UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE PRODUCIDA EN ESTABLECIMIENTOS DE LA REGIÓN LITORAL NOROESTE DEL PAÍS, PERÍODO 2012- 2013"

por

Mara Jimena OLMOS NOLI

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
ORIENTACIÓN: Higiene, Inspección, Control y Tecnología de los alimentos de origen animal

MODALIDAD Estudio de caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa: _____
Dr. Darío Hirigoyen

Segundo Miembro (Tutora): _____
Dra. Silvana Carro

Tercer Miembro: _____
Dra. Elena De Torres

Co-tutora: _____
Dra. Lucia Grille

Autor: _____
Br. Mara Olmos

Fecha: 15 de Diciembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutora y Co-tutora: Dra. Silvana Carro y Dra. Lucía Grille por haberme acompañado durante todo este proceso y haberme incentivado en todo momento.

A mis compañeros del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche: Lic. Sheila Giacaman, Lic. Karina Cal, Dr. Álvaro González y Dr. Joaquín Barca por su apoyo en diferentes etapas del trabajo.

A aquellas personas que me ayudaron en la búsqueda bibliográfica en la Biblioteca de Facultad de Veterinaria.

A mi familia, por su apoyo durante toda mi carrera como profesional y formación en valores.

A mis amigos por tantos momentos compartidos y recorrer este camino juntos….

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN 2

AGRADECIMIENTOS 3

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS 6

RESUMEN 7

SUMMARY 7

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 8

Producción mundial de leche 8

Producción de leche en Uruguay 8

Sistema Nacional de Calidad de la Leche en Uruguay 9

Microorganismos potencialmente presentes en leche de tanque de frío 10

Microorganismos patógenos causantes de mastitis 11

Microorganismos indicadores de higiene 15

OBJETIVOS 18

Objetivo general: 18

Objetivos específicos: 18

MATERIALES Y MÉTODOS 19

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 23

Recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT) 24

Recuento de bacterias termodúricas 27

Recuento de bacterias psicrótrofas 29

Recuento de Pseudomonas aeruginosa 31

Recuento de Streptococcus spp 32

Recuento de Staphylococcus coagulasa positiva 33

CONCLUSIONES 37

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38

ANEXOS 44

Anexo 1. Diseño experimental de los análisis microbiológicos realizados a partir de leche de tanque de frío..... 44

Anexo 2. Resultados obtenidos para el recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT Log_{10} ufc/ml)..... 45

ANEXO 3. Resultados obtenidos para el recuento de bacterias termodúricas (Log_{10} ufc/ml) 46

ANEXO 4. Resultados obtenidos para el recuento de bacterias psicrótrofas (Log_{10} ufc/ml) .. 47

ANEXO 5. Resultados obtenidos para el recuento de Pseudomonas aeruginosa (Log_{10} ufc/ml) 48

ANEXO 6. Resultados obtenidos para el recuento de Streptococcus spp (Log_{10} ufc/ml) 49

ANEXO 7. Resultados obtenidos para el recuento de Staphylococcus coagulasa positiva (Log_{10} ufc/ml)..... 50

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Valores máximos admitidos para recuento de células somáticas y recuento bacteriano de acuerdo al Decreto 359/13…… 10

Cuadro II. Pruebas que diferencian el género *Streptococcus* spp *del género Enterococcus* spp*…*…….. 22

Cuadro III. Valores promedio de los grupos de microorganismos estudiados expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} ufc/ml) durante el período de muestreo de los establecimientos…….... 23

Figura I. Muestras de leche sometidas a proceso de pasteurización baja para el recuento de bacterias termodúricas…….. 20

Figura II. Muestras de leche sembradas en superficie para recuento de psicrótrofos ……..... 20

Figura III. Muestras de leche sembradas en Agar de Edwards modificado suplementado con sangre ovina al 5%..... 22

Figura IV. Recuento de mesófilos aerobios totales (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año……. 24

Figura V. Recuento de bacterias termodúricas (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año……..... 27

Figura VI. Recuento de bacterias psicrótrofas (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año…….. 29

Figura VII. Recuento de *Pseudomonas aeruginosa* (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año…….. 31

Figura VIII. Recuento de *Streptoc*occus spp (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año……. 32

Figura IX. Recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva (Log_{10}ufc/ml) en leche d etanque de frío durante las estaciones del año……. 34

RESUMEN

La microbiología de la leche fluida influye en la producción de los subproductos de diferentes maneras. Algunos grupos bacterianos presentes en la leche, pueden degradar componentes de la misma alterando su calidad composicional y sensorial, así como también tener efectos negativos en los subproductos principalmente relacionados a la vida útil y rendimiento. Las enzimas lipolíticas y proteolíticas producidas por estos microorganismos son muy importantes para la calidad de los subproductos, teniendo efectos sobre la coagulación en los quesos incluso en la gelación de la leche UHT. Esta proteólisis puede ser debida a proteasas nativas y también a las producidas por bacterias. En el presente estudio se realizó un muestreo de leche de tanque a 29 establecimientos remitentes a dos industrias de la región litoral noroeste del país durante las estaciones del año. El objetivo fue evaluar la calidad microbiológica de leche de tanque a través de la identificación de principales grupos bacterianos presentes. Los mismos fueron agrupados como indicadores de higiene de la leche: mesófilos aerobios totales, bacterias psicrótrofas y termodúricas y principales microorganismos causantes de mastitis: *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Streptococcus* spp. Los resultados demostraron que existieron diferencias significativas entre las estaciones del año para el recuento de psicrótrofos y para el recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva.

SUMMARY

The microbiology of the fluid milk affects the production of dairy products in different ways. Some bacterial groups present in milk can degrade its components altering its compositional and sensory quality and also have negative effects on dairy products especially related to shelf life and yield.

Lipolytic and proteolytic enzymes produced by these microorganisms are very important to the quality of dairy products having effects on coagulation of cheeses even in the gelation of UHT milk. This proteolysis can be attributed to native proteases and also to those produced by bacteria. In this study sampling was taken from bulk milk tank of 29 farm remitters to two industries in the northwest coastal region of the country during the seasons of the year. The aim of this study was to evaluate the microbiology quality of the bulk milk tank through the identification of the major bacterial groups of the milk. They were grouped as milk hygiene indicators: total aerobic mesophilic, psychrotrophic and thermoduric bacteria and major microorganisms causing mastitis: coagulase-positive *Staphylococcus* and *Streptococcus* spp. The obtained results demonstrated that there were significant differences between the seasons of the year for psychrotrophic count and coagulase-positive *Staphylococcus.*

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Producción mundial de leche

La producción total de leche a nivel mundial correspondiente al año 2012 fue de 754 millones de toneladas, lo que representó un crecimiento del 2.31 % con respecto al año 2011. La Unión Europea aporta en el 2010 un 31% del volumen total de la producción mundial (135.472 miles de toneladas métricas), mientras que el país con mayor aporte continúa siendo Estados Unidos con 87.5 miles de toneladas métricas (FAO, 2014). En el 2011 hubo un crecimiento lechero del 43% liderado por Asia, Oceanía y Sudamérica (MGAP; DIEA, 2014). En América Latina y el Caribe durante el año 2011 se experimentó un marcado crecimiento en los países del Cono Sur (Argentina, Chile, Uruguay y Paraguay) que en promedio crecieron un 12.5% (FAO, 2013). En este mismo año, en Sudamérica, la producción fue de 68 millones de toneladas (FAO, 2013). La FAO indica que la producción de leche en América Latina está concentrada, el 66% se produce entre Brasil, Argentina y México, donde Brasil aporta el 39%.

Producción de leche en Uruguay

Uruguay constituye un ejemplo dentro de América, tanto por el elevado consumo de lácteos de su población como por la amplia oferta de diversos productos o derivados lácteos. El sector lechero uruguayo durante la primera década del siglo XXI sufrió una serie de impactos negativos para la producción lechera como fuertes variaciones en las condiciones del clima y en los precios para los productores de leche, no obstante se mantuvo el crecimiento que ha caracterizado a la lechería desde la primera mitad del siglo XX (IICA, 2013). En el año 2013 se mantuvo el crecimiento registrado desde el año 2010. Este incremento fue casi de un 6% en la remisión a planta respecto a 2012 (INALE, 2013). La producción lechera comercial en el año 2012 fue de 2.177 millones de litros, de la producción total. El 90% tiene como principal destino la remisión a industrias procesadoras, la que fue de 1.936 millones de litros, proveniente de 3.119 tambos, lo cual constituye un nuevo máximo histórico (MGAP; DIEA, 2014). El sector industrial lácteo nacional, está compuesto por unas 40 industrias habilitadas por el MGAP de las cuales 7 principales captaron el 93 % de la leche que ingresó a planta en el año 2013 (INALE, 2013).

En la cadena láctea ubicada en el litoral oeste del país, más precisamente al norte del Río Negro, en los Departamentos de Río Negro y Paysandú se encuentran las dos industrias lácteas que se enmarcan en este estudio así como sus productores remitentes. Dichas empresas son responsables del 8% del total de remisión de leche del país. El recibo anual de leche es de 55 millones de litros en promedio y cuentan con una capacidad máxima instalada de procesamiento de unos 200.000 litros diarios.

Sistema Nacional de Calidad de la Leche en Uruguay

La calidad de la leche abarca conceptos como el ordeño completo de vacas lecheras sin adulteración ni conservantes, seguridad, composición y la higiene, lo que en su conjunto determinarán la aptitud de la leche para el uso asignado (Ibarra, 1997).La calidad de la materia prima define la del producto final, la que está directamente relacionada con los costos de producción. De acuerdo con la FAO (2001), en todos los países compete al sector alimenticio cumplir con los requisitos reglamentarios en materia de calidad e inocuidad de los alimentos desde las fincas rurales, el transporte, el almacenamiento, el procesamiento y la venta al consumidor final (“farm to fork”).

