

EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO REFRIGERADO SOBRE LA CALIDAD BACTERIOLOGICA DE LA LECHE¹

Effect of time of cool storage on bacteriological quality of milk

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

SUMMARY

Three milk samples were obtained in a monthly scheme, in 10 selected upper level dairy farms, from the Region Metropolitana (Chile). Milk samples were collected, at the end of the first milking, when received in the tank, keeping them in flasks and afterwards held for 48 hr at 4° C, simulating a cooling tank; methylene blue reduction test (MBRT; hr), total bacterial (TBC), psychrotrophic (PC) and coliform (CC) counts/ml were determined, at time 0, 24 and 48 hr, in each sample. The differences between milk bacteriological quality variables due to storage time were analysed through ANOVA, in a complete random pattern.

The average results were: TBC: 36,750 b, 38,983 ab, and 79,516 a ($P \leq 0.05$); PC: 2,975 c, 6,905 b, and 84,480 a ($P \leq 0.05$); CC: 1,073 a, 1,157 a, and 1,369 a; MBRT: 6.32 a, 6.32 a, and 6.13 a. Considering different standards of bacteriological quality, milk stored for two days was appropriate in 68.9–100; 30–73.3; 10–36.6; and 23.3–33.3% of the samples, according to MBRT, TBC, PC and CC, respectively.

Consequently, milk collection every other day would be severely restrained because of strong PC development during the last 24 hr of storage and, to a less extent, because of TBC; although CC was numerically constant, it would also limit collection every other day, due to the high initial contamination by these microorganisms. Furthermore, these results would show a remarkable overestimation of the bacteriological quality in refrigerated milk, as MBRT is the official test used in Chile to classify raw milk.

INTRODUCCION

Los registros de calidad de leche recepcionada por las plantas lecheras en los períodos 1978/79 y 1980/81, denotan un franco mejoramiento de la condición microbiológica, con respecto a los resultados de investigaciones realizadas por el Centro Tecnológico de la Leche, durante los años 1974–1977 (Baer y Bidegain, 1975; Baer y Vial, 1976). El progreso alcanzado queda de manifiesto con los valores de los análisis del

tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM), para 14.374 muestras provenientes de seis distritos lecheros del país, de las cuales 66,6% fueron clasificadas en categorías A, según el Decreto N° 27 (Chile, M. de A., 1979). En este sentido, ha jugado un papel determinante la adopción de los estanques de refrigeración de leche, por los grandes productores (150.000 lt/año), estimándose que actualmente alrededor de un 40% de la leche recibida por las plantas, es refrigerada a nivel predial (Haverbeck, 1982).

¹ Recepción de originales: 25 de marzo de 1986.

² Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

³ Facultad de Ciencias Veterinarias, U. de Chile, Casilla 2, Correo 15, La Pintana, Santiago, Chile.

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

Pese al avance señalado, la condición microbiológica de la leche cruda nacional se alejaría aún bastante de los criterios exigidos universalmente para una leche de buena calidad (Haverbeck, 1982). Además, debe tenerse presente que la mayor parte de los antecedentes disponibles en el país han sido obtenidos mediante la

aplicación del TRAM, como método oficial de clasificación de las leches destinadas a procesamiento industrial, o como prueba base de las investigaciones sobre calidad bacteriológica de leche. Al igual que otras pruebas de reducción de colorantes, los resultados del TRAM no pueden ser interpretados en términos del número de bacterias, sino que sólo sirven como índice de las cargas microbianas y son dependientes de las tasas metabólicas de los microorganismos (Cousin, 1982).

Por otra parte, dado que el tipo de bacterias puede ser tan o más importante que la cantidad total, un adecuado control microbiológico de la leche involucra mucho más que la mantención del número total de bacterias dentro de ciertos límites. Por ello, además del recuento bacteriano total, se deben emplear otros métodos de evaluación de la calidad bacteriológica de la leche cruda, los cuales incluyen el recuento de coliformes y la determinación de microorganismos psicrótróficos (Olson, 1962; Thomas y Beckley, 1967; Lück, 1972).

