

Evaluación microbiológica de leche de vacas Criollo Limonero bajo condiciones de bosque seco tropical

Mariangela C. González¹, Raúl A. Ramírez M.¹ y Katiuska del V. Acosta M.²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Zulia (INIA-Zulia).

²Universidad del Zulia. Laboratorio de Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía.

Correo electrónico: gonzalezma.inia.zulia@gmail.com

Recibido: 14/11/2017

Aceptado: 04-02-2019

Resumen

El ganado Criollo Limonero constituye un recurso genético autóctono invaluable para América tropical. El control microbiano es necesario en todos los puntos de la cadena láctea. Con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica de leche fresca de este tipo de ganado, se realizaron cuatro muestreos consecutivos en un rebaño de 12 vacas Criollo Limonero puro en periodo de lactancia (30-115 días) pertenecientes al INIA-Zulia. Las muestras se tomaron directamente de la ubre de cada vaca en ordeño. Se realizaron mediciones de recuento estándar en placa (Rep) y tiempo de reducción de resazurina (Trr). De acuerdo al análisis de cuadrados mínimos se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,001$) para Rep para todos los periodos de lactancia respectivamente, con un conteo promedio de 36.530 UFC/ml⁻¹ leche cruda, lo cual ubica a la leche de ganado Criollo Limonero, en la categoría A, de acuerdo a lo expuesto en la normativa venezolana vigente. En cuanto al Trr, no se obtuvieron diferencias ($p \geq 0,05$), desarrollándose una coloración azul-celeste, continua en un tiempo de 4 horas lo que se traduce en una leche clase I (muy buena/excelente). Evidenciándose que la leche de ganado Criollo Limonero cumple con las exigencias de calidad microbiológica establecidas en la normativa venezolana.

Palabras clave: Atributos de calidad, ganado autóctono, criterio microbiológico

Microbiological evaluation of milk criollo limonero under tropical dry forest

Abstract

Cattle Criollo Limonero is an invaluable resource for autochthonous genetic tropical America. The control of microbial is required in each of the points of the dairy chain. In order to evaluation the microbiological quality of fresh milk from such cattle, four consecutive samplings were conducted in a herd of 12 cows pure Criollo Limonero lactating (30-115 days) belonging to INIA- Zulia. Samples were taken directly from the udder of each milking cow. measurement standard plate count (Rep) and resazurin reduction time (Trr) were performed. According to least squares analysis significant differences ($p \leq 0,001$) to REP for all periods of lactation respectively were obtained, with an average count of 36,530 CFU / ml-1 raw milk, which places cattle milk Criollo Limonero , in category a, according to the above in the current Venezuelan law. As regards the TRR, no differences ($p \geq 0.05$) obtained develop a sky-blue color, continuous in a time of 4 hours resulting in a class I (very good / excellent) milk. Demonstrating that milk cattle Criollo Limonero meet microbiological quality requirements established in Venezuelan law.

Key words: Quality attributes, autochthonous cattle, microbiological standard.

Introducción

La caracterización de los recursos y/o productos de una especie cualquiera, constituye el inicio hacia su protección como recurso biótico.

En Venezuela, la introducción de ganados españoles generó la formación de varios núcleos que dieron origen a germoplasmas conocidos como Criollo Amarillo de Quebrada Arriba, Criollo Llanero o Cajuno y al Criollo Limonero. El primero, desapareció al ser absorbido por el Pardo Suizo para originar al Carora [1], y el segundo prácticamente desapareció absorbido por el Brahman y otros genotipos del

Bos indicus. Sin embargo el Criollo Limonero sobrevive hasta hoy al borde de la extinción aun habiendo sido declarado oficialmente como “patrimonio nacional” [2].

Este tipo de bovino, tiene su origen en la Península Ibérica e Islas Canarias. El mismo se encuentra en Venezuela desde hace más de 500 años. A este genotipo autóctono se le atribuyen cualidades como: rusticidad, alta eficiencia reproductiva, facilidad al parto, resistencia a enfermedades, excelente pastoreador, docilidad, y facilidad de ordeño. Estas cualidades potenciales hacen que los ganados criollos representen un recurso genético invaluable para la América tropical. En Venezuela, el ganado Criollo Limonero ha sido preservado y seleccionado elementalmente hacia la producción lechera [3]; [4], siendo este rubro de relevante importancia, ya que es el principal elemento de rentabilidad tanto en rebaños de producción lechera como para los de doble propósito en el trópico [5].

