

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE LA MIEL  
DE ABEJA (Apis mellifera) EN LECHE CRUDA DE VACA”

TESIS

Presentada a la Junta Directiva de la Facultad de Medicina  
Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de  
Guatemala.

POR

JUAN CARLOS RAMÓN VIDAURRE LEMUS

Al conferírsele el Título de

MEDICO VETERINARIO

GUATEMALA, FEBRERO DEL 2002.

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	Dr. Mario E.
Llerena Quan	
SECRETARIO:	Lic.: Robin
Ibarra.	
VOCAL PRIMERO:	Lic. Carlos
E. Saavedra V.	
VOCAL SEGUNDO:	Dr. Fredy
R. González G.	
VOCAL TERCERO:	Lic.
Eduardo Spiegel.	
VOCAL CUARTO:	Br.
Manuel Arenas	
VOCAL QUINTO:	Br.
Alejandro Chávez	

ASESORES

Dr. Willson Valdez Melgar  
Dr. Jaime Rolando Méndez S.  
Lic. Robin Ibarra.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento a lo establecido por los estatutos de la  
Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a  
consideración de ustedes el presente trabajo de tesis titulado:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE  
LA MIEL DE ABEJA (Apis mellifera) EN LECHE  
CRUDA DE VACA”**

Como requisito previo a optar el título profesional de

**MEDICO VETERINARIO**

## ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES:  
Baldizón.

Vidaurre

Carlos Ramón Vidaurre  
Edna Azucena Lemus de

A MIS HERMANAS:  
Vidaurre Lemus.

Vidaurre Lemus.

Maria Edna Azucena  
Maria Edna Gabriela

A TODOS MIS FAMILIARES  
no están

En especial a los que ya  
conmigo.

A MIS AMIGOS  
malas...

En las buenas y en las

A ROSALINDA ESPINOZA  
tanto.....

Por aguantarme

A LAS FAMILIAS  
Motta Padilla,

Espinoza Reyes. Gracias

De la Roca Espinoza,  
Rivera Zepeda,  
por todo.....

A SAM

Donde quiera que estés.....

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A TODOS MIS CATEDRÁTICOS

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

A MIS ASESORES: Dr. Willson Valdez Melgar.

Dr. Jaime R. Méndez S.

Lic. Robin Ibarra.

AL PERSONAL TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO DEL  
DEPARTAMENTO DE  
SALUD PÚBLICA VETERINARIA.

A MI FAMILIA POR TODO SU APOYO

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

A TODAS LAS PERSONAS QUE COLABORARON CON LA  
ELABORACIÓN  
DE ESTA TESIS.

## I. INTRODUCCIÓN

La miel de abeja es una alternativa fácil, accesible y viable para poder utilizarse en el campo para combatir y controlar la carga bacteriana de la leche fresca. Su poder bacteriostático y bactericida es debido a características como el pH ácido mínimo de 3.2 que posee, efecto osmótico, peróxido de hidrógeno, inhibina y factores fitoquímicos.

Este sistema innovador y natural de utilizar miel de abeja como aditivo no químico a la leche requiere de bajas concentraciones y poco tiempo para que ejerza su poder bactericida y bacteriostático. Siendo así una de las mejores medidas de tratamiento para mantenimiento de la calidad higiénica de la leche, ya que no cambia ni pierde las propiedades fisicoquímicas de la leche y además aumenta algunas de las características nutritivas de esta, debido a los contenidos en la propia miel de abeja.

En la presente investigación se evaluó los efectos que sobre la leche tiene este método casero pero efectivo de mejorar y preservar la calidad de la leche fresca, determinando cual es el porcentaje de miel para adicionar y el tiempo necesario para reducir al máximo la carga bacteriana de la leche;

afectando lo menos posible las características físico-químicas de la misma.

## II. HIPÓTESIS

“La aplicación de miel de abeja, a la leche cruda de vaca, disminuye en 50% la carga bacteriana presente en la misma”

### III. OBJETIVOS

#### 2.1 GENERAL:

Evaluación del efecto bactericida de la miel de abeja, en leche cruda de vaca.

#### 2.2 ESPECIFICOS:

\* Medir la reducción de bacterias aeróbicas y coliformes, presentes en la leche tratada con miel de abeja.

\* Determinar la dosis de aplicación óptima de miel de abeja, para reducir la carga bacteriana presente, en un volumen de leche específico.

\* Determinar el tiempo óptimo para obtener el efecto bactericida en la leche cruda de vaca, por la aplicación de miel de abeja.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 DEFINICION DE LECHE:

La leche es una emulsión natural perfecta, en la cual los glóbulos grasos están mantenidos en suspensión en un líquido salino azucarado, gracias a la presencia de sustancias proteicas y minerales en estado coloidal” (1,4).

La leche es uno de los alimentos más complejos y además el más fácil de modificar, adulterar y el que con mayor frecuencia se altera (1).

La propiedad fundamental de la leche es la de ser una mezcla, tanto física como químicamente. Es una mezcla de sustancias definidas: lactosa, glicéridos de ácidos grasos, caseínas, albúminas, sales. Desde el punto de vista físico, coexisten varios estados, emulsión, suspensión y solución (2).

### 4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES:

Las características de la leche serán los siguientes:

- a) Caracteres organolépticos normales
- b) Exenta de materias extrañas,
- c) Peso específico: 1.028 a 1.034 a 20°C;

- d) Índice crioscópico: -0.53 a -0.57 "Horvet" ó -0.512 a -0.550°C;
- e) PH: 6.6 a 6.8;
- f) Acidez: 12 a 21 ml de hidróxido de sodio 0.1 N/100 ml de leche;
- g) Sólidos no grasos: 82.5 gramos por litro, como mínimo;
- h) Exenta de sangre y pus;
- i) Exenta de antisépticos, antibióticos y neutralizantes.

Los residuos de plaguicidas y otras sustancias nocivas para la salud no deberán exceder los límites establecidos por el Ministerio de Salud;

- j) Sus requisitos microbiológicos y su contenido de materia grasa, serán los que determina este reglamento en cada caso (6) .

### **4.3 LA LECHE SE CLASIFICARÁ EN:**

**4.3.1 Leche natural:** Es aquella que solamente ha sido sometida a enfriamiento y estandarización de su contenido de materia grasa antes del proceso de pasteurización a ultra alta temperatura (UHT) o esterilización (6).

**4.3.2 Leche reconstituida:** Es el producto obtenido por adición de agua potable a la leche concentrada o a la leche en polvo, en proporción tal que cumpla con los requisitos establecidos y su

contenido de materia grasa, deberá ser pasteurizada, sometida a tratamiento UHT o esterilizada(6).

**4.3.3 Leche re combinada:** es el producto obtenido de la mezcla de leche descremada, grasa de leche y agua potable, deberá ser pasteurizada, sometida a tratamiento UHT o esterilizada (6).