Si bien el almacenamiento refrigerado mejora la capacidad de conservación de la leche, al reducir la multiplicación y actividad bacteriana, los microorganismos psicrótróficos pueden mantenerse activos y proliferar a 7° C o menos, llegando eventualmente a experimentar un alza notable. Se ha comprobado que la contaminación por psicrótrofos y la capacidad de conservación de la leche y productos lácteos están íntimamente relacionados, principalmente por el desarrollo de una serie de alteraciones en el sabor y olor, resultantes de la actividad lipolítica y proteolítica de estos microorganismos, por acción de enzimas que resisten las temperaturas de pasteurización (Cousin, 1982).

Debido a que los microorganismos psicrótróficos exhiben, en general, un bajo poder reductor del azul de metileno, es posible que la introducción al país de los estanques prediales haya contribuido a enmascarar la situación microbiológica de la leche refrigerada, evaluada a través de la prueba de TRAM. Además, en leche refrigerada, la relación entre el TRAM y otros tipos de recuentos bacterianos, suele ser relativamente baja (Lück, 1972).

Se programó, entonces, este estudio, con los objetivos de caracterizar la calidad bacteriológica de leche almacenada a temperatura de refrigeración durante 48 hr y analizar la evolución que experimenta el contenido microbiano y el TRAM, por efecto del tiempo de almacenamiento.

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron 10 predios lecheros con estanque enfriador y un esquema similar de higienización del equipo de ordeña, correspondientes al estrato de mejor nivel general de infraestructura y manejo de las lecherías de la Región Metropolitana, proveedores de SOPROLE S.A. Estos se visitaron tres veces (c/30 días), entre abril y agosto de 1983 inclusive, obteniéndose muestras de leche del estanque enfriador, una vez finalizada la ordeña y descendida la temperatura a 5° C. Las muestras se tomaron en frascos higienizados, los que se mantuvieron enfriados hasta su recepción en el Laboratorio Central de SOPROLE S.A., donde se conservaron a una temperatura de 4° C durante 2 días, practicándose recuentos de bacterias totales, psicrótróficas, coliformes y TRAM, a las 0, 24 y 48 hr de almacenamiento.

Con ello, se intentó simular las condiciones de almacenamiento refrigerado en estanques prediales, con el objeto de estudiar el efecto del tiempo comprendido entre la ordeña y la recolección, sobre la calidad bacteriológica. Si bien la higienización o contaminación que experimentan los estanques prediales son elementos no reproducibles en un estudio de este tipo, al igual que las fluctuaciones térmicas que ocurren por la adición de leche provenientes de ordeñas sucesivas y las variaciones del contenido bacteriano de la leche de estas ordeñas, dentro de un rango de condiciones, los factores mencionados tendrían sólo un efecto leve y no significativo, sobre el contenido microbiano de la leche al término del período de almacenamiento refrigerado (Morse y otros, 1968; Thomas y Druce, 1971; Gehrig, 1981).

Para efectuar la prueba de TRAM, la leche se incubó a 36° C, basándose su ejecución e interpretación en la técnica descrita por Magariños (1978). El recuento de bacterias totales se realizó mediante el método estándar de recuento en placa con incubación por 48 hr a 32° C, en tanto que para los psicrótrofos, se empleó el método estándar de recuento en placa con incubación durante 10 días a 6° C; las coliformes se determinaron a través del recuento de placa con agar bilis rojo violeta e incubación por 24 hr a 32° C (Magariños, 1978). Todas las determinaciones se hicieron en duplicado y se trabajó con los promedios.

Las diferencias entre las variables de calidad bacteriológica de la leche atribuibles al tiempo de almacenamiento refrigerado (0, 24 y 48 hr), se estudiaron estadísticamente a través de un análisis de variancia completamente al azar, con los datos transformados a logaritmos base diez, estableciéndose dichas diferencias mediante la prueba de Duncan (Sokal y Rohlf, 1969).