Hoy en día el precio de la leche cruda depende de distintos factores que determinan su calidad, siendo uno de los más importantes el aspecto microbiológico, ya que el contenido de microorganismos presentes en la leche afectará los productos que con ella se elaboren, otorgando características sensoriales indeseables y acortando su vida útil (Ibarra, 1997).Según Ruegg (2001), la calidad de leche significa obtener un producto de buena calidad producido por vacas saludables y bien cuidadas. Como ya mencionamos, la calidad de la leche está definida por varios parámetros, entre ellos, la calidad higiénico–sanitaria, la que se evalúa mediante el recuento bacteriano y el recuento de células somáticas (Calvinho, 2012).

El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la ubre y debido a su directa relación con la composición de la leche es un criterio muy importante de calidad de la misma que hay que tener en cuenta (Hernández y Bedolla, 2008).

El recuento bacteriano indica la calidad higiénica de la leche, aportando información respecto a la higiene del tambo (rutina, lavado, entre otros). Nos permite identificar probables fuentes de contaminación y grupos de microorganismos patógenos prevalentes (Calvinho, 2012). Respecto a esto, según Schreiner y Ruegg (2003), la preparación de la ubre pre ordeñe es determinante en la calidad de la leche. Por lo tanto, obtener el resultado y análisis de ambos recuentos en conjunto nos permite conocer la calidad de la leche.

A consecuencia de ello, el Sistema Nacional de Calidad de la Leche desde el año 1995 estableció reglamentariamente determinados valores que clasifican la leche. Posteriormente existieron modificaciones de los parámetros establecidos y recientemente se aprobó el Decreto 359/13 (MGAP, 2013) que consta de 14 artículos. En su artículo sexto se informa que se establecen los siguientes valores máximos para recuento de células somáticas y recuento bacteriano que se ajustarán progresivamente (Cuadro I).

Cuadro I. Valores máximos admitidos para recuento de células somáticas y recuento bacteriano de acuerdo al Decreto 359/13 (MGAP, 2013)

Fecha de entrada en vigencia del decreto	Recuento Microbiano (ufc/ml)	Células Somáticas (céls/ml)
A la entrada en vigencia	500.000	800.000
Al año de entrada en vigencia	300.000	600.000
A los tres años de entrada en vigencia	100.000	400.000

Estos valores son referidos a la media geométrica de los resultados de las muestras analizadas durante un período móvil de tres meses, con un mínimo de tres muestras por mes para el recuento bacteriano y un mínimo de dos muestras por mes para el recuento de células somáticas, a la leche cruda al momento de la recolección de la leche por la industria o previo a su transformación en el establecimiento artesanal.

Por otra parte, el Reglamento Bromatológico Nacional según lo establecido en el Decreto Nº 315/ 994 de fecha 05/07/1994, establece como leche cruda no apta para consumo o elaboración de cualquier producto alimenticio los siguientes límites: el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) de bacterias aerobias mesófilas, no deberá sobrepasar el límite de $5x10^6$ ufc/ml, 10^4 ufc/ml de coliformes totales y hasta 10^3 ufc/ml de *Staphylococcus aureus* (MSP, 1994).

Microorganismos potencialmente presentes en leche de tanque de frío

La microbiología de la leche fluida tiene impactos en la producción de los subproductos de varias maneras diferentes. Algunos grupos bacterianos presentes en la leche, pueden degradar sus componentes alterando la calidad composicional y sensorial, así como también tener efectos negativos en los subproductos, principalmente relacionados a la vida útil y rendimiento. Muchos de estos microorganismos son patógenos para el hombre y están asociados a la leche o a sus subproductos y pueden afectar la salud pública (Hayes y Boor, 2001).
El recuento y tipo de bacterias presentes en la leche cruda está influenciada por el estado de salud de la vaca, las prácticas de preparación de la ubre pre ordeñe, la adecuada limpieza y desinfección del equipo de ordeñe, las prácticas de enfriamiento de la leche y el tiempo en que la leche está

almacenada previo a su pasteurización. La población microbiana presente en el producto final está determinada por el número inicial y tipo de bacterias en la leche cruda, la combinación de tiempo – temperatura en el procesamiento, y las medidas de prevención adoptadas para que no exista recontaminación en el producto pasteurizado. Para obtener un producto final de buena calidad y adecuada vida útil, son importantes las medidas tomadas para proteger a la leche cruda y subproductos de la contaminación. Una limpieza ineficiente puede dejar residuos de leche en la máquina de ordeñe, tanques de frío o de transporte, donde las bacterias pueden multiplicarse y contaminar la leche que pasa por el equipo. La contaminación bacteriana de la leche cruda puede dividirse en tres categorías generales: del ambiente, la ubre y el equipamiento de la leche (Hayes y Boor, 2001).
En cuanto a los microorganismos provenientes de la ubre, en Uruguay la prevalencia de microorganismos responsables de mastitis subclínicas ha sido reportada por Gianneechini y col. (2002), siendo: *Staphylococcus aureus* 62,8%, *Streptococcus agalactiae* 11,3%, *Enterococcus* spp 8%, *Staphylococcus* coagulasa negativa 7,4%, *Streptococcus uberis* 6,4%, *Streptococcus dysgalactiae* 1,8%, *Escherichia coli* 1,5% y *Staphylococcus hyicus coagulasa* positiva 0,6%. Según Schreiner y Ruegg (2003), la exposición a los patógenos causantes de mastitis y la eficiencia de los mecanismos de defensa de la vaca son dos puntos importantes que determinarán el riesgo de infección intramamaria; ya que los microorganismos presentes en la ubre de la vaca y el medio ambiente son los principales orígenes de la mastitis. A su vez estos microorganismos pueden llegar al tanque de frío contaminando la leche.

Microorganismos patógenos causantes de mastitis

La leche proveniente de vacas con mastitis es un factor de riesgo importante para aumentar la presencia de estos microorganismos en leche de tanque (Olde Riekerink y col., 2006). La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria en la que se producen cambios físicos, químicos y microbiológicos; está caracterizada por un aumento en el recuento de células somáticas en la leche y cambios patológicos en el tejido mamario. La incidencia de esta enfermedad en su forma clínica y subclínica afecta la cantidad y calidad de la leche producida, produciendo un serio impacto económico sobre los establecimientos lecheros (Gianneechini y col., 2002). En la mastitis clínica la glándula mamaria presenta signos de inflamación: calor, dolor, hinchazón e induración y se producen cambios en la leche que incluyen modificación de color, presencia de coágulos y aumento en el número de células somáticas (Radostis, 1999). La reducción en la producción de leche atribuida a mastitis subclínica, en la cual no hay cambios en la leche aparentes ni en la glándula mamaria, ocasiona un 70-80% del total de las pérdidas (Philpot y Nickerson, 1991, citados por Gianneechini y col., 2002). La mastitis subclínica es un gran problema en la industria, muchas veces no es detectada y la leche es remitida dando grandes variaciones en los recuentos bacterianos causantes de mastitis presentes en la leche de tanque (Jeffrey y Wilson, 1987; Olde Riekerink y col., 2006, citados por Akerstedt y col., 2012). En especial la mastitis subclínica es muy importante ya que para detectarla se necesitan repetidas muestras bacteriológicas de la leche (Zadoks y col., 2001). Muchos de los

microorganismos responsables de mastitis tienen efectos negativos sobre la composición de la leche, lo que adquiere importancia cuando, por ejemplo, esa leche será sometida a un proceso de fermentación como en el caso de yogur y quesos donde la composición proteica es muy importante para obtener un producto final óptimo (Akerstedt y col., 2012).
La leche contiene partículas en suspensión coloidal que forman un complejo compuesto por asociación de proteínas y fosfato de calcio, esta asociación coloidal heterogénea se denomina micela de caseína. La fracción proteica de las micela de caseína, que representa un 93% de su masa seca, está compuesta por cuatro componentes denominados: αs1 caseína, αs2 caseína, β caseína y κ caseína que difieren en su estructura primaria (De Kruif y col., 2012). La κ caseína representa el 15% del total de la caseína, es soluble en presencia de calcio y cuando se unen a las α caseínas (que son sensibles al calcio) y a las β caseínas forman una micela de caseína que es estable frente al calcio (Fox, 2013). También son proteínas importantes en la leche la α lactoalbúmina y β lactoglobulina, que son constituyentes principales de las proteínas del suero de la leche (Akerstedt y col., 2012). La α lactoalbúmina representa el 20% de las proteínas del suero y la β lactoglobulina el 50% de las mismas; el resto está constituido por inmunoglobulinas y albúmina sérica bovina (Fox, 2013).
La caseína es sensible a proteólisis deteriorando la calidad de la leche. La proteólisis de la caseína tiene dos orígenes: el primero mediante los microorganismos que pueden secretar proteasas exógenas resistentes al calor y muchas de ellas se desarrollan durante el almacenamiento en frío de la leche; el segundo está relacionado con el deterioro de la ubre enferma lo que incrementa la cantidad de proteasas endógenas, especialmente aquellas del sistema plasmina-plasminógeno (Guerrero y col., 2003). Por lo tanto, la proteólisis es debida a proteasas nativas y también a proteasas producidas por bacterias psicrótrofas durante el almacenamiento de la leche (Fajardo y col., 2000).
Se ha encontrado una correlación entre la calidad y producción de quesos influida por los factores relacionados a la inflamación de la glándula mamaria y especies bacterianas responsables de la proteólisis de la caseína. Estas bacterias producen proteólisis de la caseína por secreción de enzimas extracelulares y promueven la actividad enzimática (Merin y col., 2008). Los efectos de la proteólisis en la leche son muy importantes para la calidad de los subproductos, teniendo efectos sobre la coagulación en los quesos y en la gelación de la leche UHT. Las reducciones en las fracciones de caseína en leche tratada con ultra alta temperatura (UHT) durante el almacenamiento fueron asociadas a la actividad proteolítica de enzimas termo-resistentes, como la plasmina. Esta proteólisis disminuyó su vida útil y puede causar defectos como precipitación o gelación de la misma (Fernandes y col., 2008).