#### **4.4 DEFINICIONES:**

**Leche ácida:** La leche contiene microorganismos que, a favor de la temperatura ambiente, se desarrollan prodigiosamente por las condiciones naturales del medio y especialmente días calurosos, el cultivo de los gérmenes se logra a expensas de la lactosa, produciendo ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido acético, fórmico, alcohol y gases, y a esto se debe la acidez de la leche.

**Leche viscosa o filante:** Esta alteración se presente entre las diez a veinte horas después del ordeño, y principalmente después de la refrigeración; los gérmenes causantes se desarrollan mejor a bajas temperaturas. La leche se presenta espesa, consistente, constituyendo una masa gelatinosa que se adhiere a las paredes de los recipientes y que puede estirarse en largos hilos (1).

**Leche cruda:** Es la leche entera que no ha sido sometida a la acción del calor. **Leche pasteurizada:** Es aquella que ha sido sometida a tratamiento térmico específico y por tiempos

determinados para lograr la destrucción de todos los microorganismos patógenos, sin alterar en forma considerable su composición, sabor y valor alimenticio.

**Leche ultrapasteurizada:** Es la que ha sido sometida a temperaturas mayores de 138 °C por lo menos por 2 segundos.

**Leche esterilizada:** Es la que ha sido sometida a tratamientos térmicos específicos y por tiempos definidos para lograr la destrucción de todos los microorganismos, sin afectar en forma significativa su valor alimenticio (17).

#### 4.5 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LA LECHE:

Se pueden distinguir dos grandes categorías de bacterias; las bacterias Gram + se caracterizan por mayores exigencias nutritivas y una sensibilidad más elevada a los agentes bactericidas, que las bacterias Gram - . Estas últimas son, sin embargo, más sensibles que las bacterias Gram+, a ciertas sustancias inhibidoras (2).

Características:

- Contenido de microorganismos no patógenos en la leche para consumo directo 50,000 UFC/ml.
- Contenido de microorganismos no patógenos En la leche, inmediatamente antes de la pasteurización, máximo en:

- Clase A	400,000
UFC/ml.	
- Clase B	1,000,000
UFC/ml (17).	

### Características Físicas y Químicas:

La composición de la leche de vaca, que se toma como tipo normal en el abasto, está integrada por proteínas, grasa, hidratos de carbono, sales, agua y en pequeñas proporciones, vitaminas, pigmentos y gases.

Por término medio contiene:

Agua-----86.0 - 89.3%

Extracto seco-----10.7 - 14.0%

El extracto se descompone así:

Grasa----- 2.8 - 4.0%

Extracto magro----- 7.9 - 10.5%

Este a su vez, está integrado por:

Proteínas----- 3.5 %

Lactosa----- 4.6 %

Sales-----0.75 % (1).

#### 4.5.1 Bacterias gram positivas:

**4.5.1.1 Bacterias lácticas:** Las bacterias más importantes, en los productos lácteos, tanto por sus actividades bioquímicas como por su número, son aquellas que fermentan la lactosa dando una proporción elevada de ácido láctico en los productos de degradación y que sólo son débilmente proteolíticas.

**4.5.1.2 Micrococos y estafilococos:** Dadas sus características morfológicas tan particulares, se propuso frecuentemente la agrupación de las bacterias esféricas en una sola unidad de clasificación, con este criterio se realizó el sistema Prévot. Sin embargo, existen diferencias importantes en los caracteres fisiológicos, lo que puede justificar la separación de las bacterias esféricas en varias unidades.

En la familia de las Lactobacteriaceae se encuentran numerosas especies de cocos, pero se agrupan por pares o en cadenas y no en grupos, son más próximos a las bacterias en bastoncito.

Las otras bacterias esféricas, que tienen interés para nosotros, son también Gram +, y se encuentran agrupadas en una familia homogénea

desde el punto de vista morfológico: Micrococcaeeae, cuyas subdivisiones

son discutidas. La forma de agrupamiento de las células es una característica inconstante, por ello no pueden separarse netamente en especies de células aisladas (micrococos) y especies de célula arracimadas (estafilococos) A continuación se citan las propiedades distintivas de los dos géneros que agrupan las especies encontradas en los productos lácteos (2).

**4.5.1.2.1 Micrococos:** Estas bacterias son en general aerobias, no fermentan la glucosa, sino que la degradan de forma oxidante sin provocar más que un débil descenso del pH (mínimo entre 5.0 y 5.5) Los micrococos no son patógenos, están desprovistos de las dos armas habituales de la infección: la coagulasa y la hemolisina.

Los micrococos forman parte de la flora innocua que contamina la leche, y se encuentran frecuentemente después del ordeño. Por presentar una temperatura óptima bastante elevada (hacia 37°C), y por sus actividades enzimáticas reducidas, tienen poca importancia en los problemas referentes a la conservación y tratamiento de la leche. Se han aislado micrococos que no atacan la lactosa. Otras especies tienen una actividad proteolítica limitada y pueden alcalinizar el medio, esta actividad es interesante desde el punto de vista de la

“maduración” de la leche en quesería. Los micrococcos influyen sobre el resultado de las pruebas de apreciación de la calidad bacteriológica de la leche, que habitualmente se efectúan a 37°C.

**4.5.1.2.2 Estafilococos:** Son anaerobios facultativos, que provocan una fermentación acidificante de la glucosa con descenso acusado del pH (hacia 4.3 y 4.5), producen acetoína, contrariamente a los micrococcos. Este género comprende dos grupos, el más importante es el de Staphylococcus pyogenes, que comprende bacterias parásitas que poseen una coagulasa y uno o varias hemolisinas; se designan también con el término Staphylococcus aureus y Staphylococcus albus, estas bacterias son importantes desde el punto de vista de la higiene.

**4.5.1.2.3 Bacterias esporuladas:** Estas bacterias son las únicas que forman una endospora, que tiene la importante propiedad de resistir temperaturas elevadas. Mientras las otras bacterias se destruyen generalmente por debajo de 80 °C, las esporuladas sólo mueren por encima de 100 °C. A pesar de su termorresistencia, debida a las esporas, muchas de estas bacterias son mesófilas, es decir, que se desarrollan a unos 30°C y se inhiben a temperaturas superiores a 45°C. Sin embargo, existen especies termófilas, que se desarrollan bien por encima de los 60°C.

En los productos lácteos se encuentran representados dos géneros:

**4.5.1.2.3.1 Bacillus:** bacterias esporuladas aerobias, con actividades enzimáticas variadas: acidificación, coagulación y proteolisis.

**4.5.1.2.3.2 Clostridium:** bacterias esporuladas anaerobias (no se desarrollan más que en medios exentos de oxígeno); son perjudiciales, sobre todo por la producción de gas, algunas son peligrosas por sus toxinas, en especial el Clostridium perfringens.