Para caracterizar la calidad bacteriológica de la leche, se consideraron diferentes normas y recomendaciones bibliográficas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Recuento bacteriano total

El promedio de recuento bacteriano total a las 0 hr de almacenamiento (Cuadro 1), es inferior al informado por varios autores, que indican recuentos iniciales del orden de las 10^5 col./ml (Cousins, 1973; Arai, Ohtsuki y Nakanishi, 1977; Pedraza, 1977; Pedraza y otros, 1981). Incluso los promedios registrados a las 24 y 48 hr, están por debajo de dicho valor y también resultan menores a los informados por Haukka (1969), citado por Thomas y Druce (1971), el cual obtuvo recuentos de 186.000 y 492.000 col./ml, después de 1 y 2 días de almacenamiento a 4 y 5°C, respectivamente.

Al someter a evaluación los valores de recuento bacteriano total al cabo de 48 hr de almacenamiento, frente a diferentes estándares de calidad, un 73,3% de las muestras analizadas está dentro del límite de 100.000 col./ml, sugerido por la Federación Internacional de la Leche (FIL) en 1967, para leche refrigerada en estanques, y un 56,6% cumple con la recomendación de presentar cifras de recuento ≤ 50.000 col./ml (Lück, 1972). Otros autores, citados por Lück (1972), plantean recomendaciones más exigentes, afirmando que con equipos y utensilios higienizados apropiadamente, es posible obtener recuentos ≤ 20.000 col./ml; basado en este criterio, sólo un 30% de las muestras estaría dentro de lo aceptable.

En el Cuadro 1, se aprecia que los promedios de recuentos a las 0 y 24 hr, son muy semejantes y no difieren estadísticamente. A las 48 hr el recuento total aumenta, alcanzando un promedio que, aunque se mantiene bajo las 10^5 col./ml, es comparativamente

mayor a los registrados a las 0 hr ($P \leq 0,05$). En promedio, ello significa un incremento de 2,2 veces en relación al recuento inicial de la leche, lo cual revelaría una situación similar a la descrita por varios investigadores — Hesselberg (1960) y Hadland (1965), ambos citados por Thomas y Druce (1971) — que han comprobado recuentos totales entre 2,5 a 5,5 veces más elevados, para leche refrigerada con 2 días de almacenamiento, en comparación a leche almacenada durante 1 día. Por lo tanto, el crecimiento que experimentan las bacterias totales estaría dentro de márgenes aceptables para leche mantenida a 4°C durante 48 hr, corroborándose que dichas condiciones de almacenamiento causan un aumento limitado en el recuento de estas bacterias (Thomas y Druce, 1971).

Recuento de coliformes

Los resultados presentados en el Cuadro 1 son coincidentes en términos generales a los informados por Bockelmann (1967), citado por Lück (1972), quien determinó un promedio de 1.200 col./ml, con un rango de 800–3.600, para leche recolectada día por medio.

La factibilidad de producir leche con recuentos de coliformes muy bajos, es una realidad de acuerdo a lo informado por Lück (1972), quien señala un promedio de 33 col./ml, al cabo de 12 hr de almacenamiento a 4–5°C, y de 113, 24 hr más tarde, después de acumular la leche de tres ordeñas.

Diferentes criterios existen respecto de los límites aceptables en la concentración de coliformes en leche enfríada; así por ejemplo, Twomey y Crawley (1968), citados por Lück (1972), sugieren un máximo de 100 col./ml, lo cual significaría que sólo el 23,3% de las muestras analizadas en este estudio podrían considerarse como normales. Otra recomendación (Thomas y Druce, 1971), señala que la leche no debiera exceder

CUADRO 1. Recuentos promedios de bacterias totales, coliformes, psicrotróficas (col./ml) y TRAM (hr), según tiempo de almacenamiento de la leche a 4°C

TABLE 1. Average total, coliform and psychrotrophic bacterial counts (col./ml) and MBRT (TRAM), according to storage time of milk held at 4°C

Total de Almacenamiento (hr)	Bacterias Totales (col./ml)	Bacterias Coliformes (col./ml)	Bacterias Psicrotróficas (col./ml)	TRAM (hr)
0	36.750 b	1.073 a	2.975 c	6,32 a
24	38.983 ab	1.157 a	6.905 b	6,32 a
48	79.516 a	1.369 a	84.480 a	6,13 a
CV (0/o)	31,4	14,3	16,0	4,2

Letras distintas en cada columna indican promedios estadísticamente diferentes, según Duncan ($P \leq 0,05$).

las 200 col./ml, lo que implicaría que sólo el 33% de las muestras de este estudio cumplirían con el requisito.