La plasmina presente en la leche se encuentra como plasminógeno precursor inactivo (Guerrero y col., 2003). Según Fajardo y col. (2000), es una proteasa nativa de la leche que es capaz de hidrolizar la β caseína y las α caseínas pero no la κ caseína ni las proteínas del suero. En la mastitis se produce un aumento del recuento de células somáticas en la leche y también un aumento de proteasas endógenas y mayor actividad enzimática. Estas alteraciones importantes en la leche producen deterioros en la calidad de los subproductos

de la leche y representan menores ganancias para los establecimientos lecheros y la industria (Mazal y col*.,* 2007).

Como se ha mencionado anteriormente el patógeno más frecuentemente hallado en los aislamientos en Uruguay fue *Staphylococcus aureus* (62.2%) seguido de *Streptococcus agalactiae* (11.3%). Estos son microorganismos contagiosos que se transmiten vaca a vaca (Gianneechini y col*.*, 2002). Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos de aproximadamente 1 μm de diámetro que tienden a aparecer en grupos irregulares parecidos a racimos de uvas. La mayoría de los *Staphylococcus* son anaerobios facultativos y catalasa positiva. Son inmóviles, oxidasa negativos y no forman esporas. *Staphylococcus aureus* es muy importante como patógeno causante de mastitis en bovinos, donde la misma puede ser subclínica, aguda o crónica. Las especies de *Staphylococcus* son habitualmente categorizadas por su apariencia colonial, patrón hemolítico y perfiles bioquímicos (Quinn y col., 2008). El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae* junto con los géneros *Micrococcus, Planococcus y Stomacoccus*. Dentro del género *Staphylococcus* se incluyen 32 especies (Rojas y col, 2006). La producción de coagulasa es una prueba esencial en la identificación de especies de *Staphylococcus*, como *S. aureus, S. intermedius* y *S. hyicus.* Por otro lado, la producción de la enzima catalasa, que es una prueba muy sencilla pero fundamental, nos permite distinguir dos grandes grupos: los catalasa positiva: *Staphylococcus*, *Micrococcus, Planococcus* y *Stomacoccus* y los catalasa negativa: *Streptococcus, Enterococcus y Aerococcus* (Rojas y col, 2006).
La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* en la vaca lechera es de distribución mundial, siendo de gran importancia dentro de la casuística de esta enfermedad. Su forma de presentación más común es la crónica, por lo general subclínica, que puede convertirse en aguda en algunas etapas de la lactación, como en el posparto, para revertirse a crónica durante la mayor parte de la lactancia. La fuente principal de infección es la ubre afectada, transmitiéndose básicamente a través de la máquina de ordeño (Saran y Chaffer, 2000).
Este microorganismo tiene efecto sobre la producción y composición de la leche. En cuanto a la producción, algunos autores observaron que existe asociación con los niveles de *Staphylococcus aureus* (Reksen y col., 2007). En relación a la composición, Barbosa y col. (2013), en su trabajo reportan que el contenido de *Staphylococcus aureus* afectó negativamente el contenido de sólidos no grasos de la leche (SNG), materia grasa (MG) y proteínas.
El género *Streptococcus* está integrado por un gran grupo de microorganismos que tienen las siguientes características: son cocos Gram positivos de 0.5 a 2 μm de diámetro y se encuentran agrupados de a pares o en cadenas. Son anaerobios facultativos, catalasa negativa e inmóviles. Para su crecimiento requieren la adición de sangre o suero al medio de cultivo. Muchas especies son hemolíticas y una forma de diferenciación es el tipo de hemólisis que presentan: hemólisis β, que se caracteriza por una lisis total de los eritrocitos; hemólisis α, que es la que se manifiesta por una decoloración parcial alrededor de la colonia; y hemólisis γ , que es la ausencia de hemólisis. Hay especies patógenas para el hombre y los animales (Stanchi, 2007).
Streptococcus agalactiae, S. dysgalactiae y *S. uberis* son los principales patógenos relacionados con la mastitis bovina. La mastitis es de tipo crónico o recurrente. Puede presentarse como mastitis clínica con síntomas leves o

moderados o con cambios en la leche como presencia de grumos o coágulos (Saran y Chaffer, 2000). Los *Streptococcus* son muy importantes como agentes etiológicos de la mastitis bovina y pueden dividirse en dos grupos sobre la base de su epidemiología. El primer grupo está constituido por los que son contagiosos, que se transmiten de vaca a vaca, siendo los principales agentes *Streptococcus agalactiae y Streptococcus dysgalactiae.* El segundo grupo abarca los que provienen del ambiente, donde la fuente de contaminación es el entorno de la vaca y el principal microorganismo de este grupo es *Streptococcus uberis.*

S. agalactiae generalmente es citado como habitante obligatorio de la glándula mamaria, aunque puede sobrevivir por cortos períodos en el ambiente y en las manos de los ordeñadores. Es un agente altamente contagioso, causando sobre todo mastitis subclínica con aumento en el recuento de células somáticas, por lo tanto el daño ocasionado por este agente se observará en la disminución de la producción lechera de las vacas afectadas así como en la reducción del precio obtenido por la leche al productor como consecuencia de los recuentos celulares elevados. Además, a diferencia de *S. aureus*, *S. agalactiae* se caracteriza por manifestarse en los recuentos bacterianos altos en la leche de tanque, lo que también ocasiona disminución en el precio obtenido por la leche (Saran y Chaffer, 2000).

Streptococcus dysgalactiae se adhiere a las células epiteliales de la glándula mamaria y las invade, y puede asimismo sobrevivir en el ambiente (Calvinho, 1998). Es probable que en Uruguay se comporte más como contagioso, dado la frecuencia de lesiones del pezón, sobretodo en invierno (De Torres, 2010).

Por último, *Streptococcus uberis,* tiene un comportamiento epidemiológico más complejo de lo que se pensaba, ya que Zadoks y col., 2001; Phuektes y col., 2001, citados por De Torres (2010), encontraron evidencias de transmisión directa (vaca a vaca) de este patógeno. Por último, es importante destacar que debemos diferenciar el género *Streptococcus* spp del género *Enterococcus* spp*,* ya que también pueden ser causantes en forma oportunista de mastitis. Son de incidencia esporádica y se encuentran en suelo, agua, alimentos, animales, aves e insectos (Rojas y col., 2006).

En relación al efecto de estos microorganismos causantes de mastitis sobre la composición de la leche y subproductos, se observó que en leche inoculada con *Streptococcus agalactiae*, la degradación de las caseínas fue de un 75% en comparación con leche esterilizada UHT utilizada como control, mientras que las fracciones proteicas del lactosuero: α lactoalbúmina y β lactoglobulina, fueron degradadas en un 21% en comparación con la leche estéril control (Akerstedt y col., 2012). En vacas con mastitis causada por *Streptococcus agalactiae* durante la infección (RCS>600.000 céls/ml) existió la degradación de un 55,7% de α caseínas y β caseína. Luego de eliminada la infección, la proteólisis enzimática disminuyó pero no volvió a los valores iniciales pre-infección por lo que los efectos de la mastitis continuaron luego de eliminada la infección (Saeman y col., 1988). También se observó que los quesos producidos a partir de leche con *S. dysgalactiae* resultaron más blandos y su rendimiento un 7,6% menor. La sinéresis fue menos pronunciada, esto se vio reflejado en mayor pérdida de suero de leche. *S. dysgalactiae* produce cambios importantes en las propiedades de la leche en relación a la producción de quesos: la excesiva degradación de la caseína continúa durante la maduración del queso dando defectos en la textura y apariencia del queso, atribuido a la

liberación de péptidos de la caseína (Merin y col., 2008). Estos efectos negativos son importantes ya que afectan la composición de la leche, que es el principal factor que influye en la producción de quesos, principalmente en la concentración de grasa y caseínas, que juntos representan alrededor del 94% de la masa seca del queso Cheddar (Fox y col., 2000). Cuanto menor sea la cantidad de caseína que haya en la leche, menor será el rendimiento quesero (Jhonson, 2001).

En cuanto a otros microorganismos causantes de mastitis que también tienen efectos sobre componentes de la leche, Merin y col. (2008), demostraron que en casos de infecciones con *Escherichia coli* y *Streptococcus dysgalactiae* hay excesiva degradación de la caseína asociada a la liberación de grandes cantidades de péptidos de αs1 caseínas y β caseínas. La proteólisis de la caseína incrementa los niveles de ɣ caseína y proteosas peptonas. Las proteosas peptonas son en su mayor parte, aquellos péptidos derivados de la proteólisis principalmente de la β caseína por acción de la plasmina y una menor proporción nativa de la leche (Fox, 2013).

Microorganismos indicadores de higiene

Recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT)

Son las bacterias que pueden crecer entre 30 – 35ºC en condiciones aerobias ya sean provenientes de la piel de los pezones, las heces, manos del ordeñador, equipos, suelo, agua, etc. Su importancia radica en que su recuento refleja la calidad higiénica de la materia prima y la forma en que fue manipulado el producto, estima el recuento bacteriano total presente en el producto. Cuanto mayores sean los valores del recuento bacteriano, menor vida útil. Un recuento alto de bacterias aerobias mesófilas nos indica: materia prima no apta para consumo, malas prácticas de manipulación en su elaboración, mayor riesgo de que existan microorganismos patógenos (APHA, 2001). Hayes y col. (2001), consideran que en particular el recuento bacteriano total es el de mayor interés para el productor porque influye en el precio de la leche y se dan incentivos cuanor d su recuentoos

Figura I. Muestras de leche sometidas a temperatura de pasteurización baja para el recuento de bacterias termodúricas (APHA, 2001)

Recuento de Bacterias Psicrótrofas

Según APHA (2001), las muestras se sembraron en superficie en medio de cultivo Tripticasa Soya Agar (Himedia), a una temperatura de 7ºC por un período de 10 días. Luego de transcurrido el mismo, se realizó el recuento de colonias en las placas (Figura II).