**4.5.1.2.4 Bacterias gram positivas diversas:**

La leche fresca puede contener muchas bacterias del género *Corynebacterium*, son bastoncitos finos, que se presentan en agrupaciones características el típico es el C. diphtheriae o bacilo diftérico, pero no se encuentra en la leche.

**Bacterias propiónicas**, que tienen importancia en la maduración de los quesos de pasta dura.

**Brevibacterium**, bacterias de bastoncitos cortos (cocooides), que se encuentran corrientemente en las materias animales o vegetales en descomposición. No fermenta la lactosa. La B. linens abunda en las cortezas rojas pegajosas de la superficie de los quesos madurados en atmósfera húmeda (2).

## 4.5.2 Bacterias gram negativas:

### 4.5.2.1 Enterobacterias:

La familia de las Enterobacteriaceae es una de las más vastas y de las más difíciles de subdividir. Es necesario añadir que existen numerosos tipos antigénicos. Las especies más frecuentes en los productos lácteos son los que fermentan la lactosa.

La mayor parte de las enterobacterias son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, su presencia en el agua o la leche puede atribuirse a una contaminación de origen fecal. Muchas de estas especies tienen una fase de vida libre en el suelo y en las aguas. Las enterobacterias suelen ser menos abundantes en la leche que otras bacterias Gram-, sin embargo, tienen gran importancia desde dos puntos de vista:

\* **HIGIENICO:** Varias especies de esta familia son responsables de graves enfermedades infecciosas, que pueden adquirir carácter epidémico, en el caso de los productos lácteos las salmonelas son las más temibles, a otras especies se atribuyen infecciones gastro-intestinales benignas (2)

\* **TECNOLÓGICO:** La propiedad bioquímica dominante de las enterobacterias es la fermentación de los azúcares con

formación de gas y ácido. Algunas especies producen sustancias viscosas o de sabor desagradable.

El término “bacterias coliformes” se utiliza para designar a las enterobacterias más frecuentes encontradas en los productos lácteos.

**4.5.2.1.1 Escherichia:** Este género está muy simplificado. No comprende más que una especie bien definida: el E. coli, con algunas variedades de caracteres antigénicos diferentes. Es el único productor de indol del grupo, y por ser fácil poner de manifiesto este cuerpo constituye el principio de una reacción de caracterización; no obstante, su significado es reducido, ya que otras bacterias netamente diferenciadas (*Proteus*) son también indológenas. Produce mucho gas y ácidos orgánicos (láctico, acético, succínico, etc.). Sin embargo es menos acidificante que las bacterias lácticas que lo inhiben cuando el pH desciende por debajo de 5.0 – 5.2 (la designación de pseudofermento láctico, que le fue atribuida en otro tiempo, se presta confusiones y debe abandonarse). Como todas las enterobacterias E. coli reduce los nitritos a nitratos; en presencia de nitratos, la producción de gas es reducida.

**4.5.2.1.2 Cloaca:** Este género se designaba anteriormente por aerobacter; a pesar de ello se debiera designar por

Enterobacter. El C. aerogenes es igualmente un gran productor de gas en los productos lácteos, pero no origina más que una débil acidificación, por el contrario, produce una sustancia neutra, la acetoína. Estas bacterias no son patógenas, sin embargo, algunas cepas se consideran sospechosas (2).

**4.5.2.1.3 Klebsiella:** Género muy próximo al anterior pero, en oposición a las otras bacterias coliformes, las células son inmóviles y encapsuladas; comprende cepas saprofitas y cepas patógenas.

**4.5.2.1.4 Citrobacter:** Gérmenes que antes se clasificaban como Escherichia (E. Freundii); son especies inocuas presentes en las materias fecales.

Aparte las coliformes, pueden encontrarse en la leche enterobacterias que no fermentan la lactosa y que son especies inocuas, como las Serratia y Proteus, que son proteolíticas; pero también pueden hallarse especies patógenas temibles, como Salmonella (bacilo tífico) y más raramente Shigella (bacilo disentérico) (2).

#### **4.5.3 Microorganismos de origen mamario:**

A la salida de la mama sana, aún tomándose rigurosas precauciones de asepsia, es difícil obtener una leche estéril, por lo menos en las vacas. En el interior de la mama existen casi

siempre gérmenes banales que contaminan la leche en el momento de su recogida (2).

Esta población originaria de la mama sana es, en general, poco numerosa; raramente rebasa los 1,000 gérmenes UFC/ml. Cuando el contenido de gérmenes es elevado, suele ser debido a una proliferación de gérmenes típicos de la mastitis contagiosa; estreptococos y estafilococos. Se ha sugerido la existencia de una relación entre la presencia de gérmenes en la mama y su anatomía; así, un esfínter de pezón en buen estado constituirá una barrera contra la infección (17).

La primera leche que se extrae de la mama es siempre la más infectada. El número de gérmenes decrece a lo largo del ordeño. Al principio de este, la leche lava y expulsa de los conductos los gérmenes más fácilmente desplazables.

Ejemplo (promedio de una serie de exámenes):

- Leche de los primeros chorros----- 6,500 gérmenes  
UFC/ml
- Leche a mitad del ordeño ----- 1,350        "
- Leche al final del ordeño ----- 709         "

(2).

Los gérmenes inofensivos de la mama pertenecen principalmente a los géneros *Corynebacterium* y *Micrococos*. Los gérmenes patógenos son principalmente estreptococos y

estafilococos hemolíticos. Algunos gérmenes que se desarrollan bien en la leche, son incapaces de vivir o mantenerse en la mama; por ejemplo algunos estreptococos y gérmenes del género *Aerobacter*, *Serratia* (17).

#### **4.5.4 Estreptococos:**

Estas especies constituyen habitualmente la flora dominante de la leche, crema y de quesos frescos. Puede decirse que no existe leche cruda sin estreptococos.

A pesar de su nombre, los estreptococos adoptan frecuentemente la forma de diplococos. Respecto a los lactobacilos, su carácter morfológico, los estreptococos se distinguen por una acidificación mas moderada de la leche, de 0.5 a 1% de ácido láctico para las especies homofermentativas, aunque la producción de ácido se inicia a mayor velocidad.

#### **4.5.5 Estreptococos lácticos:**

Se trata de bacterias lácticas mesófilas homofermentativas pertenecientes al grupo serológico N. Son los estreptococos que producen más ácido en la leche tornasolada (0.8 a 1 % de ácido láctico) y que tienen mayor actividad reductora; son del tipo "ARC", y la reducción del indicador se realiza antes de la coagulación.

Estos estreptococos son los agentes habituales de la coagulación de la leche abandonada a temperatura ambiente (17).