Al analizar la evolución que experimenta la población de coliformes de la leche, se aprecia que ésta se mantiene prácticamente constante, sin que ocurran diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de recuento a las 0, 24 y 48 hr (Cuadro 1). Los incrementos alcanzaron apenas a 1,1; 1,2 y 1,3 veces, respectivamente.

Esta situación coincide con los resultados de una serie de investigaciones sobre recolección de leche en días alternados (Thomas y Druce, 1971), las cuales han permitido concluir que el almacenamiento de leche en estanques prediales a una temperatura menor a 5° C durante 2 días, no incide en un crecimiento apreciable de las bacterias coliformes.

Recuento de psicótrofos

En el Cuadro 1 se puede apreciar el desarrollo experimentado por las bacterias psicotróficas; al cabo de 48 hr de almacenamiento refrigerado, se determinó un rango de recuentos comprendido entre 1.000—500.000 col./ml, cifra excesiva, si se le compara con los valores obtenidos por Andrey y Frazier (1959), de 350—4.800 col./ml, para leche de clase A recolectada día por medio. Sogaard y Lund (1981) determinaron rangos de 5—3.200 col./ml, en el período de invierno, y 5—12.000 col./ml, durante el verano. El valor promedio encontrado para las 48 hr en este estudio (Cuadro 1), excede ampliamente lo recomendado por numerosos autores. Si se considera lo expresado por Lück (1972), en el presente estudio sólo un 10% de las muestras podrían clasificarse como de buena calidad, es decir, con una concentración de bacterias psicotróficas menor que 5×10^3 col./ml, y sólo el 26,7% del total de muestras examinadas, cumplirían el requisito de calidad de poseer un máximo de 16.000 col./ml. Al utilizar otro criterio de clasificación del material muestreado, planteado por Tatini y Olson (1965), un 36% de las muestras cumplirían con el requisito de contener menos de 20.000 col./ml de psicótrofos.

Es de interés señalar el incremento observado en esta flora, a medida que transcurrió el tiempo; así, por ejemplo, la población se incrementó 2,3 veces entre las 0 y 24 hr de almacenamiento, y 12,2 veces entre las 24 y 48 hr; el incremento total, entre 0 y 48 hr fue de 28,4 veces. En general, estas cifras no coinciden con las mencionadas en la literatura, que afirman la existencia de un crecimiento moderado entre las 24 y 48 hr de almacenamiento; según Hadland (1965), citado por Thomas y Druce (1971), en dicho lapso, la flora psicotrófica aumentó 2,5 veces, desde $1,7 \times 10^3$ col./ml, a las 24 hr, hasta $4,3 \times 10^3$, a las 48 hr.

El diseño experimental no permite identificar claramente las causas del diferente comportamiento presentado por los microorganismos psicotróficos; sin embargo, dicha diferencia podría ser atribuida a la alta concentración inicial de estas bacterias, encontrada en el presente estudio. Como se sabe, las bacterias en condiciones favorables tienden a la multiplicación en una progresión logarítmica, circunstancia en la cual la carga inicial resulta relevante. Adicionalmente, hay que considerar la enorme variabilidad observada en la tasa de crecimiento de estos microorganismos, según el tipo predominante en la muestra de leche (Marth y Frazier, 1957, citados por Thomas, 1958).

Si en las muestras de leche examinadas se consideran los incrementos promedios de las bacterias psicotróficas, de 2,3; 12,2 y 28,4 veces entre las 0—24, 24—48 y 0—48 hr, respectivamente, podría afirmarse que se caracterizan por un modelo o patrón, donde el recuento a las 24 hr no es excesivo, para luego experimentar un desarrollo importante, a las 48 hr de almacenamiento. De ello se desprende que el mayor incremento en la población psicotrófica ocurre durante las últimas 24 hr de almacenamiento refrigerado de la leche. Esta situación, última, sería necesario considerarla en el país, dado que la recolección de leche en predios con estanques enfriadores se efectúa cada 48 hr.