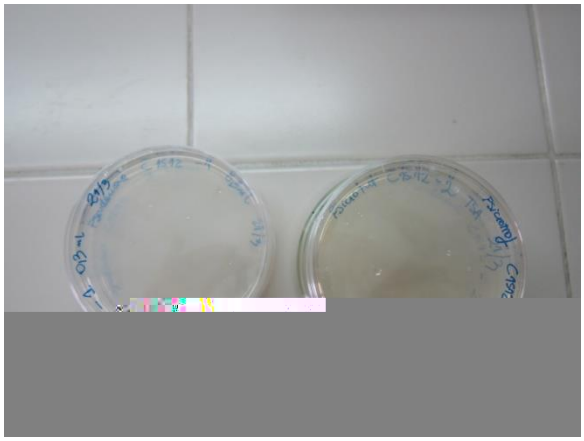

Figura II. Muestras de leche sembradas en superficie para recuento de psicrótrofos (APHA, 2001)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro III se presentan los resultados del análisis estadístico donde vemos los valores promedio (Log_{10} ufc/ml) obtenidos a partir de los recuentos microbiológicos de los 29 establecimientos del litoral noroeste de Uruguay durante las estaciones del año.

Cuadro III. Valores promedio de los grupos de microorganismos estudiados expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias (Log_{10} ufc/ml) durante el período de muestreo de los establecimientos

Grupos de microorganismos	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Mesófilos aerobios totales (Log_{10} ufc/ml)	4,21[a]	4,29[a]	4,24[a]	4,18[a]
Psicrótrofos (Log_{10} ufc/ml)	2,05[a]	2,72[b]	3,18[c]	1,43[d]
Termodúricos (Log_{10} ufc/ml)	2,37[a]	2,69[a]	2,67[a]	1,87[a]
***Staphylococcus* coagulasa positiva (Log_{10} ufc/ml)**	2,02[a]	1,96[b]	2,62[c]	2,15[d]
***Streptococcus* spp (Log_{10} ufc/ml)**	0,31[a]	0,47[a]	0,30[a]	1,51[a]
***Pseudomonas aeruginosa* (Log_{10} ufc/ml)**	1,10[a]	1,37[a]	1,46[a]	0,27[a]

*Letras diferentes (entre las mismas filas), indican diferencias significativas con $p<0,05$.

Recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT)

En la Figura IV, se presentan los resultados del recuento de mesófilos aerobios totales en leche cruda expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} ufc/ml) en los muestreos realizados en las diferentes estaciones del año. La gráfica se realizó utilizando el valor promedio obtenido en cada época del año (Cuadro III). A través del análisis de varianza, se determinó que no existen diferencias significativas entre las estaciones del año (valor de P= 1,8414).

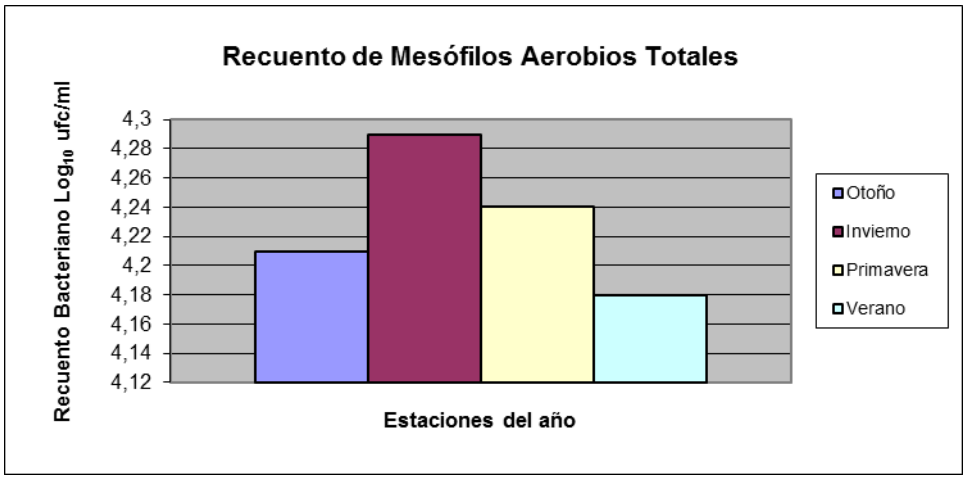

Figura IV. Recuento de Mesófilos Aerobios Totales (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año

El recuento bacteriano se encuentra dentro de valores muy bajos durante todas las estaciones del año en todos los establecimientos ya que son predios remitentes que utilizan apropiadas medidas de higiene y limpieza en la rutina de ordeñe.
Si bien el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, en el Decreto 359/13 establece como valor máximo 500.000 ufc/ml a la entrada en vigencia del mismo, con valores referidos a la media geométrica de los resultados de muestras analizadas con un mínimo de tres muestras por mes para el recuento bacteriano y en el presente estudio se realizó un muestreo por estación, en ninguna de las estaciones del año se superan los valores máximos establecidos. Tampoco se supera el límite establecido por el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 1994) que establece $5x10^6$ ufc/ml de bacterias aerobias mesófilas, como límite superior en leche cruda.

En nuestros resultados observamos que un gran porcentaje de las muestras se mantienen con recuentos de Log_{10} 4,0 ufc/ml (10.000 ufc/ml) durante el período de muestreo: un 72,4% (21 muestras) en primavera, un 65,5% (19 muestras) en otoño, un 51,7% (15 muestras) en invierno y un 69% (20 muestras) en verano (Anexo 2). Es de destacar que sólo 6 tambos mantienen ese valor durante todo el año coincidiendo con que esos establecimientos incluían durante su rutina la preparación de la ubre pre ordeñe: lavado de tetas y post sellado de los pezones.

Existen varios estudios que afirman que el efecto estacional es de gran significancia en la producción de leche de calidad en cuanto a su higiene (Matutinovic y col., 2011; Cziszter y col., 2012). En este aspecto, un estudio realizado en Italia por Zucali y col. (2011), se observaron los efectos de la higiene en la rutina de ordeñe, la salud de las vacas y el efecto estacional sobre el perfil microbiológico de la leche de tanque de frío. En el mismo se observó que estos factores tienen gran influencia en el recuento bacteriano total de la leche de tanque. Sin embargo, se demostró que uno de los efectos más importantes sobre el recuento bacteriano total en la leche de tanque estaba dado por los procedimientos en la rutina de ordeñe. Esto incluye la implementación y mantenimiento de prácticas de limpieza y desinfección tanto del equipo de lechería como también la utilización de pre sellado y post sellado, los cuales influyen significativamente en la mejora de la calidad de la leche.
Matutinovic y col. (2011), afirman que con apropiadas medidas de manejo, control en la dieta y procedimientos adecuados de higiene en el ordeñe, las variaciones del efecto estacional se pueden reducir. Coincidiendo con este autor, podemos pensar que los predios lecheros estudiados cumplían con características en su rutina de ordeñe similares y pueden ser los motivos de que se hayan mantenido bajos los recuentos bacterianos con pocas variaciones en las diferentes épocas del año.

Con respecto a la higiene en la rutina de ordeñe, el 89% (26 establecimientos) procedían al lavado de las tetas pre ordeñe, pero únicamente 3 de los mismos realizaban el posterior secado de las mismas. De acuerdo a esto, podemos concluir entonces, que las prácticas en la rutina de ordeñe se mantuvieron en todos los establecimientos durante todas las estaciones del año en el período estudiado. Esto puede explicar que el recuento de mesófilos aerobios totales no tuvo diferencias significativas entre las estaciones del año.
Elmoslemany y col. (2010), encontraron que existe una asociación entre la higiene de la ubre y el recuento bacteriano en la leche de tanque, ya que el grado de suciedad de las ubres pre ordeñe estaba positivamente asociado al recuento bacteriano total y al recuento de psicrótrofos en la leche de tanque. Sin embargo en el presente estudio sólo tres establecimientos no incluyen en su rutina el lavado de tetas y los resultados obtenidos en RMAT fueron bajos, con recuentos de Log_{10} 4,0 ufc/ml (10.000 ufc/ml) a Log_{10} 4,48 ufc/ml (30.000 ufc/ml).
A su vez, Wagner y Ruegg (2002), describieron que la preparación pre ordeñe es esencial para producir leche de alta calidad, esto incluye la estimulación pre ordeñe y la buena higiene de la ubre pre ordeñe. Según los resultados obtenidos por Zucali y col. (2011), cuando se realiza pre sellado y post sellado durante la rutina de ordeñe se muestra un efecto positivo en la calidad microbiológica de la leche. Esto también fue demostrado por Jayarao y col. (2004), ya que a partir de su estudio observaron que la utilización de pre y post sellado reducen no sólo los patógenos ambientales causantes de mastitis sino también el número de termodúricos y psicrótrofos presentes en la leche de tanque. En nuestro estudio, 22 establecimientos realizaban sólo post sellado, 2 establecimientos realizaban pre y post sellado, y 5 ninguno de ellos. Esto puede explicar que los recuentos bacterianos fueron muy bajos durante el período estudiado en todos los establecimientos, ya que en la mayoría de ellos (24 de 29 establecimientos) se utilizaba algún método de desinfección de los

pezones durante la rutina de ordeño. Las prácticas de pre y post sellado de los pezones son aceptadas universalmente como procedimientos que disminuyen la carga bacteriana de la ubre y los pezones y reduce el riesgo de adquirir infecciones intramamarias (Jayarao y col., 2004). El post sellado, reduce el número de bacterias en la piel de la ubre y pezones y a la misma vez previene la entrada de bacterias por el canal del pezón luego del ordeñe (Murphy y Boor, 2000, citados por Zucali y col., 2011).

