

## Enumeración de coliformes en leche natural y pasterizada (\*)

Por G. Suárez Fernández

El grupo *coliforme*<sup>1</sup> comprende todas las bacterias de forma bacilar aerobias y anaerobias facultativas, gramnegativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas a 35-37° C en menos de 48 horas.

Son miembros de este grupo tanto las bacterias de origen fecal como las de cualquier otro origen, siempre que sus propiedades se ajusten a la definición anterior.

Además de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Escherichia* y *Aerobacter* deben incluirse en este grupo algunas especies, fermentadoras de la lactosa, de otros géneros<sup>2</sup> (*Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, etc.)

El concepto expuesto y aplicado por la OMS<sup>1</sup> en la confección de normas internacionales para el agua potable tiene un significado muy preciso en el control higiénico-sanitario o industrial de la leche, puesto que la presencia en este alimento de cualquiera de los tipos de bacterias mencionados sugiere, en proporción al número presente, el grado de abandono de determinadas reglas de higiene durante la producción, transformación o almacenamiento.

(\*) El contenido de este estudio constituyó, en parte, una aportación del autor y del profesor Ovejero a la Federación Internacional de Lechería (sesión anual, junio 1966), a través del grupo de trabajo D y Comisión VI, para la elaboración de normas de análisis relativas a la enumeración de bacterias coliformes en leche natural y pasterizada.

La utilidad de la determinación del *índice colibacilar* o *número de coliformes* por ml en la leche se basa en los siguientes hechos:<sup>3,4</sup>

a) los microorganismos coliformes se hallan casi siempre en la microflora de la leche fresca; b) pueden resistir tratamientos de desinfección del equipo lechero con mayor facilidad que otros tipos de bacterias dando lugar, cuando la limpieza y desinfección del material no son correctas, a focos de contaminación; c) se encuentran presentes con gran frecuencia en los casos de recontaminación de la pasteurizada; y d) su fácil detección y numeración en la leche por medio de sencillas técnicas de rutina.

El recuento de *coliformes* en leche natural<sup>5,6</sup> debería hacerse inmediatamente a la obtención de la leche en el establo o protegiendo las muestras, tomadas de origen, por el frío ya que la colimetría realizada a partir de muestras recogidas en el muelle de recepción de una industria lechera deja la interrogante de si una determinada cantidad de *coliformes* se debe a una contaminación inicial o a un desarrollo microbiano posterior a partir de un pequeño número de gérmenes.

Este mismo fenómeno, aunque en menor proporción, puede producirse en la leche pasteurizada cuando es mantenida a temperatura ambiente en los puestos de venta.

La enumeración de coliformes en leche es una técnica de rutina que no excluye, sino que exige frecuentemente, la investigación cualitativa e identificación de las especies aisladas con el fin de fijar el origen fecal o no de una contaminación. Con frecuencia esta investigación unida a la prueba de fosfatasa y resistencia térmica de las especies aisladas es de gran utilidad en el control industrial de la leche pasteurizada, permitiendo obtener conclusiones de gran valor.

Dada la importancia industrial y sanitaria de este último aspecto será objeto exclusivo de una próxima publicación, ocupándonos ahora de las técnicas de enumeración de *coliformes* de aplicación diaria en el control higiénico-sanitario de la leche.

Existen gran número de publicaciones referentes al tema de *colimetría* en leche y es elevado el número de medios de cultivo propuestos para la determinación cuantitativa de coliformes en dicho producto; sin embargo, faltaba en tan abundante literatura un estudio comparativo a gran escala de los medios de enumeración más en uso y recomendados

por diversos autores y organismos interesados en el estudio de los problemas de la salud pública.<sup>1,7,8,9</sup>

La Federación Internacional de Lechería (FIL) siguiendo la línea establecida de publicar normas "standard" internacionales de análisis de leche y sus derivados acordó crear dentro de la Comisión VI,<sup>10</sup> de análisis microbiológicos, un grupo de trabajo D, presidido por el doctor RITTER e integrado por investigadores de ocho países europeos, recayendo la representación española en el profesor OVEJERO, quien solicitó nuestra colaboración para la realización del programa de trabajo encomendado por la citada Comisión.

El tema objeto de programación fue el de la presente publicación y ésta representa, en parte, la contribución española a la confección de una próxima norma "standard" internacional referente al conteo de *coliformes* en la leche.

## MATERIALES Y METODOS

Los métodos utilizados siguen en líneas generales las directrices establecidas en el programa de trabajo del grupo D de la Comisión VI de la FIL,<sup>10</sup> a fin de determinar los medios y métodos más idóneos al conteo de bacterias *coliformes* en leches natural y pasteurizada.

### 1. MUESTRAS

Se analizaron un total de 60 muestras de leche de las cuales 30 eran de leche fresca (natural) y 30 de leche pasteurizada.

Las muestras de leche natural fueron recogidas en la plataforma de recepción de una industria lechera siguiendo debidas normas de asepsia, seleccionando partidas de distintas zonas de recogida y con temperaturas diferentes a su llegada al muelle de recepción.

Habida cuenta de que el objeto de este estudio era comparar los resultados obtenidos en distintos medios selectivos, en las muestras de leche pasteurizada se siguió también el criterio de utilizar muestras de diferentes tenores en bacterias *coliformes*, recogiendo las muestras tanto en la propia planta de pasteurización como en los puestos de venta,

después de varias horas de exposición a la temperatura ambiente de los envases que contenían la leche pasteurizada.

El análisis de las muestras fue siempre inmediato a su recogida.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios seleccionados fueron:

2.1 *Medios líquidos*: caldo Mac Conkey (Difco núm. 0020) y caldo bilis verde brillante (Difco núm. 0007).

2.2 *Medios sólidos*: agar lactosa desoxicolato (Difco núm. 0420) y agar bilis rojo violeta (Difco núm. 0012).