TRAM

El Cuadro 1 permite apreciar el comportamiento experimentado por el TRAM. La leche, de acuerdo a este índice, es de buena calidad bacteriológica. Así, el 100% de las muestras analizadas sobrepasan el TRAM de 3 hr, exigido en Chile para clasificar la leche cruda en clase A, en tanto que un 94,4% supera las 5,5 hr, establecidas por diversos autores para calificar la leche como de buena calidad higiénica (Goss, 1953; Olson, 1962; Demeter, 1969), y un 68,9% alcanza el tiempo máximo de incubación de 6,5 hr, valor que coincide con los estándares sugeridos por Neff (1965) y Lück (1970), citados por Lück (1972).

No se observó diferencias significativas entre los promedios de TRAM a las 0, 24 y 48 hr, manteniéndose prácticamente constantes alrededor de un valor de 6 hr, lo que indica que el TRAM no se vería afectado por el tiempo de almacenamiento de la leche a 4° C, al menos durante 48 hr.

CONCLUSIONES

El almacenamiento refrigerado de la leche durante dos días no afectó el TRAM ni el recuento de coliformes, observándose un efecto significativo ($P \leq 0,05$)

sobre el número de bacterias totales y psicrótróficas, entre las 0 y 48 hr para las primeras, y 0, 24 y 48 hr, para las últimas.

La recolección de leche cada dos días se vería limitada fuertemente por el abundante crecimiento que experimentaron los psicrótrofos y, en menor medida, las bacterias totales; los coliformes también constituirían un factor limitante, debido a su elevado nivel de contaminación inicial.

Después de dos días de almacenamiento refrigerado, la leche presentó valores de TRAM que permitirían calificar su calidad bacteriológica como plenamente

satisfactoria, pero sólo podría calificarse como medianamente adecuada en cuanto a su recuento bacteriano total; la calidad láctea resultó menos satisfactoria al considerar su recuento de bacterias coliformes y psicrótróficas, con el consiguiente riesgo de salud pública, en el primer caso, y de eventuales problemas tecnológicos, en el segundo.

De acuerdo a lo anterior, el uso de la prueba de TRAM como método oficial de clasificación de la leche cruda en el país, involucraría una sobreestimación notoria de la calidad bacteriológica de la leche refrigerada.

RESUMEN

Se seleccionaron 10 predios del estrato superior de lecherías de la Región Metropolitana, las que fueron visitadas mensualmente tres veces, obteniéndose muestras de leche al finalizar la primera ordeña (al ingresar al estanque), en frascos mantenidos 2 días a 4°C, simulando un estanque enfriador. Se realizaron recuentos (col./ml) de bacterias totales (RBT), psicrótróficas (RP), coliformes (RC) y TRAM (hr). Las diferencias entre las variables de calidad bacteriológica, atribuibles al tiempo de almacenamiento refrigerado (0, 24 y 48 hr), se estudiaron estadísticamente a través de un análisis de variancia, en diseño completamente al azar.

Los promedios correspondientes a dichos tiempos fueron: RBT: 36.750 b, 38.983 ab, 79.516 a ($P \leq 0,05$); RP: 2.975 c, 6.905 b, 84.480 a ($P \leq 0,05$); RC:

1.073 a, 1.157 a, 1369 a; TRAM: 6,31 a, 6,32 a, 6,13 a. Considerando distintos estándares, la calidad bacteriológica final de la leche fue apropiada en el 68,9–100; 30–73,3; 10–36,6 y 23,3–33,3% de las muestras, basado en TRAM, RBT, RP y RC, respectivamente.

Se desprende que la recolección de leche cada dos días se vería limitada fuertemente por el RP, el cual aumentó 12 veces durante las últimas 24 hr y, en menor medida, por el RBT, que se duplicó en ese lapso; aunque el RC no se modificó por efecto del tiempo de almacenamiento, también sería limitante por su alto nivel inicial. Los resultados denotarían, además, una notoria sobreestimación de la calidad bacteriológica de las leches refrigeradas, ya que el TRAM es el método empleado oficialmente en el país para clasificar leche cruda.