Por otro lado, el manejo de la leche post ordeñe es un factor importante en el recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT). En el presente estudio, todos los establecimientos tenían tanque de frío funcionando correctamente, y con capacidad acorde a los litros de leche producida en los mismos. Al momento de extracción de la muestra de leche, se realizó control de temperatura en el tanque la que se encontraba entre 4 a 6ºC y se alcanzaba entre 30 minutos a 1 hora post ordeño en todos los casos, constatando que el manejo de la leche era similar en todos los establecimientos. Muñoz (2003), obtuvo similares resultados ya que no observó diferencias significativas en el recuento de mesófilos aerobios totales entre los Centros de Acopio Lecheros (CAL) estudiados donde en todos los casos, la leche llegaba a la temperatura de 4ºC entre 30 minutos a 3 horas como máximo luego del ordeñe.

Recuento de bacterias termodúricas

En la Figura V vemos los resultados obtenidos para el recuento de bacterias termodúricas en leche cruda expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} ufc/ml) en los muestreos realizados. La gráfica se realizó utilizando el valor promedio obtenido en cada época del año (Cuadro III). A través del análisis de varianza, se determinó que no existen diferencias significativas entre las estaciones del año (valor de P= 0,0850).

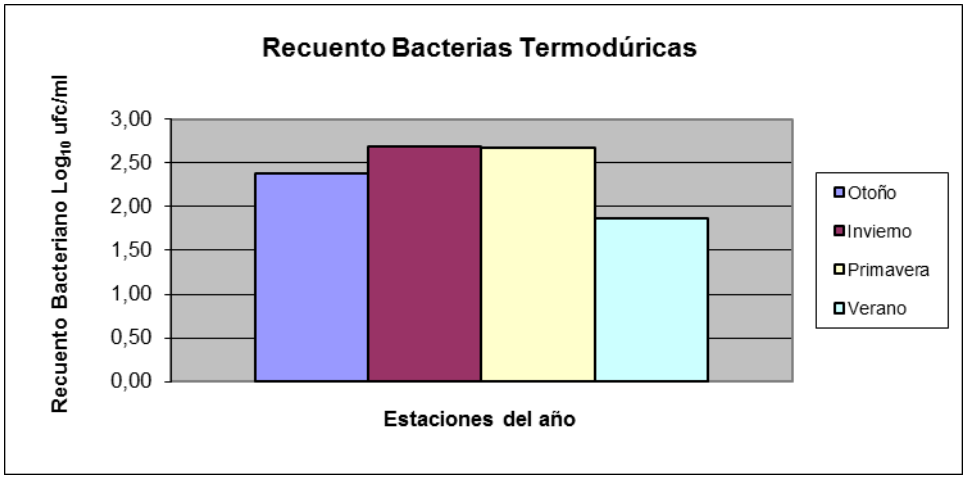

Figura V. Recuento de bacterias termodúricas (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año

Numerosos géneros bacterianos pertenecientes a el grupo de bacterias termodúricas han sido aislados en la leche: *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Alcaligenes.* Los géneros formadores de esporas más relevantes en leche y subproductos son *Bacillus* y *Clostridium* (Hayes y Boor, 2001). Más recientemente, McAuley y col. (2012), aislaron especies del género *Enterococcus* que sobreviven la pasteurización: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae* en leche cruda en Australia.

Las bacterias termodúricas y esporas sobreviven a las temperaturas de pasteurización e incluso luego de un tratamiento UHT (Buehner y col., 2014). De esta manera crecen en los productos pasteurizados o almacenados a temperaturas de refrigeración (Sutherland y col., 1994). La producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas de *Bacillus* spp son generalmente responsables de los deterioros de la leche, cambios de sabor y rancidez (Matta y col., 1999). Los géneros de *Bacillus* están distribuidos en el ambiente. La contaminación puede provenir de diferentes orígenes, incluidos: suelo, granos o el equipo de ordeñe de rutina (Bartoszewicz y col., 2008). Según Buehner y col. (2014), *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* y *Bacillus sonorensis* fueron los *Bacillus* más aislados en leche cruda de tanque de frío.

El nivel de contaminación en la leche cruda varía con la época del año, esto nos sugiere que estos microorganismos derivan del ambiente y son importantes contaminantes de la leche (Sutherland y col., 1994; Svensson y col., 1999, citado por Bartoszewicz y col., 2008).

Christiansson y col. (1999), llegaron a la conclusión de que las fluctuaciones en la contaminación según la época del año eran debido a las condiciones de higiene y población microbiana en la ubre de la vaca y el equipo de lechería.
Más recientemente, Elmoslemany y col. (2010), según sus resultados encontraron que las bacterias termodúricas provienen principalmente por deficiencias en la limpieza del equipo de lechería.
El mantenimiento de la máquina de ordeñe debe hacerse como mínimo una vez al año e incluye: cambiar las mangueras de leche, las duchas (lavadores) y las mangueras entre el recibidor y la bomba de leche y la bomba de leche y el tanque, así como también pedir un chequeo de máquina completo y completar con un service según las recomendaciones del técnico (Colaveco, 2014).
En el presente estudio se realizaba el chequeo del funcionamiento del equipo de lechería una vez al año en el 62% de los establecimientos (18 establecimientos) y en un 17% (5 establecimientos) se realizaba 2 veces al año. El chequeo periódico estático del equipo de ordeñe es un punto recomendado del Plan de 5 puntos de Control de Mastitis. Uno de los autores que considera importante la adopción de este plan es Ruegg (2012), el Plan incluye: desinfección de la ubre post-ordeño, administración terapéutica a las vacas sanas, apropiado tratamiento a los casos clínicos, sacrificio de las vacas con mastitis crónica y regular mantenimiento de limpieza y desinfección del equipo de lechería. Este es el llamado “5- point plan” que es utilizado en Norteamérica y ha reducido en forma significante la prevalencia de mastitis causada por patógenos contagiosos (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*).
Con respecto al cambio de pezoneras, se realizaba periódicamente en todos los establecimientos; en el 48% de ellos (14 establecimientos) con una frecuencia de una vez por año, el resto variaba de una vez cada dos años o cuando se rompían.
De acuerdo a esto, podemos pensar que no existieron diferencias significativas entre las estaciones del año durante el período estudiado para el recuento de bacterias termodúricas, debido a que el mantenimiento de la máquina de ordeñe y el cambio de pezoneras se realizaba con la frecuencia recomendada en la mayoría de los establecimientos y estas condiciones se mantuvieron a lo largo del año.

Recuento de bacterias psicrótrofas

En la Figura VI se presentan los resultados de los recuentos de bacterias psicrótrofas en leche cruda expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} ufc/ml) en los muestreos realizados.
El análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas entre las estaciones del año (P= 0,0254) durante el período estudiado. La gráfica se realizó utilizando el valor promedio obtenido en cada época del año (Cuadro III).

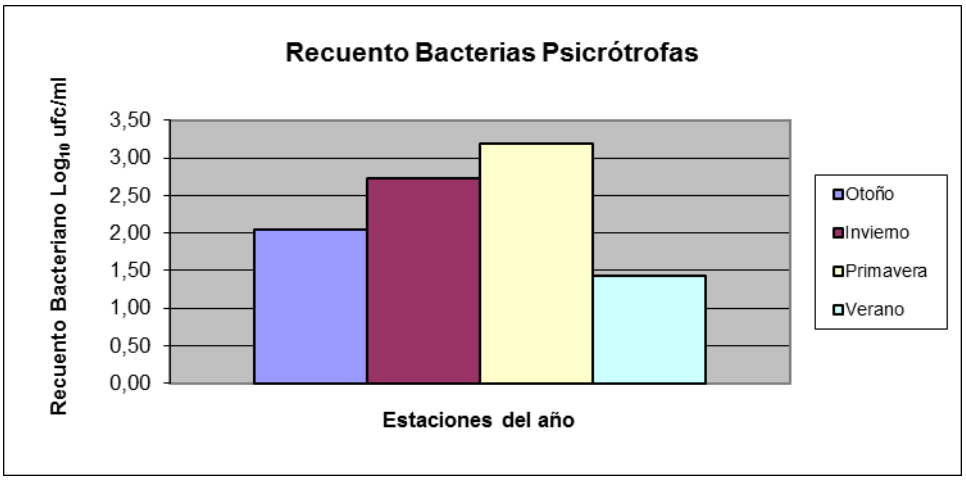

Figura VI. Recuento de bacterias psicrótrofas (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año

Collins y col. (1993), indican que con un recuento de psicrótrofos mayor a 10^5 ufc/ml los productos UHT obtenidos usualmente tienen una vida útil más corta. Asimismo, observaron que el rol más importante sobre la aceptabilidad sensorial de la leche UHT estaba dado por la actividad de las proteinasas termorresistentes producidas por los microorganismos psicrótrofos. Los psicrótrofos pueden producir proteólisis y lipólisis en la leche, estas dos reacciones producen cambios en el sabor y olor de la leche y son la gran preocupación de los procesos en la industria ya que los hace inaceptables para el consumidor. Las proteasas atacan la caseína y proteínas del suero, llevando a cambios en el desarrollo de la coagulación cuando se hacen quesos o mantecas (Cousin, 1982). A su vez, Fajardo y col. (2000), demostraron que el crecimiento de *Pseudomonas* spp en la leche cruda a 7ºC por 3 días, en un recuento de 10^7 ufc/ml, produce proteasas extracelulares que causan un aumento en la actividad de la plasmina. La misma actúa hidrolizando la caseína y disminuyendo los niveles de ésta. El aumento en la actividad de la plasmina podría afectar la calidad de los quesos u otros subproductos de la leche. Siendo que el principal producto elaborado por estas industrias es el queso, la leche obtenida por los establecimientos que presentaron recuentos de 10^5 ufc/ml (Log_{10} 5,0 ufc/ml) en leche cruda podría tener influencia negativa sobre la calidad de este y otros subproductos elaborados por las mismas.