**4.5.5.1 Estreptococo cremoris:** Este estreptococo es más lábil y difícil de cultivar que los otros. Es muy sensible a diversos agentes químicos como la sal; no se desarrolla o lo hace muy mal a 37°C, no posee proteínasa y no desamina la arginina. Suele presentarse en la leche bajo la forma de largas cadenas. Las cepas de los estreptococos causantes de la viscosidad de la leche pertenecen habitualmente a esta especie y han recibido diversas denominaciones, como Bacterium lactis, B. Longi, Str. Hollandicus (17).

**4.5.5.2 Estreptococo lactis:** Fermenta varios glúcidos, se reproduce en presencia de NaCl (4%)m hidroliza la arginina y produce un sistema enzimático que degrada la caseína, y cuyo papel se ha estudiado en la maduración de algunos quesos.

**4.5.5.3 Estreptococo diacetylactis:** Se caracteriza por producir acetoina a partir de los citratos y no los azúcares.

**4.5.5.4 Grupo termófilo o viridans:** La especie más característica es el Estreptococo thermophilus; estas bacterias no se desarrollan a temperaturas inferiores a 18 °C, se

desarrollan a 45-50°C; es muy sensible a la sal. Se encuentran otros estreptococos termófilos en los excrementos, el más hallado con frecuencia en el estiércol de la vaca, y el abundante del tubo digestivo es el Estreptococo bovis.

**4.5.5.5 Grupo piógeno:** Comprende numerosas especies de estreptococos patógenos para el hombre y los animales. Dentro de este grupo se han reconocido varios tipos serológicos: A, B, C, E. La especie típica es el Estreptococo agalactiae, bacteria láctica adaptada al parasitismo en la mama, y no puede desarrollarse más que en una zona bastante limitada de temperatura, entre 30-40°C (17).

#### **4.5.6 Propiedades de las bacterias lácticas:**

Bacterias esféricas o alargadas, inmóviles, no esporuladas, Gram +, catalasa negativas. No poseen la citocromo-oxidasa puesta de manifiesto por la reacción de la bencidina. Anaerobios facultativos o microaerófilos (soportan tensiones reducidas de oxígeno); poco crecimiento, en la superficie de los medios de cultivo usuales; crecimiento más fácil en profundidad, en general, la coagulación de la leche comienza en el fondo. Muy exigentes en nutrición nitrogenada y vitamínica; así el medio debe aportar una mezcla compleja de aminoácidos y factores de crecimiento, especialmente de las vitaminas B. No

existe crecimiento con las sales de amonio como única fuente nitrogenada.

La actividad proteolítica en la leche, es en general, débil y no se manifiesta más que lentamente. Los disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa) son mejores alimentos que las hexosas de las que están formados (glucosa, fructuosa, galactosa) (17)

#### **4.6 Diferentes tratamientos que se le dan a la leche para la reducción de su carga bacteriana.**

##### **4.6.1 Métodos de pasteurización:**

Existen varias formas de tratar la leche con el objeto de destruir todos los microorganismos patógenos que se encuentran en ella, y a pesar de que algunas formas se apartan del método de Pasteur, también se le denomina, impropriamente, método de pasteurización. En algunos casos, aunque siguen el método Pasteur, llevan el nombre de quien ha modificado el proceso u otro nombre (17, 19).

##### **4.6.1.1 Método de pasteurización lenta:**

También conocido como pasteurización discontinua, a baja temperatura, por retención o por sostenimiento prolongado. Consiste en calentar la leche a 62.8 °C durante 30 minutos como mínimo, en un equipo apropiado y correctamente operado, es

muy usado en pequeñas plantas y especialmente en la pasteurización de subproductos, tales como cremas, mezclas para yogur, helados con sabores producidos en pequeña escala. Una de las grandes características de este sistema es que no modifica en forma considerables propiedades de la leche, mantiene el valor nutritivo y no destruye la línea de crema. Desde el punto de vista bacteriológico, este método es muy efectivo en la destrucción de microorganismos patógenos pero destruye solamente el 95% del total de microorganismos. Por ello no es muy recomendado para usarlo cuando la leche es cruda por el alto cómputo bacteriano ya que el 5% de sobrevivientes puede ser mayor que el máximo de microorganismos permitido (17).

#### **4.6.1.2 Método de pasteurización continua:**

A este método también se le conoce como pasteurización temprana alta y tiempo corto (TATC) continua, relámpago, flash y en algunos textos, se le denomina HTST (High temperature, short time). Este método consiste en calentar la leche 72 a 77 °C durante 15 segundos como mínimo, en un equipo adecuadamente operado.

#### **4.6.2 Efectos de pasteurización en el contenido bacteriano:**

La pasteurización elimina de 90-99% de los microorganismos que se encuentran en la leche cruda, sin embargo, cuando el

contenido de microorganismos termodúricos es alto, puede ser mucho menos del 90% pero esto no afecta mucho a la leche pasteurizada guardada en refrigeración. De todas maneras, sea cual fuere la cantidad de microorganismos que sobrevivan a la pasteurización, no habrá entre ellos, microorganismos patógenos ni sicrófilos. Las bacterias coliformes son también eliminadas, casi en su totalidad, mediante la pasteurización, y por ello, la leche pasteurizada no debe contener más de 10 colonias de coliformes/cm<sup>3</sup> de leche pasteurizada y si hay más de 10 colonias, existe una gran probabilidad de que la leche haya sido contaminada después de la pasteurización.

#### **4.6.3 Complemento de la pasteurización.**

**4.6.3.1 Bactofugación:** Una vez pasteurizada la leche, es sometida a una supercentrifugación con él objeto de eliminar los microorganismos que sobreviven a la pasteurización. La supercentrifugación de la leche a 73-75°C, elimina cerca del 99.5% de las células microbianas, y si 2 supercentrifugaciones son instaladas en serie, la segunda elimina el 90% de los microorganismo que escaparon a la primera bactofugación no puede sustituir a la pasteurización porque no hay ninguna

garantía de que en ese 0.1% de microorganismos no hallan microorganismos patógenos.

#### **4.6.4 Métodos de esterilización:**

Existen varios métodos para lograr la destrucción total de los microorganismos de la leche, pero dos son los más usados industrialmente: Esterilización de la leche en su envase y esterilización por medio de tratamiento de la leche con temperaturas ultra altas (TUA) cuyas siglas en inglés son UHT (ultra high temperature).

##### **4.6.4.1 Esterilización de la leche en su envase:**

En este método existen dos alternativas: una mediante el uso de autoclaves y la otra por medio de torres hidrostática. En la primera la esterilización se lleva a cabo en tandas o lotes y la segunda se hace en forma continua.