LITERATURA CITADA

- ANDRÉY Jr., J. and FRAZIER, W.C. 1959. Psychrophyles in milk held two days in farm bulk cooling tanks. *J. Dairy Sci.* 42 (11): 1781–1784.
- ARAI, I.; OHTSUKI, M.; and NAKANISHI, T. 1977. Bacterial contamination in raw milk during milking. *Dairy Sci. Abs.* 39 (1): 430.
- BAER, H. VON y BIDEGAIN, H. 1975. Prospección sobre calidad higiénica de leche cruda recibida en plantas de la provincia de Valdivia. En: Seminario para Ejecutivos de la Industria Lechera 4º, Valdivia, Instituto Tecnológico de la Leche, s.p. (mimeografiado).
- BAER, H. VON y VIAL, F. 1976. Calidad higiénica de leche cruda. En: Jornadas Médico Veterinarias 2a, Valdivia, Facultad de Medicina Veterinaria. U. Austral de Chile. p.: 39–50.
- COUSINS, C.M. 1973. Sources of bacteria in farm bulk tank milk. *Dairy Sci. Abs.* 35 (3): 932.
- COUSIN, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Food Prot.* 45 (2): 172–207.

- CHILE, Ministerio de Agricultura. 1979. Decreto Nº 271. Fija sistema de control y clasificación de la leche según su calidad. Diario Oficial, Santiago, 8 de febrero de 1979.
- DEMETER, J.K. 1969. Lactobacteriología. Zaragoza, Acribia. 331 p.
- GEHRIGER, G. 1981. Multiplication of bacteria in milk during farm storage. En: Symposium on bacteriological quality of raw milk. Federación Internacional de la Leche—International Dairy Federation. Kiel, 8–10 Sep., 1981. p.: 317–323.
- GOSS, E.F. 1953. Techniques of dairy plant testing. Ames. The Iowa State College Press. 350 p.
- 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. Universidad Austral de Chile, 2–3 diciembre de 1982. 3 p. (mimeografiado).
- LUCK, H. 1972. Bacteriological quality tests for bulk-cooled milk. Dairy Sci. Abs. 34 (2): 101–122.
- MAGARIÑOS, H. 1978. Análisis microbiológico de leche y productos lácteos. Manual Práctico. Valdivia. Centro Tecnológico de la Leche, Universidad Austral de Chile. 243 p.
- MORSE, P. M.; JACKSON, H.; Mc NAUGHTON, C. H.; LEGATT, A. G.; LANDERKIN, G. B.; and JOHNS, C. K. 1968. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk. III. Increase in count from cow to bulk tank, and effect of refrigerated storage and preliminary incubation. J. Dairy Sci. 51 (8): 1192–1206.
- OLSON Jr., J.C. 1962. Hygienic aspects of milk and payment for quality. J. Milk Food Technol. 25 (11): 355–361.
- PEDRAZA, C. 1977. Contaminación bacteriana de la leche. Investigación y Progreso Agrícola (Chile) 9 (1): 94–97.
- PEDRAZA, C.; JARPA, C.; HARGREAVES, A. y AGUERO, H. 1981. Antecedentes sobre contaminación bacteriana de la leche entre predio y planta y factores que la influyen. Agricultura Técnica (Chile) 41 (4): 233–237.
- SOGAARD, H. and LUND, R. 1981. Psychrotrophic counts in raw milk and the keeping quality of pasteurized milk products. En: Roberts, T.A.; Hobbs, G.; Christian, J.H.B.; and Skowgaard, N. Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. London, Academic Press. p.: 87–95.
- SOKAL, R.R. and ROHLF, F.J. 1969. Biometry, the principles and practice of statistics in biological research. San Francisco, W.H. Freeman. 776 p.
- TATINI, S.R. and OLSON Jr., J.C. 1965. Interrelationship among bacteriological methods for examination of farm bulk tank milk supplies. J. Dairy Sci. 48 (6): 770 (Abs.).
- THOMAS, S.B. 1958. Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. Part I. Dairy Sci. Abs. 20 (5): 357–370.
- THOMAS, W.R. and BECKLEY, M.S. 1967. Dairy sanitation. En: Milking management and its relationships to milk quality. University of California Agricultural Extension Service. Pub. AXT-94. p.: 56–64.
- THOMAS, S.B. and DRUCE, R.G. 1971. Bacteriological quality of alternate day collected farm bulk tank milk. Dairy Sci. Abs. 33 (5): 339–342.