La producción de leche se hace con la expresa intención de proporcionar un alimento de alto valor nutritivo para el consumo humano. Cada día se reconocen más las cualidades de este producto en la alimentación de niños, adultos y personas de la tercera edad. Pero para que la leche cumpla con esas expectativas y/o cualidades, debe reunir una serie de requisitos que definen su calidad, como su composición fisicoquímica, cualidades nutricionales y número de microorganismos presentes en ella.

En el ámbito lechero al Criollo Limonero, solo se conocen investigaciones sobre factores como, peso al nacer, época de parto, edad, periodo de la lactancia, niveles de producción lechera, sin embargo la documentación científica sobre caracterización de leche en ganado Criollo Limonero es aun escasa. En tal sentido, debido a la brecha tecnológica existente inherente a calidad de leche en bovinos autóctonos y el peligro en extinción de los mismos; surge la necesidad de caracterizar los atributos de calidad microbiológica en leche proveniente de este tipo de ganado.

Fundamentos teóricos

El ganado Criollo Limonero registra producciones de 2.195 kg de leche por lactancia de 297 días e intervalo entre partos de 399 días [5]. El aporte que representa este patrimonio genético para la producción láctea nacional, es de suma importancia tanto para el consumo directo como para la industria láctea.

En tal sentido, algunas investigaciones han sido reportadas [6] evaluando los factores que afectan la primera lactancia en 133 vacas Criollo Limonero, donde analizaron el efecto del toro padre, peso al nacer, año y época (seca, semilluviosa, lluviosa) de parto sobre el peso, edad, duración de la lactancia y producción de leche, concluyendo que las variables año y época tuvieron un efecto significativo ($P \leq 0,01$) sobre el peso y edad al parto, sobre la duración de la lactancia y la producción de leche. Al ajustar la producción de leche por otros factores que la afectan, la influencia del peso al nacer sobre la producción total de leche llegó a ser altamente significativa ($P \leq 0,01$), notando una mayor producción en las vacas con peso al nacer comprendido entre 25 y 28 kg, lo que indica que este parámetro puede ser un criterio de selección en Criollo Limonero.

Por otra parte se ha estudiado la producción de leche en grupos raciales [7], evaluando los factores genéticos, fisiológicos y ambientales que afectan la producción de leche en vacas mestizas Criollo Limonero y analizaron 106 registros de lactancias pertenecientes a vacas mestizas Genotipo₁: ½ Holstein x ½ Criollo Limonero y Genotipo₂: ¾ Criollo Limonero x ¼ Holstein; nacidas en la Estación Local Chama del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas en estado Zulia, ubicada en el Sur del Lago de Maracaibo. Realizaron análisis estadístico por el método de cuadrados mínimos, considerando como efectos fijos: genotipo del animal, año, época y número de parto. Compararon las medias obtenidas por medio de una prueba de Duncan, siendo las medias ajustadas para la producción de leche total, en los primeros 305 días por genotipo Genotipo₁: 2.754 y 2.473 kg; Genotipo₂: 2.663 y 2.560 kg, sin obtener diferencias significativas entre genotipos. El año de parto afectó ($P \leq 0,05$) la producción de leche total en los primeros 305 días, considerando satisfactoria la producción de leche de las vacas Criollo Limonero x Holstein en condiciones de trópico húmedo.

En el mismo ámbito se han reportado investigaciones [8] inherentes a calidad de leche en ganado Criollo Limonero, donde evaluaron el efecto de la suplementación con harina de frutos de samán (*Pithecellobium saman* (Jacq.) Benth) sobre la producción y calidad de la leche de vacas Criollo Limonero, llevando a cabo un experimento en la Estación Local Carrasquero. Utilizaron 20 vacas lactantes Criollo Limonero agrupadas en dos grupos homogéneos a los cuales aplicaron un diseño experimental simple con dos tratamientos, dos periodos de muestreo de 21 días y 7 días de adaptación a los suplementos. Los tratamientos consistieron en la suplementación al momento del ordeño con alimento concentrado y una mezcla de 90% de harina de frutos de samán y 10% de melaza de caña de azúcar. Las variables medidas diariamente para calidad de leche fueron: sólidos totales, sólidos no grasos, acidez titulable, proteína cruda, proteína sérica, lactosa, grasa, caseína, cenizas, punto crioscopico y densidad relativa. Los autores no detectaron efecto significativo de la alimentación con frutos de harina de samán sobre la calidad de la leche.