##### **4.6.4.2 Esterilización por temperatura ultra alta:**

Este método también es conocido como ultrapasteurización y puede ser realizado por medio de intercambiadores de calor o por inyección directa de vapor a la leche. El proceso consiste en un precalentamiento, esterilización a 135-150 °C durante 2-8 segundos, homogenización

enfriamiento y envasado aséptico. En comparación con el método de torres hidrostática, este método ahorra tiempo, energía, espacio y mano de obra (17).

#### **4.6.5 Variantes de la pasteurización.**

**4.6.5.1 Biorización:** La leche es impulsada a través de un orificio muy pequeño, de 3 a 4 atmósferas de presión, hasta hacer un impacto con una lámina caliente, en donde se convierte en niebla y se calienta a 75°C.

**4.6.5.2 Estassanización:** Este método fue ideado por Estassano y consiste en elevar la temperatura de la leche a 73-74°C., en estratos inferiores a un milímetro de grosor, utilizando un equipo compuesto de tres cilindros paralelos dispuestos horizontalmente uno sobre otro a distintas alturas. Teniendo en cuenta la rapidez del intercambio de calor, la exposición puede ser reducida a 2-3 segundos.

#### **4.6.6 Efecto del tratamiento térmico de la leche:**

El tratamiento térmico de leche puede mejorar las propiedades nutricionales o reducir el crecimiento de los cultivos lácticos, también destruye muchos de los microorganismos inhibidores naturales de éstos (17).

El Calentamiento de la leche a 72°C por 30 segundos, 15 y 45 minutos mejora la calidad de ésta como medio de cultivo, sin embargo, Calentar la leche a 120°C por 30 minutos es negativo para la actividad de los cultivos, debido a un exceso de desnaturalización de las proteínas y al aumento excesivo en la disponibilidad de grupos sulfhídricos (-SH).

Por razones prácticas, se considera satisfactorio el tratamiento de la leche para cultivo a 120°C por 10-15 minutos, 90°C durante 1 hora y para la preparación de cultivo a granel, la temperatura de 85-96°C por una hora (17).

#### **4.6.7 Otros métodos con efectos similares a la pasteurización:**

4.6.7.1 Rayos ultravioleta

4.6.7.2 Rayos infrarrojos

4.6.7.3 Radiaciones ultrasónicas

4.6.7.4 Acción oligodinámica de Varios metales

4.6.7.5 Tratamientos termoeléctricos

4.6.7.6 Alta frecuencia

4.6.7.7 Microonda (17).

4.6.7.8 Adición de Miel (21).

#### **4.7 DEFINICIÓN DE MIEL:**

Se entiende por miel la sustancia dulce producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las flores o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas y almacenan después en panales. (3, 4, 16).

La miel es el producto primario más importante de la apicultura; visto desde un punto de vista cuantitativo y económico. También fue el primer producto de la abeja usado por la humanidad en tiempos antiguos. La historia del uso de la miel es paralela a la historia del hombre siendo utilizada como una fuente de alimentación, símbolo religioso, mágico y para ceremonias terapéuticas (22).

##### **4.7.1 Historia:**

El empleo de la miel como medicina se menciona en los registros más antiguos. La miel era prescrita como medicina por médicos de muchas diferentes razas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Beck y Smedley, Majno y Forreste describieron su uso en la antigüedad en el vendaje de heridas. Los egipcios, asirios, chinos, griegos y romanos, todos

utilizaban la miel sola o en combinación con otras hierbas, para el tratamiento de heridas y enfermedades del intestino (7, 13, 22).

Los documentos más antiguos que se conocen se encuentran en Mesopotamia, el actual Irak, donde en unas tablillas o lápidas de barro figuran las prescripciones de un médico mencionando el uso de la miel (7)

Una versión de la leyenda dice: Zeus, divinidad de la mitología griega, fue alimentado en su más tierna infancia con miel, por las ninfas Melisa y Amaltea hijas de Meliso rey de Creta.

Los griegos, eran alimentados con leche y miel y a esta mezcla o brebaje, le daban el nombre de Melikatron. La miel no faltaba en las comidas simples o suntuosas que fueran se consumía abundantemente y era utilizada por los atletas en sus entrenamientos.

Dioscórides, también médico griego del siglo V antes de Cristo, que recopiló todo su saber farmacológico en su texto *Materia Médica*, curaba heridas infectadas, infecciones intestinales, y llagas infectadas con miel, se le llamó padre de la farmacología. También habla de mieles que producía crisis delirantes y sudores al poco de ser ingeridas, y pensaba era producida por el boj y otras especies vegetales que producen néctares tóxicos.

En el antiguo Egipto, el más importante de los papiros médicos conocido es el de Ebers, data de 1600 años antes de Jesucristo, y se halla escrito en caracteres hieráticos, e indica una visión de la medicina de su época,, orientada a una terapéutica en lo racional y basada en la experiencia. Utilizaban la miel como laxante, restauradora de las fuerzas en estado debilidad, en curación de heridas, quemaduras, etc.

Todas las escuelas médicas hasta llegar a nuestros días han concedido a la miel, un gran valor terapéutico. Se le considera más como medicamento, que como alimento (7, 10).

Por la acción bactericida que le proporciona la inhibina, y el ácido fórmico, es utilizada en las quemaduras, heridas y llagas ( 5, 7, 8).

#### **4.7.2 Características fisicoquímicas de la miel:**

Recién extraída de los panales es fluida, de una densidad entre 1.4 y 1.5, según su grado de madurez. Con tiempo se cristaliza o granula, se torna compacta, y dura adquiriendo un color blanquecino. Entre 10 a 20°C cristaliza mejor, sobre 27°C no cristaliza, como tampoco con temperatura constante muy baja. Las mieles más ricas en glucosa cristalizan muy rápidamente y tardan las que contienen una fuerte proporción de fructuosa, también retarda la cristalización un tenor en agua

elevado. La cristalización de la miel es un proceso natural de la misma y representa una garantía de su madurez y pureza (15).

La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente glucosa y fructuosa. La miel contiene además proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, sustancias minerales, polen y otras sustancias, y puede contener sacarosa, maltosa, y otros oligosacáridos así como vestigios de hongos, algas, levaduras y otras partículas sólidas que resultan del proceso de obtención de la miel. El color de la miel varía desde casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente. El sabor y el aroma varían, pero, generalmente, posee los de la planta de la cual procede. (3)

#### **4.7.2.1 Viscosidad:**

La miel en fresco es un líquido viscoso. Su viscosidad depende de una variedad de sustancias y por consiguiente varía en su composición y particularmente en su volumen de agua. La viscosidad es un parámetro técnico importante durante el procesamiento de la miel. Aumentando su temperatura la miel baja su viscosidad que es un fenómeno que se aprovecha durante el proceso industrial de la miel (22).