Los medios se utilizaron siguiendo exactamente las instrucciones dadas por el Manual Difco.<sup>11</sup>

Asimismo, el conteo y diferenciación de colonias sobre estos medios se realizó de acuerdo con las normas del citado Manual.

## 3. TECNICAS.

En la siembra de las muestras se siguieron fielmente los preceptos de la Norma Internacional núm. 3 de la FIL<sup>12</sup> que hace referencia al conteo de colonias bacterianas a partir de leche fluida.

En los medios sólidos la siembra se realizó de la forma convencional descrita por la Norma núm. 3<sup>12</sup> pero una vez solidificado y frío el medio contenido en las placas de Petri, ya sembrado, se cubría la superficie del medio con una fina película del propio medio-agar. De esta forma se obtenían colonias subsuperficiales de pequeño tamaño pero fáciles de contar y diferenciar.

En este tipo de medios se sembraron 6 placas de Petri por dilución, incubando durante 22 horas tres placas a 30° C y tres a 37° C.

Para el estudio de medios líquidos cada dilución de una muestra se sembró en dos series de nueve tubos con campana de Durham y llenos de medio hasta una altura de 8 cm. (tubos de ensayo de 18 cm. por 18 mm.).

Las cantidades sembradas eran de 10, 1 y 0,1 cc. a partir de diluciones de leche en solución Ringer al 1:4. Normalmente se emplearon diluciones de 1:10<sup>-2</sup> a 1:10<sup>-5</sup> para leche natural y diluciones de 1:10 a 1:10<sup>-4</sup> para leche pasteurizada recogida de los puestos de venta,

utilizándose solamente la primera 1:10 y leche pura sin diluir para las muestras de leche pasteurizada recogidas en la planta de pasteurización.

La numeración de *coliformes* se realizó, de acuerdo con la técnica de MC CRADY,<sup>13</sup> de número más probable (MPN), para tres series paralelas de tres tubos por cada cantidad sembrada. Se consideró positivo todo tubo con formación de gas en la campana de Durham.

En los medios sólidos el conteo se refería a la media del número de colonias obtenida del recuento de tres placas de Petri.

## 4. CONTROL MORFOLOGICO DE POSITIVIDAD COLIFORME.

Se realizó mediante el estudio microscópico de preparaciones teñidas por el método de Gram (modificación de BURKE y KOPELOFF, citados por *Manual of microbiological methods*<sup>14</sup>).

Por cada muestra fue examinado un tubo de la serie (el de menor dilución positiva) así como las colonias típicas de 1 mm., normalmente consideradas como *coliformes* y colonias de menor tamaño ("pin-point" o punta de alfiler), de una de las tres placas semejantes de cada uno de los medios sólidos agar bilis rojo de violeta y agar lactosa desoxicolato.

Después de este control se consideró definitivamente positivo todo tubo conteniendo bacterias de morfología *coliforme*, aun en el caso de hallarse presente otro tipo de bacteria, si ésta no producía gas a partir de la lactosa en una vez obtenida en cultivo puro.

## 5. ANALISIS ESTADISTICO.

Se utilizaron como módulos los valores logarítmicos del número de bacterias por ml y se calculó estadísticamente el grado de significación de la diferencia entre medias, de cada método, mediante un análisis de varianza y determinación de los valores t y P para cada par de factores comparados.<sup>15</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados absolutos, expresados en logaritmos, se reflejan detalladamente en las tablas I y II y los comparativos referentes a medios y métodos o técnicas empleadas, así como su valoración estadística, se expresan en los cuadros números 1 al 8 inclusive.

## 1. MEDIOS Y METODOS.

### 1.1 *Leche natural.*

De la comparación de las medias extremas dentro de los medios sólidos, líquidos y entre ambos (tabla I, cuadro número 1) resultó que las diferencias entre las medias correspondientes al caldo Mac Conkey incubado a 30° C durante 48 horas y al caldo bilis verde brillante a 37° C por espacio de 72 horas fueron ligeramente significativas.

El mismo grado de significación se halló para el valor diferencial de las medias referentes al caldo Mac Conkey incubado a 30° C (48 horas) y el agar bilis rojo violeta incubado a 37° C (22 horas).

La significación resultó en cambio negativa para los valores extremos de x en los medios sólidos y sólidos/líquidos (cuadro número 1).

### 1.2 *Leche pasteurizada.*

Las diferencias para los valores extremos de x resultaron altamente significativas en la comparación de caldo bilis verde brillante incubado a 30° C durante 24 horas e incubado a 37° C (72 horas) y de este último método y agar lactosa desoxicolato incubado a 30° (22 horas).

Carecieron de significación las diferencias de los medios sólidos y fueron ligeramente significativas las de los medios líquidos/sólidos (cuadro número 5).

## 2. MEDIOS.

### 2.1 *Leche natural.*

Comparadas las medias más altas dentro de los medios líquidos, sólidos y líquidos/sólidos las diferencias no pudieron considerarse significativas (cuadro número 2).

### 2.2 *Leche pasteurizada.*

Los valores más altos de x no mostraron diferencias significativas (cuadro número 6).

## 3. METODOS.

### 3.1 *Leche natural.*

#### 3.1.1 Tiempos de incubación.

Del análisis de las medias obtenidas para una misma temperatura y medio de cultivo, mediante incubaciones de 48 y 72 horas, en

los medios líquidos, no se obtuvieron valores de diferencia significativa (cuadro número 3).

#### 3.1.2 Temperaturas de incubación.

Del resultado de comparar cada medio con él mismo, variando únicamente la temperatura, no se dedujo significación alguna la diferencia entre las respectivas medias (cuadro número 4).

### 3.2 *Leche pasteurizada.*

#### 3.2.1 Tiempos de incubación.

Utilizando como única variable el tiempo de incubación no se obtuvieron tampoco diferencias significativas (cuadro número 7) en la leche pasteurizada.