En particular, *S. agalactiae* es un habitante obligatorio de la glándula mamaria, por lo que la ubre de las vacas es reconocida como la fuente principal de contaminación de este microorganismo en la leche de tanque. Utilizando un sistema riguroso de higiene en la rutina de ordeñe se puede reducir o eliminar su prevalencia en el rebaño (Keefe, 2012). Según este autor, el lavado de las tetas y posterior secado, junto con el pre sellado y post sellado de los pezones son procedimientos importantes que pueden reducir el recuento de este microorganismo en la leche de tanque, principalmente el lavado de las tetas era realizado en la mayoría de estos establecimientos lo que puede ser la razón por la cual el 62% de las muestras en primavera- verano y el 82% en otoño-invierno tuvieron recuentos de Log_{10} 0 ufc/ml (<10 ufc/ml) y por lo tanto no existieron diferencias significativas entre las estaciones del año durante el período estudiado.

Observamos mediante el gráfico, que el valor promedio de *Streptococcus* spp es mayor (Log_{10} 1,51 ufc/ml) comparando con las demás estaciones (Cuadro III). Sin embrago, al realizar el análisis estadístico vemos que no existen diferencias significativas ((P= 0,8036) durante el período estudiado. El origen de las variaciones puede ser atribuido a factores que podrían estar influenciando nuestros resultados, uno de ellos es el grado de variabilidad entre los productores comprendidos en este estudio, ya que partimos de un universo bien heterogéneo; por otro lado, el factor estacional que claramente también influye en ellos. Mediante el análisis de varianzas de dos factores, que fue el utilizado en este estudio, controlamos estos dos elementos y que el valor de la probabilidad exprese un resultado más veraz.

Recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva

En la Figura IX se presentan los resultados del recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva en leche cruda expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonia (Log_{10} ufc/ml) en los muestreos realizados. El análisis de varianza determinó que sí existen diferencias significativas entre las épocas del año (valor de P= 0,0001). La gráfica se realizó utilizando el valor promedio obtenido en cada época del año (Cuadro III).

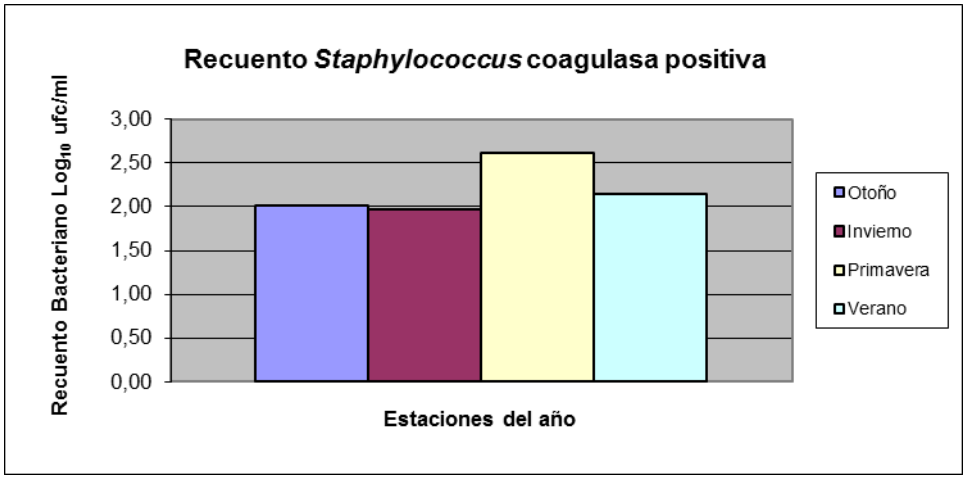

Figura IX. Recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva (Log_{10} ufc/ml) en leche de tanque de frío durante las estaciones del año

Según el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 1994), se admite en leche cruda, un recuento de hasta 10^3 ufc/ml de *Staphylococcus aureus,* lo cual en este estudio fue superado en algunos establecimientos durante los períodos de muestreo.

Según Olde Riekerink y col. (2010), uno de los factores de riesgo asociado a la prevalencia de *Staphylococcus aureus* es realizar el chequeo del funcionamiento del equipo de lechería como mínimo una vez al año. En los establecimientos enmarcados en este estudio, el 62% (18 establecimientos) realizaba el chequeo de la máquina de ordeñe una vez al año y el 17% (5 establecimientos) lo hacía 2 veces al año, por lo que este factor de riesgo no sería el motivo de las diferencias significativas entre los períodos de muestreo. Como ya hemos mencionado, Ruegg (2012), también incluye en el llamado “5-point plan” del Plan de Control de Mastitis, el chequeo periódico estático del equipo de ordeñe que es utilizado en Norteamérica y ha reducido en forma significante la prevalencia de mastitis causada por patógenos contagiosos (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*).
En primavera observamos que el valor promedio del recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva es un poco más alto (Log_{10} 2,62 ufc/ml) que en las demás estaciones. Un 48,3% (14 muestras) tuvieron recuentos mayores a Log_{10} 3,0 ufc/ml (10^3 ufc/ml) en esta época del año, lo cual supera lo establecido por el Reglamento Bromatológico Nacional. Según Cziszter y col. (2012), en esta estación la vaca tiene más alta susceptibilidad de adquirir nuevas infecciones intramamarias lo que podría explicar los resultados hallados en nuestro trabajo. Los *Staphylococcus* coagulasa positiva son adquiridos tanto

del ambiente en el que vive la vaca como a través de la transmisión vaca a vaca a partir de rebaños infectados por estos microorganismos (Ruegg, 2012). El mayor número de vacas en ordeñe durante la primavera y las mayores dificultades en el manejo, pueden haber contribuido a una mayor transmisión vaca a vaca de este patógeno. Según un estudio realizado por Roberson (1994), el mayor reservorio de *S. aureus* basado en el número de aislamientos positivos es la glándula mamaria de las vacas en lactación que han sido infectadas por este microorganismo y el contacto entre las vacas puede ser un importante modo de transmisión de este patógeno el cual conduce a infecciones intramamarias. Más recientemente, Ruegg (2012), coincide con lo antes mencionado ya que determinó que una forma importante de transmisión de este patógeno ocurre cuando las vacas sanas están expuestas a microorganismos presentes en leche originada de vacas infectadas. El punto más común de exposición son las gotitas de leche provenientes de ubres infectadas que contactan con la piel de la ubre sana. *Staphylococcus* coagulasa positiva son microorganismos considerados oportunistas que resultan en un aumento en el recuento de células somáticas y ocasionan mastitis clínicas. Por otro lado, también las lesiones del pezón de la ubre están asociadas a mayor riesgo de adquirir una nueva infección por *Staphylococcus aureus* (Keefe, 2012).

Durante el invierno, el valor promedio fue de Log_{10} 1,96 ufc/ml. Un 21% (6 muestras) tuvieron recuentos mayores a Log_{10} 3,0 ufc/ml (10^3 ufc/ml). Zucali y col. (2011), obtuvieron mayores recuentos de *Staphylococcus* coagulasa positiva en esta época del año y concluyeron que un motivo podría ser que algunas bacterias de este grupo de microorganismos como *Staphylococcus aureus* forman “biofilms” en la piel de la ubre y también en la máquina de ordeñe (Fox y col., 2005). Este tipo de biofilms son resistentes a los agentes antimicrobianos y durante el invierno, el descenso en la temperatura del agua en el ciclo de lavado de la máquina de ordeñe, puede facilitar su supervivencia (Costerton y col., 1999).

A diferencia de nuestros resultados, Signorini y col. (2003), no observaron diferencias significativas a lo largo del año en los recuentos de *S. aureus*. Sin embargo, obtuvieron recuentos más altos durante el otoño comparado a los de primavera, coincidiendo con que en otoño se aislaron también colonias de *S. aureus* de las manos de los ordeñadores pero en bajo recuento (Log_{10} 0,68 ufc/ml). *S. aureus* fue aislado de la piel de la ubre y pezones de bovinos, piel de las manos de humanos, de otros animales no bovinos, aire y equipamiento (Roberson, 1994). El mismo autor manifiesta que del 10- 40% de las personas son portadoras de *S. aureus* y los sitios donde predomina son garganta y narinas, por lo tanto también las manos pueden estar colonizadas. Todo lo anteriormente mencionado puede explicar las posibles fuentes de contaminación de *Staphylococcus* coagulasa positiva que pueden haber originado los altos recuentos hallados en algunos establecimientos durante el período estudiado en el presente trabajo y las diferencias significativas entre las estaciones del año. Por esta razón, son muy importantes las condiciones de higiene y el control sanitario para determinar posibles portadores, ya que este microorganismo puede llegar a la leche cruda a través de la ubre y canal de los

pezones de las vacas, particularmente si hay lesiones presentes, pudiendo resultar en la contaminación de la leche y productos lácteos.

CONCLUSIONES

Se concluye que la calidad microbiológica de la leche de tanque de frío de los establecimientos evaluados en este estudio, a partir de los principales grupos bacterianos presentes en general es adecuada, ya que los recuentos expresan valores relativamente bajos. Por otro lado se encuentran por debajo de los límites establecidos por la reglamentación vigente, a excepción de *Staphylococcus* coagulasa positiva.