Se denomina “cuerpo” de la miel a la consistencia o la lentitud con que fluye de un recipiente cualquiera. Se dice que

la miel espesa de buen cuerpo tiene una viscosidad elevada, mientras que una miel delgada que fluye casi como el agua posee poca viscosidad. La viscosidad en la miel es marcadamente afectada por la temperatura; como se sabe la miel se vuelve más fluida cuando se calienta (16).

En Europa se produce miel de brezo, que tiene una viscosidad tan elevada que casi no sale cuando se invierte una botella que la contiene. Al lado de esa viscosidad tan pronunciada, esta miel presenta otra propiedad peculiar que se denomina "tixotropía". Se llama tixotropía al hecho de que una miel modifique su viscosidad por simple agitación, es decir que disminuye cuando se sacude un frasco que contiene dicho producto (16).

#### **4.7.2.2 Densidad:**

Otra característica física importante en la práctica es la densidad. La densidad de la miel es más grande que la densidad del agua; depende también del volumen del agua de la miel. Debido a la variación en densidad es a veces posible observar estratificación distinta a la de la miel en tanques de almacenamiento grandes (22).

#### **4.7.2.3 Higroscopicidad:**

Una de las propiedades de la miel que se ha reconocido hasta cierto punto pero que respecto a la cual se dispone de

muy pocos conocimientos precisos, es la de absorber y retener la humedad, fenómeno que técnicamente se denomina “higroscopicidad”. Este factor debe ser tenido muy en cuenta en el almacenamiento de la miel. Cuando el producto es almacenado a temperaturas relativamente bajas en un ambiente húmedo, absorbe humedad y se diluye, lo que a su vez tiende a provocar su fermentación. En cambio, el almacenamiento en un local con poca humedad dará como resultado una pérdida de agua en el producto, de modo que la miel tiende a volverse de cuerpo más denso. (16, 22).

#### **4.7.2.4 Granulación:**

La formación de cristales de azúcar en la miel, corrientemente denominada granulación, consiste en la separación de la glucosa en forma sólida. Por diversas razones, el manejo inteligente de la granulación presenta su importancia cuando se considera con relación al envase, distribución y venta de la miel. Otra de las formas en que la granulación adquiere importancia se refiere a la naturaleza de los cristales de glucosa presentes. Algunas mieles cristalizan en un estado relativamente delicado, mientras que otras cristalizan en forma grosera (16).

#### **4.7.2.5 Tensión de superficie:**

Es esta característica de la miel la que la hace un humectante excelente; es utilizada en productos cosméticos, la tensión de superficie varía con el origen de la miel y es probable a las sustancias coloidales; junto con viscosidad alta, es responsable para dar la característica de espumado de la miel.

#### **4.7.2.6 Propiedades termales:**

El calor específico varía de 0.56 a 0.73 cal/g/°C, según su composición y estado de cristalización. La conductibilidad termal varía de 118 a 143 x 10 cal/cm<sup>2</sup>/sec/°C (White 1975) (22).

#### **4.7.2.7 Color:**

El color de la miel líquida varía de claro a colores ámbar y oscuros hasta el negro. Los colores de la miel son básicamente todos los matices de ámbar amarillo, como diluciones diferentes o concentraciones de azúcar caramelizado como una norma del color. El color varía con el origen botánico, edad y almacenamiento, pero la transparencia o la claridad depende de la cantidad de partículas suspendidas como el polen (16, 22).

#### **4.7.2.8 Cristalización:**

La cristalización es otra característica importante de la miel. La mayoría de las mieles cristaliza a temperaturas de almacenamiento normales. Esto es debido al hecho que la miel

es una solución de azúcar sobresaturada que contiene más azúcar que puede permanecer en solución.

La cristalización es el resultado de la formación de cristales de glucosa, en número, dimensión y calidad con la composición de miel y las condiciones de almacenamiento (16, 22).

#### 4.7.3 Composición química:

Las principales características físicas y el comportamiento químico de la miel se deben particularmente a la glucosa y la fructuosa. Otros autores hablan que la sacarosa es otro elemento en la composición de la miel (3). Los constituyentes menores, tales como compuestos del sabor, pigmentos coloreados, ácidos menores, etc., participan en gran parte de las diferencias entre las distintas mieles (3, 12).

Pequeñas cantidades de materias colorantes establecen la diferencia entre una miel clara y otra oscura, y sustancias del sabor entre una miel suave y otra de sabor fuerte (3).

En forma similar, cantidades muy pequeñas de aminoácidos y compuestos nitrogenados afines, aumentan la tendencia de la miel a oscurecerse durante el almacenamiento o cuando es sometida a la acción del calor. La presencia de muy pequeñas cantidades de proteínas u otras sustancias coloidales es suficiente para acentuar, en forma pronunciada, la tendencia de

la miel a formar espumas o retener burbujas de aire finamente dividido (3).

Los azúcares representan el 95 a 99% de la materia seca de la miel. La mayoría de estos azúcares es la fructosa y glucosa que representa 85 a 95% de los azúcares totales. Generalmente la fructosa es más abundante que la glucosa. Este predominio de azúcares simples y particularmente el porcentaje alto de la fructosa es responsable de la mayoría de las características físicas y nutricionales de la miel (22).

Las cantidades pequeñas de otros azúcares también están presentes como disacáridos (sacarosa, maltosa, isomaltosa), y unos trisacáridos y oligosacáridos; aunque cuantitativamente son de importancia menor su presencia puede proporcionar información sobre la adulteración y origen botánico de la miel (8, 22).

#### **4.7.3.1 Agua:**

Es cuantitativamente el segundo componente más importante de la miel, su volumen es crítico desde el punto de que afecta el almacenamiento de la miel. Solo mieles con menos de 18% de agua puede guardarse con pequeño o ningún riesgo de fermentación (22).

Entre los elementos menores están los ácidos orgánicos son los más importantes y de estos el ácido glucónico que es un

derivado de la digestión enzimática de la glucosa. Este es responsable de la acidez de la miel y contribuye grandemente a su sabor característico (22).

#### 4.7.3.2 Minerales:

Está presente en cantidades muy pequeñas el potasio que es el más abundante. Mieles oscuras, particularmente las mieles Hawaianas son las más ricas en estos minerales.

Otros elementos, incluyen compuestos nitrogenados, que se originan de las secreciones salivales de las abejas obreras melíferas.

Las enzimas principales de la miel son sacarosa, amilasa y glucosa oxidasa.

Casi ausente en la miel recién producida, hay un elemento que es hidroximetilfurfural (HMF) es un subproducto del decaimiento de la fructuosa, que se forma durante el almacenamiento o calentamiento de la miel. Así su presencia es considerada como el indicador principal de la deterioración de la miel (14, 22).

#### 4.7.4 Propiedades antimicrobiales de la miel:

- El efecto osmótico
- La acidez
- El peróxido de hidrógeno
- Los factores fitoquímicos
- La inhibina ( 5, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 22).