#### 3.2.2 Temperaturas de incubación.

La temperatura de incubación ha determinado una diferencia altamente significativa entre las medias obtenidas en caldo bilis verde brillante incubado durante 48 horas y ligeramente significativa en el mismo medio incubado 72 horas.

No han mostrado significación alguna las diferencias analizadas en los cuatro casos restantes (cuadro número 8).

## 4. CONTROL MICROSCOPICO DEL ASPECTO COLIFORME.

### 4.1 *Medios líquidos.*

En todos los tubos de cultivo con producción de gas existían gérmenes *coliformes*.

En tres de las muestras de leche natural pudimos observar la presencia, además, de cocos grampositivos en los tubos que contenían caldo Mac Conkey tanto incubado a 30° C como a 37° C, en cambio no existían en los tubos de caldo bilis verde brillante sembrados a partir de dichas muestras.

Estos cocos fueron aislados y clasificados como pertenecientes al género *Streptococcus*.<sup>10</sup>

### 4.2 *Medios sólidos.*

Al mismo tipo de control (preparación teñida y estudio microscópico de la misma) fueron sometidas las colonias presuntamente



positivas y dudosas de las placas de agar bilis rojo violeta y agar desoxicolato, con el siguiente resultado:

a) Agar bilis rojo violeta: aspecto *coliforme* de todos los gérmenes integrantes de las colonias típicas y dudosas (poco numerosas).

b) Agar lactosa desoxicolato: nueve muestras de leche natural y cuatro de pasteurizada dieron origen a colonias, de escaso desarrollo y color rosa, de microorganismos de forma cocoide grampositivos, catalasa positivos, que fueron clasificados de acuerdo al *Bergey's Manual*,<sup>10</sup> como del género *Micrococcus*. Estas colonias se encontraban entremezcladas con colonias de gérmenes *coliformes* y no siempre se distinguían bien por su desarrollo e intensidad de color, producido por viraje del medio.

## 5. DISCUSION.

### 5.1 Leche natural.

Los resultados obtenidos para la leche natural (tabla I) y la síntesis de estos resultados determinada por un análisis de varianza aplicado a la diferencia entre medias (cuadros núms. 1 al 4 inclusivos), nos ponen de manifiesto que las técnicas empleadas (métodos) y medios utilizados dan lugar a contajes de bacterias coliformes muy parecidos, no existiendo diferencias realmente significativas.

Es de notar, sin embargo, que en todos los casos existió una diferencia relativa a los tiempos de incubación a favor de una incubación más prolongada (tres días) (tabla I) y aunque estas diferencias no hayan resultado significativas (cuadro número 3) su existencia repetida habla en favor de una incubación de 72 horas.

Al no ser suficiente la enumeración cuantitativa sobre un medio, ni tampoco la técnica seguida en dicha enumeración para establecer diferencias precisas en cuanto al comportamiento de medios y métodos, habría que considerar otros aspectos técnicos, como claridad en la interpretación de las reacciones, desarrollo de las colonias y posibilidad de diferenciación de éstas, tiempo de incubación, comodidad de una técnica para su realización como método de rutina, eficacia selectiva del medio, etc.

Concretamente en la leche natural el número de diluciones a ensayar debe ser de 4-5 como mínimo para cubrir las cantidades variables de *coliformes* por cc. de leche. El número de tubos sembrados por

tanto debe ascender a 36 ó 45 por muestra convirtiéndose esta técnica *colimétrica* en engorrosa por el tiempo que requiere su ejecución.

La posibilidad de utilizar un medio sólido simplifica la técnica permitiendo, además, una lectura a las 22-24 horas.

A la hora de señalar una preferencia por un medio sólido deberíamos tener en cuenta la posible presencia de gérmenes no *coliformes* en el medio agar desoxicolato, que pueden dar lugar a confusión al realizar un contaje ya que la apariencia de las colonias es, en algunos casos, semejante, como hemos podido comprobar en el curso de esta investigación.

El medio agar bilis rojo violeta se mostró también superior al de desoxicolato en claridad para la diferenciación de colonias a las 22 horas de incubación, siendo éstas de mayor tamaño y color rojo vivo más intenso que en el medio al desoxicolato.

Las consideraciones expuestas nos llevan a señalar el medio de agar bilis rojo violeta como el más idóneo para la enumeración de gérmenes *coliformes* en leche natural, incubado a temperaturas comprendidas entre 30°C y 37°C, no habiendo podido comprobar en este medio las deficiencias a que hacen referencia MORRIS y CERNY.<sup>11</sup>

### 5.2 Leche pasteurizada.

En la leche pasteurizada las diferencias entre métodos y medios han sido realmente significativas (cuadro número 5) siendo el factor que más influye en estas diferencias la temperatura de incubación (cuadro número 8).

Cabe pensar, según esto, que la microflora *coliforme* de la leche pasteurizada tiene un comportamiento distinto frente a los medios y métodos estudiados a la de la leche natural, bien porque su origen sea distinto o porque el tratamiento térmico (relación tiempo/temperatura mínimos) realizó una verdadera selección en dicha microflora.

No se pueden deducir, sin embargo, ventajas claras del empleo de uno u otro medio (cuadro número 6) y en cuanto al tiempo de incubación tiene plena validez lo dicho para la leche natural.

Los factores que podrían determinar la elección de un medio sólido o líquido son la posibilidad de sembrar mayores volúmenes de leche en los medios líquidos, condición importante habida cuenta del escaso número de *coliformes* que debe contener la leche pasteurizada, así

como la acción fermentativa, con producción de gas, a partir de la lactosa y de otra parte la mayor brevedad y rapidez en leer los resultados de la técnica de contaje en medio sólido, pero esta última condición queda un poco debilitada por el escaso número de colonias que cabe esperar de 1 cc. de leche pasteurizada y la no conveniencia de sembrar cantidades mayores de leche en cada placa de Petri.

