherías.

En general, los resultados obtenidos en el presente trabajo no permiten evidenciar una relación que demuestre claramente una contribución de la carga bacteriana del agua al contenido microbiano de la leche. Esto podría obedecer a varias razones, entre las cuales probablemente la más importante es la multiplicidad de factores que inciden sobre el número y tipo de bacterias presentes en la leche, lo que dificulta el aislamiento de un eventual efecto de la calidad higiénica del agua. A ello pudo haber contribuido, también,

la gran dispersión observada en los valores de recuento bacteriano del agua.

Otros factores que pudieron haber influido, son el menor número de lecherías incluidas en este estudio, en comparación a investigaciones de índole similar y el hecho de haber muestreado predios semejantes, en cuanto a nivel tecnológico e higiénico del proceso de obtención y almacenamiento de la leche. Así, Salmi y Ojala (1971) necesitaron investigar 2.484 predios en Finlandia, para describir una relación negativa entre la calidad de la leche, estimada mediante una prueba de reducción de colorantes, y la calidad de las fuentes de agua, evaluada en base al recuento de coliformes y *Streptococcus faecalis*. Dichos autores comprobaron que las fuentes de agua de los predios que producían leche clase A, tenían proporcionalmente más muestras con bajo número de bacterias indicadoras de la calidad, en comparación a aquéllos donde la prueba de reducción indicaba defectos.

RESUMEN

En 10 predios de la Región Metropolitana (Chile), se muestreó en 3 oportunidades el agua destinada a higienizar el equipo de ordeña, obteniéndose simultáneamente muestras de leche, que se almacenaron 48 hr a 4° C, simulando un estanque enfriador. En leche, se determinó recuentos de bacterias totales (RBT), psicrotróficas (RP), coliformes (RC) y tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM), practicándose en agua las mismas determinaciones, excepto TRAM. Se correlacionó las variables bacteriológicas del agua con las de la leche; además, las muestras de leche se agruparon según la calidad higiénica del agua (buena o mala), para analizar cada variable mediante pruebas de t.

Los promedios de RBT, RP y RC en el agua fueron 13.834/ml, 1.816/ml y 5.239/100 ml, respectivamente; las muestras higiénicamente aceptables fluctuaron, según diferentes estándares, entre 16,6–86,7; 36,7–80,0 y 0–50,00/o. Sólo se observó relación entre RP de agua y RBT de leche ($r = 0,275$; $P \leq 0,001$); el contenido bacteriano/ml y TRAM (hr) de leche correspondiente a agua de mala y buena calidad higiénica fueron, respectivamente; RBT: 56.742a y 38.020a; RP: 27.178a y 43.208a; RC: 1.123a y 1.133a; TRAM: 6,19a y 6,41b ($P \leq 0,05$). En general, el agua no reunió requisitos para ser usada en higienización de equipos lecheros, pero no pudo evidenciarse claramente su efecto sobre la calidad bacteriológica de la leche.

LITERATURA CITADA

- BOCKELMANN, I. VON. 1981. Contamination — Importance of water residues in milking equipment. En: Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk. FIL—IDF. Kiel, 8—10 Sept. p.:325—327.
- COUSIN, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Food Prot.* 45 (2): 172—207.
- HAYERBECK, J. 1982. Evolución de la calidad higiénica de la leche cruda, medida a través del tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM). En: VI Seminario Nacional de Análisis de la Industria Lechera. Valdivia, Centro Tecnológico de la Leche, U. Austral de Chile. 3 p. (mimeografiado).
- IDF—International Dairy Federation. 1981. Summary reports and conclusions. En: Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk. FIL—IDF. Kiel, 8—10 Sept. p.: 178—185.
- INN—Instituto Nacional de Normalización. 1971. Agua potable, fuentes de abastecimiento y obras de captación. Terminología, clasificación y requisitos generales. Norma Chilena NCH 777, Of. 71.
- MAGARIÑOS, H. 1978. Análisis microbiológico de leche y productos lácteos. Manual Práctico. Valdivia, Centro Tecnológico de la Leche, U. Austral de Chile. 243 p.
- MEDINA, E. y KAEMPFER, A.M. 1978. Elementos de salud pública. 3 ed. Santiago, Editorial Andrés Bello. 414 p.
- MORSE, P. M.; JACKSON, H.; McNAUGHTON, C. H.; LEGGATT, A.G., LANDERKIN, G.B. and JOHNS, C.K. 1968a. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. II. Bacteria in milk from individual cows. *J. Dairy Sci.* 51 (8): 1188—1191.
- MORSE, P. M.; JACKSON, H.; McNAUGHTON, C. H.; LEGGATT, A.G.; LANDERKIN, G.B. and JOHNS, C.K. 1968b. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. III. Increase in count, from cow to bulk tank, and effects of refrigerated storage and preliminary incubation. *J. Dairy Sci.* 51 (8): 1192—1206.
- NOVELLO, J.C. 1973. Aspects of the bacteriological condition of water on dairy farms. *Dairy Sci. Abs.* 35 (9): 3604.
- PEDRAZA, C. 1980. Calidad química y bacteriológica del agua en lecherías. Un problema por solucionar. IPA—La Platin (Chile) N° 2: 38—39.
- SALMI, T.J. and OJALA, O. 1971. A survey of the water sources on dairy farms: the bacteriological quality of water samples from these water sources concerning numbers of coliform bacteria and faecal streptococci. *Dairy Sci. Abs.* 33 (2): 986.
- SOKAL, R.R. and ROHLF, F.J. 1969. Biometry, the principles and practices of statistics in biological research. San Francisco, W.H. Freeman. 776 p.
- THOMAS, S.B. 1958. Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part I. *Dairy Sci. Abs.* 20 (5): 355—370.