La miel tiene propiedades antimicrobiales que han sido conocidas por mas de un siglo. Se ha usado como una medicina desde hace mucho tiempo en muchas culturas, fue usada como un remedio eficaz por sus propiedades antimicrobiales.

Se establece que la miel inhibe un espectro ancho de especies bacterianas. Hay muchos informes sobre la actividad bactericida y bacteriostática, antifungal (20).

##### 4.7.4.1 Efecto osmótico:

La miel es una solución de azúcares saturadas o sobresaturadas, en un 84% son una mezcla de fructosa y glucosa. El volumen de agua es normalmente 15 – 21% del peso total. La fuerte interacción de estas moléculas de azúcares con moléculas de agua deja muy pocas moléculas de agua disponibles para los microorganismos. Esta agua libre es la que es medida en la actividad del agua ( $a_w$ ) los valores significativos de la miel han sido reportados de 0.562 a 0.62 . Además algunas levaduras

pueden vivir en las mieles que tienen un alto contenido de agua, causando descomposición de la miel, el nivel de agua de la miel diluida es muy bajo para mantener el crecimiento de algunas especies, no se da la fermentación si el contenido de agua es menor 17.1%. Algunas especies de bacterias tienen el crecimiento completamente inhibido si el contenido de agua se encuentra en el rango de 0.94 a 0.99. Estos valores corresponden a soluciones típicas de miel (contenido de agua 0.6 sin diluir) de 12% a menos de 2%. Por otro lado algunas especies tienen su máximo rango de crecimiento cuando el contenido de agua es 0.99, así la inhibición del efecto osmótico de las soluciones de miel diluida obviamente depende de las especies de bacterias (20).

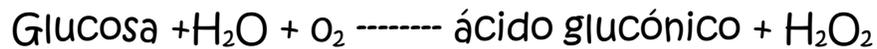
#### 4.7.4.2 Acidez:

La miel es característicamente bastante ácida, su pH se encuentra entre 3.2 y 4.5 que es lo suficientemente bajo para inhibir el crecimiento de bacterias. El pH óptimo para el crecimiento de las bacterias es de 7.2 a 7.4. El pH mínimo para el crecimiento de algunas especies infecciosas en heridas es, *Escherichia coli*, 4.3; *Salmonella sp*, 4.0; *Pseudomonas aeruginosa*, 4.4; *Streptococcus pyogenes*, 4.5. La miel pura, su acidez es un factor antibacterial importante, pero si la miel es

diluida especialmente por los fluidos del cuerpo que están bien buferizados, puede no ser lo suficientemente bajo y perder parte de este factor antibacterial (20, 22).

#### 4.7.4.3 Peróxido de hidrógeno:

La mayor actividad antibacterial de la miel, es debida al peróxido de hidrógeno que se produce enzimáticamente en la miel. La enzima glucoxidasa se secreta en la glándula hipofaringeal de la abeja dentro del néctar para ayudar en la formación de la miel que proviene del néctar.. El peróxido de hidrógeno y acidez de la miel son producidas por la reacción:



que se utilizan para preservar la miel. El peróxido de hidrógeno producido puede tener un efecto de agente esterilizador durante la dilución de la miel. La miel completamente fuerte tiene un nivel de peróxido de hidrógeno negligible por que esta sustancia tiene una vida muy corta en la presencia de iones metales en transición y ácido ascórbico el cual cataliza su descomposición en agua y oxígeno. La enzima se ha encontrado prácticamente inactiva en la miel completa, dando el inicio a peroxido de hidrógeno cuando la miel es diluida. Esto es porque la acidez producida en la acción de las gotas enzimáticas lleva el pH al punto en el cual es muy bajo para que la enzima trabaje.

El peróxido de hidrógeno producido solo sería de efecto como un agente esterilizante durante el proceso de maduración de la miel(20, 22)

#### **4.7.4.4 Factores fitoquímicos:**

La evidencia de la existencia de otros factores antibacteriales es principalmente que los factores generadores de peróxido no cuentan para toda la actividad antibacterial, han habido reportes del aislamiento de algunas sustancias que hacen la función antibacterial en la miel que no son el peróxido de hidrógeno. Además al calentar la miel se inactiva la glucoxidasa, causando pérdida de la actividad contra algunas especies. También la estabilidad de la enzima varía en diferentes mieles, se han reportado mieles con alta estabilidad que muestran un factor antibacterial adicional. La evidencia más directa de la existencia de factores antibacteriales que no son el peróxido en la miel se ven en reportes de persistencia de actividad en mieles tratadas con catalasa para remover la actividad del peróxido de hidrógeno. Varios químicos con actividad antibacterial han sido identificados en la miel por varios investigadores: pinocembrin, terpenos, alcohol benzílico, 3.5 ácido dimethoxy'4hidroxibenzoico, 2 hidroxyl-3 ácido fenilpropionico, 2 hidroxibenzoico. Sin embargo las cantidades de estas sustancias

estaban presentes en bajas cantidades, para considerar su actividad inhibitoria (14,20).

#### **4.7.4.5 Inhibina:**

La presencia de una actividad antibacteriana en dicho producto fue dada a conocer por el año 1940, y ha sido confirmada en varios laboratorios. Generalmente se ha estado de acuerdo, en que la inhibina (nombre usado por Dold, su descubridor, para la actividad antibacteriana) es sensible al calor y a la luz. El efecto del calentamiento de la miel sobre su contenido de inhibina ha sido estudiado por varios investigadores. Según parece, el calentamiento suficiente para reducir notablemente o destruir su actividad inhibina le restaría mercado, como miel de primera calidad, en varios países europeos (5, 15, 22).

La actividad antibacterial es la más fácil de evaluar y la más estudiada. En la miel normal se atribuye a las altas concentraciones de azúcar y acidez. En la miel diluida se ha demostrado actividad antibacterial, el ingrediente activo fue atribuido a una sustancia genéricamente llamada inhibina. Mucha de esta actividad fue más tarde atribuida al peróxido de hidrógeno un subproducto enzimático de la formación de ácido glucónico de la glucosa (5, 15, 22).

#### 4.7.5 Usos de la miel:

- Tratamiento de mastitis
- Tratamiento en úlceras pépticas
- Tratamiento de gastroenteritis
- Tratamiento de tineas.
- Poder laxante
- Tratamiento de heridas.
- Curaciones rápidas
- Estimulación de la regeneración de tejido
- Reducción de inflamación
- Oftalmología (12, 13, 20).

#### 4.8 PLACA PETRIFILM.

##### 4.8.1 Descripción:

Un Petrifilm mide 19.5 x 7.5 centímetros y tiene apenas 1 mm de espesor. Consiste en una película base con una capa de medio de cultivo completamente seco. Esta película está cubierta por una película superior de cubierta. También está presente en el medio un colorante indicador que contiene tretazolio, este colorante sirve para identificar las bacterias Gram. negativas.