Si bien en las muestras sometidas a análisis en el presente estudio contenían, en parte, un número elevado de coliformes, debido al propio planteamiento del trabajo, esto no debe suceder en el control de rutina normal de la leche pasteurizada y por tanto el número de diluciones a ensayar será pequeño (leche pura y diluida al 1/10) con lo que la ejecución de la técnica de contaje en medios líquidos se facilita enormemente en la leche pasteurizada y con relación a la leche natural.

De los medios líquidos el caldo bilis verde brillante parece superior, según el resultado de nuestra investigación, al caldo Mac Conkey, impidiendo el crecimiento de gérmenes grampositivos, que podrían enmascarar la reacción fermentativa debida al grupo *coliforme*, dando lugar a falsos positivos o negativos por fermentación de la lactosa en el primer caso o inhibición competitiva de las bacterias *coliformes* en el segundo.

La temperatura recomendada sería la de 37° C para los medios líquidos y entre 30° C y 37° C para medios sólidos.

De lo anteriormente expuesto se deducen ligeras ventajas para el empleo de caldo bilis verde brillante sobre el agar bilis rojo violeta en el control de gérmenes en leche pasteurizada.

TABLA I  
Leche natural.—Logaritmo del número de coliformes por ml.

Muestra N.º	Incubación Temp.º Días/horas	MEDIOS LÍQUIDOS, MPN de 3 series						MEDIOS SÓLIDOS, media de 2 series					
		Caldo Mac Conkey			Caldo Bilis Verde Brillante			Agar Lact. Desoxic.			Agar Bilis Rojo Viol.		
		30° C			37° C			30° C			37° C		
		2	3	2	3	2	3	22-24	22-24	22-24	22-24	22-24	22-24
1	.....	3.17	3.60	2.90	3.07	2.95	2.96	4.48	4.40	4.30	4.21	4.21	4.21
2	.....	4.30	4.33	4.33	4.33	4.77	4.77	3.00	3.20	3.30	3.17	3.17	3.17
3	.....	4.47	4.77	4.77	4.77	4.60	4.60	4.38	4.48	4.65	4.74	4.74	4.74
4	.....	3.77	4.17	4.00	4.00	3.00	3.00	3.60	3.60	3.90	3.87	3.87	3.87
5	.....	3.17	3.17	4.32	4.52	3.17	3.60	4.47	4.39	4.17	4.12	4.12	4.12
6	.....	4.17	4.31	4.35	4.35	3.30	3.30	3.90	4.00	4.32	4.32	4.32	4.32
7	.....	4.07	4.35	4.77	4.77	3.47	3.47	3.65	3.77	3.65	3.81	3.81	3.81
8	.....	4.30	4.30	4.90	4.90	4.60	4.60	4.74	4.69	4.81	4.74	4.74	4.74
9	.....	4.77	4.77	4.60	4.60	4.69	4.69	4.60	4.62	4.60	4.54	4.54	4.54
10	.....	2.77	4.17	4.30	4.30	4.77	4.77	4.00	3.90	3.84	3.47	3.47	3.47
11	.....	2.00	4.52	4.16	4.16	3.60	3.60	3.39	3.60	3.30	4.34	4.34	4.34
12	.....	4.07	4.32	3.07	3.07	3.95	3.95	4.34	4.39	4.49	4.21	4.21	4.21
13	.....	4.60	4.60	4.04	4.04	3.90	4.07	3.36	3.39	3.47	3.70	3.70	3.70
14	.....	4.95	4.95	4.33	4.33	4.04	4.04	4.38	4.30	4.34	3.95	3.95	3.95
15	.....	2.30	2.30	4.61	4.61	3.77	3.77	3.90	4.03	4.06	4.05	4.05	4.05
16	.....	4.77	4.77	3.17	3.17	3.77	3.77	4.49	4.49	4.49	4.49	4.49	4.49
17	.....	4.16	4.16	4.30	4.30	4.01	4.61	4.14	4.04	4.14	4.12	4.12	4.12
18	.....	4.07	4.07	4.07	4.07	3.14	3.14	4.00	3.84	4.61	4.62	4.62	4.62
19	.....	4.07	4.47	3.60	3.60	3.90	3.90	3.95	4.08	4.04	4.08	4.08	4.08
20	.....	4.31	4.31	4.52	4.52	4.95	4.95	4.72	4.68	4.59	4.63	4.63	4.63
21	.....	2.95	2.95	4.47	4.47	4.04	4.23	4.39	4.49	4.27	4.32	4.32	4.32
22	.....	4.47	4.95	4.90	4.90	3.60	3.60	4.77	4.78	4.62	4.61	4.61	4.61
23	.....	2.77	2.77	4.77	4.77	4.33	4.33	4.69	4.69	4.47	4.46	4.46	4.46
24	.....	4.33	4.77	4.32	4.32	3.00	3.30	3.17	3.27	3.32	4.47	4.47	4.47
25	.....	4.30	4.30	4.07	4.07	4.30	4.30	4.39	4.27	4.35	4.32	4.32	4.32
26	.....	4.16	4.16	4.77	4.77	4.77	4.77	4.44	4.43	4.46	4.46	4.46	4.46
27	.....	4.60	4.60	4.95	4.95	4.95	4.95	4.51	4.63	4.59	4.61	4.61	4.61
28	.....	4.32	4.32	2.77	2.77	4.32	4.32	4.17	4.20	4.23	4.23	4.23	4.23
29	.....	4.43	4.43	2.30	2.30	4.77	4.77	4.56	4.58	4.60	4.53	4.53	4.53
30	.....	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.54	4.47	4.75	4.77	4.77	4.77
MEDIA *		4.00	4.21	4.17	4.18	4.05	4.08	4.17	4.18	4.22	4.22	4.27	4.27
Log. Suma **		5.84	5.95	5.96	5.99	5.88	5.89	5.84	5.83	5.81	5.87	5.87	5.87
Log. Media ***		4.36	4.47	4.48	4.51	4.40	4.41	4.38	4.35	4.38	4.39	4.39	4.39

\* Media de los valores logarítmicos de cada columna.