Sin embargo pocas han sido las investigaciones con aplicaciones al ámbito industrial [5], donde se caracterizaron el gen de k-caseína (k-CN) y beta-lactoglobulina (BLG) y determinaron la asociación entre estos sobre la producción y composición de la leche en la raza Criollo Limonero, utilizaron la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la detección de polimorfismo en la longitud de fragmentos restringidos en 50 vacas en producción de la Estación Local Carrasquero (INIA-Zulia), determinando los genotipos a través de electroforesis en geles de agarosa donde las frecuencias obtenidas del locus de la k-CN fueron A (0,41) y B (0,59) y las frecuencias genotípicas fueron AA (0,10), AB (0,62) y BB (0,28), mientras que para la BLG, las frecuencias que observaron fueron A (0,21) y B (0,79) con frecuencias genotípicas de AA (0,06), AB (0,30) y BB (0,64). Estos resultados mostraron que la frecuencia del alelo B fue mayor que la de A en ambos casos; con respecto a los halotipos de k-CN y BLG se encontró efecto de los mismos ($P \leq 0,05$) sobre el porcentaje de sólidos totales (%ST), proteína total (PT), grasa (%GS), caseína (%CN) y producción total de leche (Ptotal kg/L) determinando que una selección a favor de los halotipos AAAB, AABB o BBAA es la más apropiada para aumentar el porcentaje de ST, GS y PTotal en la población de Criollo Limonero, mejorando de esta manera la calidad de la leche y permitiendo su utilización en la industria quesera.

Sin embargo existe la necesidad de evaluar la calidad microbiológica en leche cruda proveniente de este tipo de bovino y sus mestizos

Parte experimental

Ubicación geográfica experimental: la fase experimental de esta investigación se realizó en la Estación Local “Carrasquero” ubicada al norte del estado Zulia, municipio Mara (N10°58'13; W72°07'22), perteneciente a la zona de vida de bosque seco tropical con precipitaciones oscilantes entre 500-600mm/año [9] temperatura media anual de 27,4°C, valores máximos de 35,2°C y mínimos 19,7°C, humedad relativa de 77,3% [10] perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Zulia (INIA-Zulia).

Descripción del material experimental: Las muestras de leche fresca fueron provenientes de un rebaño de ganado Criollo Limonero (CL) puro compuesto de 12 vacas lactantes seleccionadas de acuerdo al número de partos (1 - 5 partos); y días de lactancia (30 - 115 días) mantenidas a pastoreo de pasto guinea (*Panicum maximun*. Jacq) y suplementadas con 1,0 kg de alimento concentrado comercial durante el ordeño.

Se realizaron cuatro muestreos consecutivos y compuestos correspondientes a ambos ordeños (mañana y tarde), sin apoyo del becerro. Las muestras se tomaron directamente de cada vaca en ordeño. Se tomó un volumen total de 600 ml de leche por duplicado en erlenmeyers previamente esterilizados, para un total de 48 muestras. Las mismas fueron homogenizadas y refrigeradas hasta su posterior análisis en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Unidad Técnica Fitosanitaria de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia para realizar el aislamiento de mesófilos aerobios y mediciones de tiempo de reducción de resazurina (Trr) correspondientes.

Definición de la unidad experimental: la unidad experimental estuvo conformada por una vaca en periodo de lactancia.

Evaluación microbiológica: para la caracterización microbiológica se siguió la metodología descrita por [11, 12, 13], (correspondientes a: toma de muestra, preparación de muestra y criterios microbiológicos), realizando los siguientes análisis: recuento estándar en placa (Rep) o contaje de aerobios mesófilos en alimentos [14], y tiempo de reducción de resazurina (Trr) [15, 16,17].

Recuento estándar en placa (Rep): También conocido como recuento de aerobios mesófilos, es el análisis directo mayormente empleado para determinar la calidad microbiológica de la leche y otros alimentos. El método consistió en hacer diluciones de la muestra y sembrar en placas de petri con agar play count marca Himedia®; luego de 24 a 48 horas de incubación a 37°C, se contaron las colonias observadas las cuales permitieron obtener el número de unidades formadoras de colonias por ml de muestra (Ufc/ml) [14].

Tiempo de reducción de resazurina (Trr): la prueba consistió en preparar tubos de ensayo contentivos de 1 ml de resazurina marca Sigma® adicionándole posteriormente 10 ml de leche cruda, comparando al término de una hora, durante 4 horas, los cambios de color con patrones establecidos para determinar la calidad sanitaria de las muestras analizadas (Trr) [15, 16,17].

Diseño estadístico: el diseño estadístico empleado en la investigación, consistió en un diseño totalmente al azar con cuatro repeticiones. Se realizó un análisis de estadística descriptiva para cada muestreo y para cada vaca seleccionada, con la finalidad de obtener una comparación de medias para cada una de las variables por el método de Fisher-Kramer con un nivel de confianza de 95 %.