Se identificaron y aislaron microorganismos indicadores de higiene (RMAT, psicrótrofos y termodúricos) destacando que el recuento bacteriano total se mantuvo dentro de valores muy bajos durante el período de muestreo.

En la leche de tanque de frío se encontraron aislamientos de los principales microorganismos causantes de mastitis (*Streptococcus* spp y *Staphyloccocus* coagulasa positiva), lo que puede ser una herramienta de utilidad para inferir en la identificación de los microorganismos que generan problemas de mastitis (clínica y subclínica) en el rodeo.

Al comparar los recuentos bacterianos de microorganismos indicadores de higiene (RMAT, psicrótrofos) así como también microorganismos causantes de mastitis entre las estaciones del año del período 2012-2013, no existieron diferencias significativas a excepción de las bacterias psicrótrofas y *Staphylococcus* coagulasa positiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akerstedt, M.; Wardle, E.; Lam, V.; Johansson, M. (2012) Protein degradation in bovine milk caused by Streptococcus agalactiae. Journal of Dairy Science 79:297-303.

2. American Public Health Association. (2001) Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. 4a ed. Washington DC. Ed. American Public Health Association.676p.

3. Barbosa, C.; Regina Barreiro, J.; Mestieri, L.; De Felicio, M.; Veiga, M. (2013) Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. Veterinary Research 9:67-73.

4. Bartoszewicz, M.; Hansen, B.; Swiecicka, I. (2008) The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiology 25:588-596.

5. Brown, M; Foster, S. (1970) A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Clinical Pathology 23:172-177.

6. Buehner, K.; Anand, S.; García, A. (2014) Prevalence of thermoduric bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. Journal of Dairy Science 97:1-8.

7. Calvinho, L.; Oliver, S. (1998) Invasion and persistence of *Streptococcus dysgalactiae* within bovine mammary epithelial cells. Journal of Dairy Science 81:678-686.

8. Calvinho, L. (2012) Análisis de leche de tanque de frío. Bases epidemiológicas y herramientas prácticas para el manejo de la sanidad de ubres y calidad de leche. INTA Rafaela. Tandil 7 y 8 de Agosto de 2012.40p. Disponibleen:http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Doctorado08/Bibliografia%20curso%20Mastitis%202012/Documentos/ANALISIS%20LECHE%20DE%20TANQUE%202012.pdf Fecha de consulta: Mayo de 2014.

9. Christiansson, A.; Bertilsson, J.; Svensson, B. (1999) Bacillus cereus spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. Journal of Dairy Science 82:305-314.

10. Collins, S.; Bester, B.; McGill, A. (1993) Influence of Psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. Journal of Food Protection 56:418-425.

11. Cooperativa Laboratorio Veterinario de Colonia (COLAVECO) Estadísticas de Calidad de leche de tanque. Disponible en: http://www.colaveco.com/colaveco/index.php Fecha de consulta: Octubre de 2014.

12. Costerton, J.; Stewart, P.; Greenberg, E. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistant infections. Science 284:1318-1322.

13. Cousin, M. (1982) Presence and activity of Psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. Journal of Food Protection 45:172-207.

14. Cziszter, L.; Acatincai, S.; Neciu, F.; Neamt, R.; Ilie, D.; Costin, N.; Gavojdian, D. ; Tripon, I. (2012) The influence of season on the cow milk quantity, quality and hygiene. Animal Science and Biotechnologies 45:305-312.

15. De Jonghe, V.; Coorevits, A.; Van Hoorde, K.; Messens, W.; Van Landschoot, A.; De Vos, P.; Heyndrickx, M. (2011) Influence of Storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. Applied and Environmental Microbiology 77:460-470.

16. De Kruif, C.; Huppertz, T.; Urban, V.; Petukhov, A. (2012) Casein micelles and their internal structure. Advances in Colloid and Interface Science. 172: 36-52.

17. De Torres, E. (2010) Estudio de la evolución del recuento celular y el aislamiento bacteriano durante la lactancia en vacas lecheras. Tesis de maestría en producción animal. Universidad de la República. 38p.

18. Edwards, S. (1933) Studies on bovine mastitis IX a selective medium for the diagnosis of *Streptococcus* mastitis. The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics 46 (4): 211-217.

19. Elmoslemany, A.; Keefe, G.; Dohoo, I.; Wichtel, J.; Stryhn, H.; Dingwell, R. (2010) The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. Preventive Veterinary Medicine 95:32-40.

20. Fajardo-Lira, C.; Oria, M.; Hayes, K D.; Nielsen, S S. (2000) Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. Journal of Dairy Science 83:2190-2199.

21. Fernandes, A.; Bovo, F.; Moretti, T.; Rosim, R.; Goncalves, C.; Fernandes, C. (2008) Casein fractions of ultra high temperatura milk with different somatic cell counts. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43: 149-152.

22. Fox, P.; Guinee, T.; Cogan, T; McSweeney, P. (2000) Fundamentals of cheese science. Gaithersburg. Ed. Aspen. 638p.

23. Fox, P.; Zadoks, R.; Gaskins, C. (2005) Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Veterinary Microbiology 107:295-299.

24. Fox, P.; McSweeney, P. (2013) Advanced dairy chemistry. 4a Ed. New York, Ed. Springer, 548 p.

25. Gianneechini, R.; Concha, C.; Rivero, R.; Delucci, I.; Moreno López, J. (2002). Occurrence of Clinical and Subclinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Veterinaria Scandinavica 43:221-230.

26. Guerrero, L.; Román, S.; Pacheco, L. (2003) Proteólisis de la leche cruda almacenada en frío. Efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas. FCV-LUZ. 13: 187-192.

27. Hayes, M.; Boor, K. (2001) Raw milk and fluid milk products, En: Marth, E.; Steele, J. Applied Dairy Microbiology. 2ªed. New York, Ed. Marcel Dekker, pp. 59-76.

28. Hayes, M.; Ralyea, R.; Murphy, S.; Carey, N.; Scarlett, J.; Boor, K. (2001) Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. Journal of Dairy Science 84:292-298.

29. Hernandez, J.; Bedolla, J. (2008) Importancia del conteo de células somáticas en calidad de la leche. Revista electrónica de Veterinaria REDVET. 9:1-34.

30. Hogan, J.; Smith, K. (2012) Managing Environmental Mastitis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 28:217-224.

31. Ibarra, A. (1997) Sistemas de pago de leche. Seminario Regional de Calidad de Leche. Atlántida, Uruguay. pp.47-58.

32. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) Lechería en Uruguay, una década de fuertes impactos. Disponible en: http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%20la%20Oficina/CoyunturaAgropecuaria/coy-lecheria.pdf Fecha de consulta: Marzo de 2013.

33. Instituto Nacional de la Leche (INALE) Situación y perspectivas de la lechería uruguaya. Informe coyuntura Nº8 del año 2013. Disponible en: www.inale.org Fecha de consulta: Abril de 2014.

34. Jay, J.; Loessner, M.; Golden, D. (2005) Microbiología Moderna de los Alimentos. 5ª ed.Zaragoza,Ed. Acribia. 767p.

35. Jayarao, B.; Pillai, S.; Sawant, A.; Wolfgang, D.; Hegde, N. (2004) Guidelines for monitoring bulk tank milk, somatic cell and bacterial counts. Journal of Dairy Science 87:3561-3573.

36. Janstova, B.; Drackova, M.; Vorlova, L. (2006) Effect of Bacillus cereus enzymes on the milk quality following Ultra High Temperature processing. Acta Veterinaria Brno 75:601-609.

37. Jhonson, M. (2001) Cheese products, En: Marth, E.; Steele. J. Applied Dairy Microbiology. 2ª ed. New York, Ed. Marcel Dekker, pp. 345-384.

38. Keefe, G. (2012) Update on control of *S. aureus* and *S. agalactiae* for management of mastitis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 28:203-216.

39. Kumaresan, G.; Annalvilli, R.; Sivakumar, K. (2007) Journal of Applied Sciences Research 3:1383-1387.

40. McAuley, K.; Gobius, K.; Britz, M.; Craven, H. (2012) Heat resistance of thermoduric enterococci isolated from milk. International Journal of Food Microbiology 154:162-168.

41. Matta, H.; Punj, V. (1999) Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. International Journal of Dairy Technology 52:59-62.

42. Matutinovic, S.; Kalit, S.; Salajpal, K.; Vrdoljak, J. (2011) Effects of flock, year and season on the quality of milk from an indigenous breed in the sub-Mediterranean area. Small Ruminant Research 100:159-163.

43. Mazal, G.; Vianna, P.; Santos, M.; Gigante, M. (2007) Effect of somatic cell count on prato cheese composition. Journal of Dairy Science 90:630-636.

44. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2014) DIEA: Anuario Estadístico 2013. Dirección de Estadísticas Agropecuarias Montevideo-Uruguay. Disponible en: www.mgap.gub.uy Fecha de consulta: Abril de 2014.

45. Ministerio de Salud Pública. (1994) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto Nº 315/994 de fecha 05/07/1994. 2ª ed., Montevideo, IMPO.454p.

46. Merin, U.; Fleminger, G.; Komanovsky, J.; Silanikove, N.; Bernstein, S.; Leitner, G. (2008). Subclinical udder infection with Streptococcus dysgalactiae impairs milk coagulation properties: The emerging role of proteose peptones. Dairy Science and Technology 88:407-419.

47. Muñoz, S. (2003) “Perfil microbiológico de la leche de estanque de tres centros de acopio lecheros (CAL) de la Provincia de Valdivia. Tesis de Grado. Ingeniería de Alimentos. Universidad Austral de Chile. 57p.