\*\* Logaritmo de la suma total numérica de coliformes.

\*\*\* Logaritmo de la media numérica.

TABLA II  
Leche pasteurizada.—Logaritmo del número de coliformes por ml.

Muestra N.º	Incubación Temp.º	MEDIOS LIQUIDOS, MPN de 3 series						MEDIOS SOLIDOS, media de 2 series					
		Caldo Mac Conkey			Caldo Bilis Verde Brillante			Agar. Lact. Desoxic.			Agar Bilis Rojo Viol.		
		30° C	2	3	37° C	2	3	30° C	22 - 24	37° C	30° C	22 - 24	37° C
f	Días/horas	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3
1	.....	0,000	1,431	1,146	1,146	0,845	2,318	2,354	1,113	1,000	1,146	1,000	1,000
2	.....	3,069	3,778	3,609	3,609	3,602	3,602	3,318	2,518	2,602	2,612	2,707	2,707
3	.....	0,477	2,778	1,000	1,000	1,041	2,000	2,301	2,301	2,000	2,491	2,505	2,505
4	.....	1,000	1,000	0,477	0,477	1,041	1,230	2,000	2,653	2,000	2,676	2,716	2,716
5	.....	0,301	0,301	0,041	0,230	0,301	0,301	0,041	2,079	0,903	2,041	2,176	2,176
6	.....	2,176	2,176	2,301	2,778	1,000	1,000	2,778	2,498	2,633	2,505	2,477	2,477
7	.....	0,000	1,431	1,431	1,431	0,000	1,431	1,477	1,462	1,361	1,491	1,342	1,342
8	.....	0,000	0,000	1,000	1,477	0,000	1,301	1,301	1,477	1,342	1,612	1,591	1,591
9	.....	0,602	0,602	0,602	0,602	0,000	0,000	1,000	1,690	1,690	1,707	1,785	1,785
10	.....	0,477	2,778	1,041	1,230	0,000	1,301	2,305	1,716	1,732	1,707	1,785	1,785
11	.....	3,778	3,778	3,778	3,778	3,602	3,602	3,778	2,698	2,732	2,725	2,778	2,778
12	.....	1,301	1,301	0,000	1,431	1,000	1,000	1,000	2,096	2,053	2,068	2,060	2,060
13	.....	2,176	2,176	2,602	2,602	2,301	2,301	2,354	2,612	2,477	2,477	2,579	2,579
14	.....	3,602	3,602	3,778	3,778	3,000	3,778	3,778	2,491	2,380	2,477	2,505	2,505
15	.....	2,602	2,602	2,477	2,477	2,602	2,602	3,602	2,204	2,201	2,230	2,283	2,283
16	.....	1,477	1,477	1,041	1,041	1,041	1,041	1,477	2,778	2,322	2,301	2,311	2,311
17	.....	3,301	3,329	3,301	3,477	2,146	2,146	2,301	0,954	1,041	1,176	1,230	1,230
18	.....	2,778	2,778	2,477	2,778	2,778	2,778	2,778	2,301	1,544	2,437	2,477	2,477
19	.....	2,431	2,431	2,778	2,778	2,477	2,477	2,477	2,531	2,624	2,579	2,591	2,591
20	.....	3,609	3,609	3,778	3,778	3,778	3,778	3,778	2,711	2,681	2,698	2,720	2,720
21	.....	1,041	1,041	1,041	1,230	1,301	2,301	2,602	2,911	2,897	2,913	2,954	2,954
22	.....	1,230	1,230	0,903	2,328	2,305	2,305	2,477	1,278	1,361	1,491	1,322	1,322
23	.....	3,778	3,778	3,609	3,609	3,477	3,477	3,778	2,491	2,495	2,491	2,537	2,537
24	.....	0,477	0,477	0,000	0,000	1,041	1,041	1,000	2,897	2,892	2,892	2,897	2,897
25	.....	3,602	3,602	3,778	3,778	3,602	3,602	3,778	2,720	2,792	2,759	2,792	2,792
26	.....	3,609	3,778	3,602	3,602	3,602	3,778	3,778	2,544	2,547	2,531	2,557	2,557
27	.....	2,306	2,305	2,301	3,329	2,000	2,000	2,000	2,863	2,778	2,778	2,832	2,832
28	.....	2,000	2,000	2,301	2,778	1,431	1,431	1,041	1,544	1,568	1,612	1,602	1,602
29	.....	1,518	1,518	0,903	2,328	1,602	1,602	2,477	2,230	2,204	2,281	2,324	2,324
30	.....	2,301	3,329	2,301	3,329	2,104	2,104	2,318	2,904	2,676	2,604	2,720	2,720
MEDIA		1,918	2,213	2,013	2,306	1,867	2,189	2,414	2,185	2,194	2,261	2,267	2,267
Log. Suma		4,561	4,639	4,601	4,664	4,451	4,556	4,681	3,960	3,932	3,944	3,978	3,978
Log. Media		3,083	3,162	3,132	3,186	2,974	3,079	3,204	2,482	2,454	2,466	2,501	2,501

CUADRO NUM. 1  
Leche natural - Medios y métodos  
(Valores extremos de  $\bar{x}$ )

MEDIOS: MÉTODOS	RESULTADOS DEL ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. Medios sólidos					
ALDC: 30° C	4,17	0,19	0,86	> 0,3	—
ABRV: 37° C	4,27				
2. Medios líquidos					
CMcK: 30° C-2 días	4,00	0,42	1,67	> 0,05	+
CBVB: 37° C-2 días	4,28				
3. M. sólidos/líquidos					
ALDC: 30°	4,17	0,27	0,82	> 0,4	—
CBVB: 37° C-3	4,28				
4. M. líquidos/sólidos					
CMcK: 30° C-2 días	4,00	0,34	1,80	> 0,05	+
ABRV: 37° C	4,27				

Clave:

ALDC = Agar lactosa desoxicolato.