Técnicas de procesamiento y análisis de datos: Los datos generados del experimento fueron procesados mediante el uso del paquete estadístico SAS® [18].

Resultados

Tabla 1. Caracterización de la calidad microbiológica de leche cruda de ganado Criollo Limonero.

Periodo de lactancia (días)	Coloración	Trr (horas)	Rep X (Ufc/ml ⁻¹ leche cruda)
30 a 60	Azul-celeste	4 ^a	11.976 ^a
60 a 90	Azul-celeste	4 ^a	3.446 ^b
90 a 120	Azul-celeste	4 ^a	21.108 ^c
Total			36.530

Letras distintas en una misma columna indican diferencias ($p \leq 0,001$) entre los valores medios obtenidos.

Discusión de resultados

La vigilancia y control del estándar microbiano es necesaria en cada uno de los puntos de la cadena láctea, en el ordeño, transporte y manipulación y en el almacenamiento e incluso en su procesamiento tecnológico industrial [19].

La calidad higiénica de la leche cruda resulta de especial importancia por tratarse del contenido microbiano que en ella está presente. En la Tabla 1 se resume la calidad microbiológica de leche cruda de ganado Criollo Limonero, objeto de este estudio.

Para evaluar las pruebas de calidad microbiológica realizadas en esta investigación, las vacas se agruparon de acuerdo al periodo de lactancia correspondiente. Para el recuento estándar en placa (Rep) se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,001$) para todos los periodos respectivamente. Sin embargo a pesar de observar esta variabilidad entre las poblaciones bacterianas en los distintos periodos de lactancia, se infiere que las muestras analizadas al ser comparadas con los criterios establecidos en la

normativa [20]. Se ubica dentro de la **categoría A**, con un conteo promedio de 36.530 Ufc/ml⁻¹ leche cruda.

Por otra parte, la diferencia en el conteo de microorganismos mesófilos pudo deberse a la diferencia de concentración de nutrientes que favorecen el desarrollo microbiano en la leche, como es el caso de la lactosa [21, 22].

En cuanto al tiempo de reducción de resazurina (Trr), no se evidenciaron diferencias ($p \geq 0,05$) ubicándose en 4 horas con una coloración azul-celeste, lo que se traduce en una leche **clase I** (muy buena/excelente) para todos los periodos.

Cabe destacar que se empleó la técnica de tiempo de reducción de resazurina en lugar de la de azul de metileno, debido a que la resazurina es más sensible a los cambios en el potencial de óxido-reducción generados por la flora microbiana presente en la leche, por lo tanto los cambios en la coloración de la solución generada son más precisos y menos susceptibles al contacto con el oxígeno ambiental, que los generados cuando se utiliza azul de metileno.

Esto es debido a que la resazurina es un compuesto químico del grupo de las oxazonas [23]. Así mismo la resazurina (azul, no fluorescente) es reducida a resorufina (rosado, altamente fluorescente), por acción de enzimas oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de las células viables de los microorganismos. La resorufina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación de microorganismos [24].

Conclusiones

- La leche de ganado Criollo Limonero cumple con las exigencias de calidad microbiológica establecidas en la normativa venezolana COVENIN n° 903, 1993.
- De acuerdo a lo establecido en la norma COVENIN n° 903, 1993, la leche de ganado Criollo Limonero se ubica en una categoría A, conteniendo 36.530 Ufc/ml-1 leche cruda.
- De acuerdo a la técnica de óxido-reducción de tiempo de reducción de resazurina, la leche de ganado Criollo Limonero se ubica en la clase I, definida como muy buena a excelente.

Referencias Bibliográficas

- [1] Voight A. & Bodisco V. (Ed. Cromotip), Formación de tipos raciales lecheros adaptados al trópico venezolano, Caracas, Venezuela (1991).
- [2] Bracho I., Contreras G., Pirela M. & Zambrano S. (Astro Data SA), La raza Criollo Limonero: Una realidad para la ganadería de doble propósito. En: Avances en la ganadería de doble propósito. González-Stagnaro, C.; Soto Belloso, E. (eds), Maracaibo, Venezuela. (2002)
- [3] Rodas G., Vergara J., Moreno L., Huerta N. & Pirela M., Características al sacrificio, rasgos de la canal y rendimiento carnicero de novillos Criollo Limonero sometidos a suplementación durante la fase de ceba a pastoreo, Revista Científica. FCV-LUZ., Vol XVI, No.4, (2006), 371-380.
- [4] Rodas G. A., Vergara J., Moreno L., Huerta N., Leal M. & Pirela M., Efecto de la suplementación y maduración de carnes al vacío sobre la palatabilidad del *Longissimus dorsi* de novillos Criollo Limonero cebados a pastoreo, Revista Científica. FCV-LUZ., Vol XVII, No. 3, (2007), 280-287.
- [5] Rojas I., Aranguren M.J., Portillo M., Villasmil Y., Valbuena E., Rincón X., Contreras G. & Yañez L., Polimorfismo genético de la kappa-caseína en ganado Criollo Limonero. Revista Científica. FCV-LUZ., Vol XIX, No.6, (2011), 645-649.
- [6] Labbe, S., Abreu, O. & Perozo, N., Factores que afectan la primera lactancia de vacas criollas limoneras, Zootec. Tropical. Vol (1-2), (1983), 41-53.