48. Olde Riekerink, R.; Barkema, H.; Scholl, D.; Poole, D.; Kelton, D. (2010) Management practices associated with the milk-bulk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. Preventive Veterinary Medicine 97:20-28.

49. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (FAO) Producción y productos lácteos: producción lechera. Disponible en: http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/#.U2aTN4FdVIE Fecha de Consulta: Mayo de 2014.

50. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Federación Panamericana de Lechería (FEPALE) Chile 2012. Situación de la lechería en América Latina y el Caribe en 2011. Disponible en:http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lecher%C3%ADa_AmLatina_2011.pdf Fecha de consulta: Marzo de 2013.

51. Quinn, P.; Markey, B.; Carter, M.; Donnelly, W.; Leonard, F. (2008) Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Zaragoza. Acribia. 667p.

52. Reksen, O.; Solverod, L.; Osteras, O. (2007) Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. Journal of Dairy Science 90:4670-4678.

53. Roberson, J.; Fox, L.; Hancock, D.; Gay, J. (1994) Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. Journal of Dairy Science 77:3354-3364.

54. Rojas, N.; Chaves, E.; García, F. (2006) Bacteriología diagnóstica. Costa Rica. Facultad de Microbiología.150p.

55. Ruegg, P. (2001) Secreción de leche y estándares de calidad. Madison. University of Wisconsin. 35p.

56. Ruegg, P. (2012) New perspectives in Udder Health Management. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 28:149-163.

57. Saran, A.; Chaffer, M. (2000) Mastitis y Calidad de leche. Buenos Aires. Intermédica. 194p.

58. Saeman, A I.; Verdi, R J.; Galton D M.; Barbano D M. (1988) Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. Journal of Dairy Science 71:505-512.

59. Schreiner, D.; Ruegg, P. (2003) Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. Journal of Dairy Science 86:3460-3465.

60. Signorini, M.; Sequeira, G.; Bonazza, J.; Dalla Santina, R.; Otero, J.; Rosmini, M. (2003) Variación estacional en los principales indicadores de higiene de leche cruda de un tambo de la cuenca central. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias. 2:97-110.

61. Stanchi, N.O. (2007) Estreptococos, En: Martino, P. Buenos Aires. Intermédica. pp.179-185.

62. Sutherland, A.; Murdoch, R. (1994) Seasonal occurrence of Psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. International Journal of Food Microbiology 21:279-292.

63. Van Tassell, J A.; Martin, N H.; Murphy, S C.; Widemann, M.; Boor, K J.; Ivy, R A.(2012) Evaluation of various selective media for the detection of *Pseudomona* species in pasteurized milk. Journal of Dairy Science 95:1568-1574.

64. Varnam, A.; Sutherland, J. (1994) Leche y productos lácteos. Zaragoza. Acribia. 476p.

65. Wagner, A.; Ruegg, P. (2002) The effect of manual forestripping on milking performance of Holstein dairy cows. Journal of Dairy Science 85: 804-809.

66. Willey, J.; Sherwood, L.; Woolverton, C. (2011) Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. Madrid, Ed. McGraw-Hill, 1088p.

67. Zadoks, R.; Allore, H.; Barkema, H.; Sampimon, O.; Wellenberg, G.; Grohn, Y.; Schukken, Y. (2001) Cow –and Quarter- Level risk factors for Streptococcus uberis and Staphylococcus aureus Mastitis. Journal of Dairy Science 84:2649-2663.

68. Zadoks, R.; Gonzalez, R.; Boor, K.; Schukken, Y. (2004) Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. Journal of Food Protection.67:2644-2650.

69. Zucali, M.; Bava, L.; Tamburini, A.; Brasca, M.; Vanoni, L.; Sandrucci, A. (2011) Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. Journal of Dairy Research 78:436-441.

ANEXOS

Anexo 1. Diseño experimental de los análisis microbiológicos realizados a partir de leche de tanque de frío

ANEXO 4. Resultados obtenidos para el recuento de bacterias psicrótrofas (Log_{10} ufc/ml)

Productor	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
1	0,95	3,72	2,60	0,95
2	0,95	0,95	3,81	0,95
3	0,95	5,18	5,00	0,95
4	0,95	3,78	3,23	2,70
5	0,95	3,15	3,97	0,95
7	2,00	3,73	3,08	0,95
8	0,95	2,30	0,95	0,95
9	0,95	2,48	4,34	0,95
10	0,95	2,95	2,00	0,95
11	3,28	2,30	0,95	0,95
12	2,78	0,95	3,85	0,95
13	3,66	0,95	3,86	0,95
14	0,95	0,95	5,30	0,95
15	0,95	0,95	3,49	0,95
16	0,95	3,32	2,78	0,95
17	4,66	4,04	4,95	3,28
18	3,32	3,53	4,20	2,90
19	2,00	2,30	0,95	0,95
20	3,72	3,72	4,76	2,30
21	2,95	2,95	3,53	0,95
22	0,95	2,60	0,95	2,00
23	2,30	3,04	0,95	0,95
24	4,51	3,04	3,34	0,95
25	0,95	4,46	3,70	0,95
26	4,54	3,11	5,36	0,00
27	0,95	0,95	0,95	0,95
28	2,60	2,96	3,64	2,30
29	2,70	2,00	4,79	3,04
30	0,95	2,60	0,95	3,97
Media	2,05	2,72	3,18	1,43
dst	1,31	1,14	1,49	0,94
Error St (dst/Raiz n)	0,24	0,21	0,28	0,17

ANEXO 5. Resultados obtenidos para el recuento de *Pseudomonas aeruginosa* (Log_{10} ufc/ml)

Productor	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
1	0,95	3,08	0,95	1,48
2	0,95	0,95	0,95	0,00
3	0,95	0,95	3,72	0,00
4	0,95	0,95	0,95	0,00
5	0,95	0,95	4,00	0,00
7	0,95	0,95	0,95	0,00
8	0,95	2,00	3,59	0,00
9	0,95	2,00	2,00	1,00
10	3,04	0,95	0,95	0,00
11	2,00	0,95	0,95	0,00
12	0,95	0,95	0,95	1,00
13	0,95	0,95	0,95	0,00
14	0,95	0,95	0,95	0,00
15	0,95	0,95	2,60	0,00
16	0,95	0,95	0,95	1,30
17	0,95	3,18	2,48	0,00
18	0,95	2,70	0,95	2,04
19	0,95	3,83	2,83	0,00
20	0,95	0,95	0,95	0,00
21	0,95	0,95	0,95	0,00
22	0,95	0,95	0,95	0,00
23	0,95	0,95	0,95	0,00
24	0,95	0,95	0,95	0,00
25	2,00	0,95	0,95	0,00
26	0,95	0,95	0,95	0,00
27	0,95	0,95	0,95	0,00
28	0,95	0,95	0,95	1,00
29	0,95	2,00	0,95	0,00
30	0,95	0,95	0,95	0,00
Media	1,10	1,37	1,46	0,27
dst	0,46	0,82	0,97	0,56
Error St (dst/Raiz n)	0,09	0,15	0,18	0,10

ANEXO 6. Resultados obtenidos para el recuento de *Streptococcus spp* (Log_{10} ufc/ml)

Productor	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
1	2,57	0,00	0,00	2,77
2	0,00	0,00	0,00	2,11
3	0,00	0,00	0,00	2,26
4	0,00	0,00	0,00	1,70
5	0,00	0,00	0,00	2,84
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	1,95	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	2,18	0,00	3,54
11	2,15	0,00	0,00	2,08
12	0,00	2,18	0,00	0,00
13	2,26	2,36	0,00	1,78
14	0,00	1,85	0,00	0,00
15	0,00	2,08	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	3,11
17	0,00	0,00	2,73	3,11
18	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	2,28
20	0,00	0,00	0,00	2,04
21	0,00	0,00	0,00	2,36
22	0,00	0,00	0,00	2,11
23	2,15	3,04	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	1,30
25	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	4,08	0,00
27	0,00	0,00	0,00	2,00
28	0,00	0,00	0,00	1,78
29	0,00	0,00	0,00	3,26
30	0,00	0,00	0,00	1,48
Media	0,31	0,47	0,30	1,51
dst	0,80	0,96	0,95	1,23
Error St (dst/Raiz n)	0,15	0,18	0,18	0,23

ANEXO 7. Resultados obtenidos para el recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva (Log_{10} ufc/ml*)*

Productor	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
1	0,95	0,95	0,95	0,95
2	2,60	0,95	3,59	3,08
3	1,60	3,36	3,66	3,84
4	0,95	2,00	2,61	2,00
5	2,70	0,95	3,26	2,48
7	3,46	2,95	3,30	2,48
8	2,70	3,11	3,38	2,48
9	2,70	2,00	0,95	0,95
10	0,95	2,00	3,85	2,60
11	2,30	2,00	0,95	0,95
12	3,64	0,95	2,78	3,08
13	2,00	2,48	2,30	0,95
14	0,95	0,95	2,48	0,95
15	0,95	0,95	0,95	0,95
16	2,30	2,00	3,30	2,60
17	2,78	2,90	2,60	2,00
18	2,95	0,95	3,86	0,95
19	2,60	2,48	2,48	2,78
20	0,95	0,95	3,15	0,95
21	0,95	3,00	2,60	2,90
22	0,95	3,76	3,76	2,78
23	2,48	2,70	2,70	3,00
24	2,60	3,20	3,48	2,48
25	0,95	0,95	0,95	0,95
26	0,95	0,95	2,00	2,30
27	3,15	0,95	3,08	2,85
28	2,95	0,95	3,04	2,48
29	0,95	2,00	0,95	2,90
30	2,48	3,53	3,04	2,53
Media	2,02	1,96	2,62	2,15
dst	0,92	0,98	0,98	0,88
Error St (dst/Raiz n)	0,17	0,18	0,18	0,16