ABRV = Agar bilis rojo violeta.

CMcK = Caldo Mac Conkey.

CBVB = Caldo bilis verde brillante.

Simbolos:

$\bar{x}$  = Media de los valores logarítmicos.

S<sup>2</sup> = Varianza.

t = "t" de "Student".

P = Grado de significación.

— = Negativa.

+ = Ligeramente significativa.

CUADRO NUM. 2  
*Leche natural - Medios*  
 (Valores más altos de  $\bar{x}$ )

MEDIOS	RESULTADOS DEL ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. Medios líquidos					
CMcK: 30° C-3 días	4,21	0,38	0,43	> 0,6	—
CBVB: 37° C-3 días	4,28				
2. Medios sólidos					
ALDC: 37° C	4,18	0,17	0,83	> 0,3	—
ABRV: 37° C	4,27				
3. M. líquidos/sólidos					
CBVB: 37° C-3 días	4,28	0,22	0,08	> 0,9	—
ABRV: 37° C	4,27				

Clave y símbolos: Cuadro núm. 1

CUADRO NUM. 3  
*Leche natural - Tiempos de incubación*  
 (Única variable: días de incubación)

MEDIO: MÉTODO	RESULTADOS DEL ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. CMcK: 30° C-2 días	4,00	0,50	1,16	> 0,2	—
CMcK: 30° C-3 días	4,21				
2. CMcK: 37° C-2 días	4,17	0,45	0,06	> 0,9	—
CMcK: 37° C-3 días	4,18				
3. CBVB: 30° C-2 días	4,05	0,39	0,18	> 0,8	—
CBVB: 30° C-3 días	4,08				
4. CBVB: 37° C-2 días	4,22	0,32	0,41	> 0,6	—
CBVB: 37° C-3 días	4,28				

Clave y símbolos: Cuadro núm. 1.

CUADRO NUM. 4  
*Leche natural - Temperaturas de incubación*  
 (Única variable: temperatura)

MEDIO: MÉTODO	RESULTADO DEL ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. CMcK: 30° C-2 días	4,00	0,49	0,49	> 0,3	—
CMcK: 37° C-2 días	4,17				
2. CMcK: 30° C-3 días	4,21	0,46	0,25	> 0,8	—
CMcK: 37° C-3 días	4,18				
3. CBVB: 30° C-3 días	4,05	0,38	1,06	> 0,2	—
CBVB: 37° C-2 días	4,22				
4. CBVB: 30° C-3 días	4,08	0,34	1,31	> 0,1	—
CBVB: 37° C-3 días	4,28				
5. ALDC: 30° C-22 horas	4,17	0,22	0,08	> 0,9	—
ALDC: 37° C-22 horas	4,18				
6. ABRV: 30° C-22 horas	4,22	0,17	1,14	> 0,2	—
ABRV: 37° C-22 horas	4,27				

Clave y símbolos: Cuadro núm. 1.



CUADRO NUM. 5  
Leche pasteurizada - Medios y métodos

(Valores extremos de  $\bar{x}$ )

MEDIOS: MÉTODOS	RESULTADOS DE ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. Medios sólidos					
ALDC: 30° C	2,18	0,32	0,56	> 0,5	—
ABRV: 37° C	2,26				
2. Medios líquidos					
CBVB: 30° C-2 días	1,86	1,07	2,75	> 0,01	+ +
CBVB: 37° C-3 días	2,57				
3. M. sólidos/líquidos					
ALDC: 30° C	2,18	0,50	3,00	> 0,01	+ +
CBVB: 37° C-3 días	2,57				
4. M. líquidos/sólidos					
CBVB: 30° C-2 días	1,86	0,90	1,6	> 0,05	+
ABRV: 37° C					

Clave y símbolos: Cuadro núm. 1. + + = Altamente positiva

CUADRO NUM. 6  
Leche pasteurizada - Medios

(Valores más altos de  $\bar{x}$ )

MEDIOS	RESULTADOS DE ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. Medios líquidos					
CMcK: 37° C-3 días	2,30	1,06	1,04	> 0,3	—
CBVB: 37° C-3 días	2,57				
2. Medios sólidos					
ALDC: 37° C	2,19	0,30	0,54	> 0,5	—
ABRV: 37° C	2,26				
3. M. líquidos/sólidos					
CBVB: 37° C-3 días	2,57	0,52	1,65	> 0,1	—
ABRV: 37° C	2,26				

Clave y símbolos: Cuadro núm. 1.

CUADRO NUM. 7  
Leche pasteurizada - Tiempos de incubación  
(Única variable: días de incubación)

MEDIO: MÉTODO	RESULTADOS DEL ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. CMcK: 30° C-2 días	1,92	1,58	0,90	> 0,3	—
CMcK: 30° C-3 días	2,21				
2. CMcK: 37° C-3 días	2,01	1,49	0,95	> 0,3	—
CMcK: 37° C-3 días	2,30				
3. CBVB: 30° C-2 días	1,86	1,19	1,12	> 0,2	—
CBVB: 30° C-3 días	2,19				
4. CBVB: 37° C-2 días	2,41	0,72	0,73	> 0,4	—
CBVB: 37° C-3 días	2,57				

Clave y símbolos: Cuadro núm. 1.

CUADRO NUM. 8  
Leche pasteurizada - Temperaturas de incubación  
(Única variable: temperatura)

MEDIO: MÉTODO	RESULTADOS DEL ANÁLISIS				
	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	t	P	Significación
1. CMcK: 30° C-2 días	1,92	1,66	0,3	> 0,7	—
CMcK: 37° C-2 días	2,01				
2. CMcK: 30° C-2 días	2,21	1,41	0,3	> 0,7	—
CMcK: 37° C-3 días	2,30				
3. CBVB: 30° C-2 días	1,86	1,09	2,09	> 0,02	+ +
CBVB: 37° C-2 días	2,41				
4. CBVB: 30° C-3 días	2,19	0,3	0,13	> 0,8	—
CBVB: 37° C-3 días	2,57				
5. ALDC: 30° C	2,18	0,81	1,80	> 0,05	+
ALDC: 37° C	2,19				
6. ABRV: 30° C	2,26	0,3	0,13	> 0,8	—
ABRV: 37° C	2,27				

Clave y símbolos: Cuadros núm. 1 y núm. 5.