- [7] Contreras, G., Zambrano, S., Pírela, M., Abreu, O. & Cañas, H., Factores que afectan la producción de leche en vacas mestizas Criollo Limonero x Holstein, *Revista Científica. FCV-LUZ*, Vol XII, No.1, (2002), 15-18.
- [8] Pírela, M., Perozo, M., Montero., Contreras, G., Valbuena, E. & Zambrano, S., Producción y calidad de la leche de vacas criollo limonero suplementadas con harina de frutos de samán (*Pithecellobium samán* (Jacq.) Benth), *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, Vol (27), (2010), 607-625.
- [9] Villasmil, Y., Bravo, R., Yañez, L., Contreras, G., Jordana, J. & Aranguren, J., Diversidad genética de la raza Criollo Limonero utilizando marcadores de ADN microsátélites. *Revista Científica. FCV-LUZ.*, Vol XVIII, No.4, (2008), 415-423.
- [10] Contreras, G., Chirinos, Z., Zambrano, Z., Molero, E. & Páez, A., Caracterización morfológica e índices zoométricos de vacas Criollo Limonero de Venezuela, *Rev. Fac. Agron La Universidad del Zulia.*, Vol 28, (2011), 91-103.
- [11] Comisión venezolana de normas industriales. COVENIN N° 409, Alimentos. Principios generales para el establecimiento de criterios microbiológicos, 1^{era} revisión, (1998), 6 p.
- [12] Comisión venezolana de normas industriales. COVENIN N° 938, Leche y productos lácteos. Método para la toma de muestras. (1983), 22 p.
- [13] Comisión venezolana de normas industriales. COVENIN N° 1126, Alimentos, Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. 1^{era} revisión, (1989), 11 p.
- [14] Comisión venezolana de normas industriales. COVENIN N° 902, Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri, 2^{da} revisión. (1987), 8 p.
- [15] Clavijo, M, La calidad de la leche en Venezuela. Interpretación de los análisis para su control. Trabajo de ascenso. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela, (1997), 93 p.
- [16] Vizcarrondo, C. & Martin, E., Leche y derivados lácteos. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Farmacia. Unidad de Ciencia de los Alimentos. Caracas, Venezuela, (1999), pp. 287.
- [17] Guía práctica. Cátedra Ciencia y tecnología de la leche. Introducción al control de calidad de la leche cruda. FCV-LUZ. (2003), 24 p.
- [18] S.A.S, Institute, INC., Statistical Analysis System, version 6.12. The Institute INC, Cary, NC, USA. (2003)
- [19] Zambrano, J. & Grass, J., Valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en la asociación de productores de leche de sotara-asproleso, mediante pruebas indirectas de resazurina y azul de metileno, *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias.*, Vol 6, No. 2 (2008), pg. 57-66.
- [20] Comisión venezolana de normas industriales., COVENIN N° 903. Leche cruda. (1993), 10 p.
- [21] Carrillo, B., Moreira, V. & González, J., Evaluación del recuento total de bacterias en leche de centros de acopio, *Agro sur.*, Vol 37, No. 3, (2010), 200-208.
- [22] Manfrin, K., Andreani, D. & Rodríguez, D., Calidad microbiológica natural de la leche durante el proceso de ordeño y después de refrigerarse, *Revista CES Medicina, Veterinaria y Zootecnia.*, Vol 7, No. 1, (2012), 11-21.

[23] Shekhar, C., Motina, E. & Kumar, S., Microbiological quality of raw milk and its public health significance. *J. Dairying, Foods & H.S.*, Vol 29, No. 1, (2010), 15-18.

[24] Escobar, L., Rivera, A. & Aristizabal, F., Estudio comparativo de los métodos de resazurina y mtt en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas, *Revista de la Facultad de Química Farmaceutica.*, Vol 17, No. 1, (2010), 67-74.