## RESUMEN

Se sometieron a un estudio experimental comparativo cuatro medios de cultivo selectivos para el grupo *coliforme* de bacterias. De éstos dos eran líquidos (caldo Mac Conkey y caldo bilis verde brillante) y dos sólidos (agar lactosa desoxicolato y agar bilis rojo violeta) y considerados como de uso más extendido en la determinación del índice *colimétrico* en la leche.

La investigación se llevó a efecto a partir de treinta muestras de leche natural y treinta de leche pasteurizada y con el fin de precisar la eficacia comparativa de los citados medios en la detección y enumeración de la microflora *coliforme* de la leche.

De los resultados obtenidos se deduce que, por lo que se refiere a la leche natural, no existen diferencias significativas entre medios y técnicas como para decidir el empleo de unos u otros por lo que, superado el aspecto cuantitativo de la enumeración de coliformes, la elección de un medio de conteo debería hacerse basándose en condiciones de orden cualitativo o técnico como son: claridad en la interpretación de resultados, desarrollo de las colonias, capacidad selectiva del medio, tiempo de incubación, facilidad en la ejecución de una técnica de forma rutinaria, etc.

Siguiendo el anterior razonamiento creemos que el medio agar bilis rojo violeta sería el indicado a utilizar como método de rutina en el control de bacterias *coliformes* en leche natural.

Esta afirmación se basa tanto en sus cualidades selectivas, período de incubación corto (22 horas) fácil desarrollo y diferenciación de las colonias, como en la complejidad de la técnica de siembra (elevado número de diluciones y tubos a sembrar) en medios líquidos cuando se trata de un análisis de leche natural con una cifra de *coliformes* que puede oscilar entre límites amplios.

Respecto a la leche pasteurizada existieron diferencias significativas entre medios y métodos pero no entre medios, debiéndose aquéllas fundamentalmente a la temperatura de incubación. Tendría validez, en parte, por tanto lo dicho para la leche natural si en la leche pasteurizada no existiese una nueva condición limitativa para el empleo de medios sólidos como técnica para determinar el índice *colibacilar*, siendo ésta que, existiendo escaso número de gérmenes de este tipo, cuando la pas-

terización es correcta y la leche se conserva a bajas temperaturas, las cifras de *coliformes* por placa serían bajas considerando, además, la conveniencia de no sembrar en cada placa de Petri más de 1 cc. de leche.

En cambio la siembra en tubos permitiría utilizar volúmenes mayores de leche asegurando así la fidelidad de los resultados.

Por otra parte el inconveniente del número de diluciones y tubos a utilizar en este caso no existe en el grado que señalamos para la leche natural, simplificándose la técnica hasta el punto de poder recomendarse por su sencillez como método de rutina.

El medio líquido caldo bilis verde brillante resultaría, según lo expuesto, el más idóneo para utilizar en el control de *coliformes* en leche pasteurizada, con la ventaja principal sobre el medio de Mac Conkey de mostrar una mayor capacidad selectiva.

## RESUME

On a étudié, d'une manière expérimentale et comparative, quatre milieux de culture sélectionnés pour le groupe *coliforme* de bactéries. Deux d'entre eux étaient liquides (bouillon Mac Conkey et bouillon de bile, de couleur verte brillante) et les deux autres étaient solides (agar lactose desoxycolate et agar de bile, de couleur rouge-violet); ils étaient tous considérés comme d'usage plus commun ou étendu pour la détermination de l'*index colimétrique* du lait.

La recherche a été faite avec 30 échantillons de lait cru ou naturel et 30 échantillons de lait pasteurisé, à fin de préciser l'efficacité comparative des susdits milieux de culture pour la détection et l'énumération de la microflore *coliforme* du lait.

D'après les résultats obtenus, on déduit que concernant le lait cru il n'y a pas de différences significatives entre les milieux et les techniques ou méthodes comme pour décider lesquels d'entre eux utiliser et, pourtant, après avoir résolu l'aspect quantitatif de l'énumération des *coliformes*, le choix d'un milieu de comptage devrait se faire en se basant sur des conditions d'ordre qualitatif ou technique, telles que: clarté dans l'interprétation des résultats, développement des colonies,

pouvoir sélectif du milieu, temps d'incubation, facilité dans l'exécution d'une technique ou méthode de forme routinière, etc.

En suivant le raisonnement précédent nous croyons que le milieu agar de bile, de couleur rouge violet, serait le plus approprié pour être utilisé comme méthode routinière dans le contrôle des bactéries *coliformes* dans le lait cru.

Cette affirmation est basée aussi bien dans ses qualités sélectives, —temps d'incubation court (22 heures), développement facile et différenciation des colonies—, que dans la complexité de la technique d'ensemencement (grand nombre de dilutions et de tubes à ensemer) dans des milieux liquides quand il s'agit d'une analyse de lait cru avec un nombre de *coliformes* qui peut varier beaucoup.

Quant au lait pasteurisé, il y eut des différences significatives entre les milieux et les méthodes mais non pas entre les milieux eux-mêmes, les susdites différences étant fondamentalement dues à la température d'incubation. Par conséquent, ce que nous avons dit sur le lait cru serait vrai, en partie, si dans le lait pasteurisé il n'y eût pas une nouvelle condition limitative pour l'utilisation ou emploi de milieux solides comme technique pour déterminer l'index *colibacillaire*, cette condition étant que comme il existe un petit nombre de bactéries de ce type, quand la pasteurisation est correcte et le lait est conservé à des températures basses, le nombre de *coliformes* par plaque serait petit et considérant, en outre, la convenance de ne pas ensemer plus d'un ml. de lait dans chaque plaque Petri.

Au contraire, l'ensemencement dans des tubes permettrait d'utiliser des volumes de lait plus grands, assurant ainsi la fidélité des résultats.

D'autre part, l'inconvénient de la quantité ou nombre de dilutions et de tubes à utiliser n'existe pas dans ce cas dans l'ordre ou degré que nous avons indiqué pour le lait cru, la technique ou méthode étant ainsi simplifiée jusqu'au point de pouvoir la recommander par sa simplicité comme méthode routinière.

Le milieu liquide, bouillon de bile, de couleur verte brillante, serait donc, d'après ce qui a été indiqué, le plus convenable et approprié pour être utilisé dans le contrôle des *coliformes* dans le lait pasteurisé, ayant comme avantage principal sur le milieu Mac Conkey celui d'avoir un pouvoir sélectif plus grand.

## SUMMARY

Four selective culture media for the *coliform* group of bacteria have been experimentally and comparatively studied. Two of them were liquid (Mac Conkey broth and brilliant green bile broth) and the two others were solid (desoxycollate lactose agar and violet red bile agar). They all were considered of great use for the determination of the *coliform count* in milk.

The research work was carried out with 30 samples of raw milk and 30 samples of pasteurized milk in order to determine with precision the comparative efficiency of said media to detect and to enumerate the *coliform* microflora of milk.

From the results obtained we may deduce that there are not any significant differences between the media and the technics or methods as to decide on which of them should be utilized. So, after overcoming the quantitative aspect of the enumeration of *coliforms*, the choice or selection of a count medium should be done on the basis of qualitative or technical conditions such as: clearness and conspicuity to interpret the results, development of the colonies, selective capacity of the medium, time of incubation, easiness to utilize a technique or method as a routine test, etc.

In accordance with the preceding argument we think the violet red bile agar would be the most adequate or suitable to be used as a routine method to control the *coliform* bacteria in raw milk.

This statement is based on their selective qualities, short period of time of incubation (22 hours), easy development and differentiation of the colonies, as well as the complexity of the seeding technics or method (a great number of dilutions and of tubes to be seeded) in liquid media when an analysis of raw milk with a number of *coliforms*, which may oscillate between large limits, is concerned.

Regarding the pasteurized milk there were some significant differences between the media and the method utilized but not among the media. These differences were mainly due to the temperature of the incubation.

Therefore, what we have said about raw milk would be true if in pasteurized milk there would not be a new limitative condition for the use of solid media as a method to determine the *coliforms index*. Such condition is that as there is a little number of bacteria of this type

when the pasteurization is right and the milk is kept at low temperature, the number of *coliforms* per plate would be low, keeping also in mind the convenience of not seeding more than 1 ml. of milk in each Petri dish.

Instead the seeding in tubes would permit to use greater volumes of milk so insuring satisfactory and correct results.

On the other hand, the inconvenient of the number of dilutions and tubes to be used in this case does not exist in the order or grade indicated for raw milk and then the technique or method is simplified and it may even be recommended as a routine test due to its simplicity.

The brilliant green bile broth liquid medium would be, according to the above indicated, the most adequate to be used to control the *coliforms* in pasteurized milk with the main advantage against MacConkey medium of showing a greater selective capacity.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) *Normas internacionales para el agua potable* (1964).—Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Traducido de la 2.<sup>a</sup> ed. inglesa.
- 2) SOJKA, W. J. (1965).—*Escherichia coli* in animals and poultry. Review series n.º 7 of the Commonwealth bureau of animal health. Weybridge, England.
- 3) SHERMAN, J. M. y WING, H. U. (1933).—The significance of colon bacteria in milk with special reference to standards. *J. Dairy Sci.* 16: 165.
- 4) SHERMAN, J. M., CAMERON, G. M. y WHITE, J. C. (1941).—The bacterial spoilage of milk near the freezing point. *J. Dairy Sci.* 24: 525.
- 5) YALE, M. W. y EGLINTON, R. (1935).—The value of the colon test as a means of detecting unsanitary conditions on the farm. *24th Ann. Rep. Intern. Association of Dairy and Milk Inspectors.*
- 6) HAMMER, B. W. (1937).—Bacteria of the *Escherichia-Aerobacter* group in dairy products. Panegyric. Collegiate Press, Inc.
- 7) *Recommended methods for the microbiological examination of foods*. 1958).—American public health association, Inc. New York, USA.

8) *Standard methods for the examination of dairy products*. (1960).—American public health association, Inc. 11th ed. New York, USA.

9) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (1965).—American public health association. Inc. 11th ed. New York, USA.

10) Commission des analyses microbiologiques - VI (1965).—*Fédération Internationale de laiterie. W - B - D/VI - DOC I*. Bruxelles, Belgique.

11) *Difco Manual* (1953).—Difco laboratories, Inc. 9th ed. Detroit, Michigan, USA.

12) Norme internationale FIL - 3. (1958).—Numeration des microorganismes du lait liquide et du lait en poudre. *Fédération internationale de laiterie*. Bruxelles, Belgique.

13) MC CRADY, M. H. y ARCHAMBAULT, J. (1934).—Examining dairy products for members of the *Escherichia - Aerobacter* group. *A. J. P. H.* 24: 122.

14) *Manual of microbiological methods*. (1957).—Society of american bacteriologists. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York.

15) FISHER, R. A. (1946).—*Métodos estadísticos para investigadores*. Traducido de la 10.<sup>a</sup> ed. inglesa. Aguilar, S. A., Madrid.

16) BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. y SMITH, N. R. (1957).—*Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, USA.

17) MORRIS, R. L. y CERNY, J. (1954).—Significant abnormalities in the violet red bile technique for coliforms in milk. *J. Milk and food tech.* 17: 185.