En la aplicación normal del Sistema 3M Petrifilm, la película superior tiene que ser levantada y 1 ml del líquido

prueba debe colocarse en la hendidura circular de la película inferior. Después de cerrarlo con la película superior, el líquido de prueba tiene que ser distribuido uniformemente por medio de la lámina de plástico proporcionada .

#### **4.8.2 Placa para recuento aeróbico:**

Componentes: Nutrientes de métodos Estándar, digerido pancreático de caseína, extracto de levadura, glucosa, goma guar.

Tiempo de incubación: 48 horas, se recomienda revisar las placas a las 24 horas y tomar lectura final a las 48 horas (17).

Temperatura: Para productos lácteos se recomienda una temperatura de 32 °C. y para otros productos la temperatura recomendada es de 35 a 37 °C.

Características de las colonias: Colonias rojas con diferente intensidad, tamaño y forma.

Todas las placas Petrifilm son fabricadas en operaciones certificadas ISO 9002 y bajo procedimientos de control para asegurar resultados persistentes entre pruebas y pruebas y de laboratorio a laboratorio. Los métodos de prueba Petrifilm han sido probados en estudios en colaboración y están incluidos en los Métodos Oficiales de Análisis publicados por la AOAC Internacional. Las placas Petrifilm están reconocidas también como métodos oficiales por la ANFOR así como otras.

Petrifilm ha sido utilizado en diversas áreas de estudio, a continuación se describirán algunos trabajos en los que se ha usado Petrifilm:

\* En Italia se utilizó Petrifilm para evaluar el control microbiano de materias primas para cosméticos, en donde dio excelentes resultados al ser comparado con el vaciado en placa (Placa de Petri) donde los conteos fueron de 60 UFC/ml y 45 UFC/ml respectivamente (no hubo diferencias estadísticas significativas).

\* El Ejército Suizo realizó pruebas de Petrifilm en el agua potable, el cual consistía en analizar el agua potable en zonas de conflicto (guerras, desastres) en donde el personal sin experiencia en uso de material de laboratorio hizo las pruebas usando las placas de Petrifilm dando como resultado que el ejército Suizo diera su habal para que el producto se usara para dichas pruebas (17).

#### **4.8.3 Ventajas del sistema petrifilm:**

- Reducir el tiempo extra.
- Incrementar la supervisión y registro (monitoreo) de ingredientes, producto en proceso, y ambiente.
- Implementar un programa de Análisis y Registros y Control de Puntos críticos (HACCP).

- Incrementar la interacción con la línea de producción

#### 4.8.4 Aprobaciones a nivel mundial para petrifilm:

AOAC (Association of Official Analytical Chemist)

APHA (American Public Health Association)

NCIMS (U.S. Grade a Pasteurized Milk Ordinance)

International Dairy Federation.

Canada-Health Protection Branch, Compendium of Analytical Methods

ANFOR-FRANCE

NMKL – Nordic Committee on Food Analysis (17).

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Materiales:

#### 5.1.1 Recursos Humanos

- Investigador
- Tres asesores
- Técnico del laboratorio de Salud Pública Veterinaria.

#### 5.1.2 Recursos Biológicos:

- Muestras de leche cruda de vaca
- Miel de abeja

#### 5.1.3 Material de Laboratorio:

- Placas de petrifilm de recuento de aerobios.
- Placas de petrifilm para recuento de enterobacterias

- Aplicador para placas de petrifilm
- Agua peptonada
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Bandejas
- Beakers de 100, 200 ml
- Probetas de 100, 200, 500 ml
- Mechero Bunsen
- Incubadora bacteriológica
- Aparato cuenta colonias de Québec.
- Autoclave
- Campana bacteriológica.
- Plástico adherente
- Agitadores plásticos.

#### **5.1.4 Materiales de campo:**

- hielera
- Recipientes estériles para transportar la leche
- Identificador de muestras.
- Fichas de control
- Vehículo
- Gasolina
- Computadora

## 5.2 METODOLOGIA.

### 5.2.1 Diseño experimental:

Completamente al azar, donde se probaron cuatro tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Cada tratamiento estaba conformado por 5 muestras de leche cada uno (según norma Coguanor NGO 34 046 hl). En el tratamiento 1 una proporción de 3% de miel, en el tratamiento 2 una proporción de 5% de miel, en el tratamiento 3 un 10% de miel y el tratamiento 4 sin adición de miel.

### 5.2.2 Metodología de laboratorio:

Cada muestra fué de 800 ml de leche fresca, las cuales se dividieron en cuatro submuestras de 200 ml cada una, distribuidas de la siguiente manera:

- \* 200 ml muestra control recuento total y de coliformes
- \* 200 ml de leche con adición de 3% miel, con siembras a 1 hora, 6 y 24 hrs.
- \* 200 ml de leche con adición de 5% miel, con siembras a 1 hora 6 y 24 hrs.
- \* 200 ml de leche con adición de 10% miel, con siembras a 1 hora 6 y 24 hrs.

Cada una de las muestras se homogenizó y procedió a ser diluciones en agua peptonada, hasta una dilución de  $10^{-3}$ , para posteriormente sembrar en Petrifilm e incubar de 24 a 48 horas

para su lectura. Esto se realizó para los diferentes porcentajes de adición de miel a la leche y sus diferentes tiempos de siembra.

Las muestras de leche se mantuvieron a temperatura ambiente. Y cada una de éstas se sembró en su tiempo correspondiente en las placas de petrifilm.

Tratamiento 1 (control) = Volumen de leche cruda 200 ml.

- Evaluación de su carga Bacteriológica (siembras en Pertrifilm)
- Sin adición de miel de abeja.
- Evaluación de su carga Bacteriana a 1 hora, 6 horas y 24 horas.

Tratamiento 2 = Volumen de leche cruda 200 ml

- Evaluación de su carga Bacteriológica (siembras en Petrifilm)
- Adición de miel de abeja en un 3% a la muestra de leche de VaCa
- Evaluación de su carga Bacteriana a 1 hora, 6 horas y 24 horas; post-adición.

Tratamiento 3 = Volumen de leche cruda 200 ml.

- Evaluación de su carga Bacteriológica (siembras en Petrifilm)

- Adición de miel de abeja en un 5% a la muestra de leche de vaca
- Evaluación de su carga Bacteriana a 1 hora, 6 horas y 24 horas; post-adición.

Tratamiento 4 = Volumen de leche cruda 200 ml:

- Evaluación de su carga Bacteriológica (siembras en Petrifilm)
- Adición de miel de abeja en un 10% a la muestra de leche de vaca
- Evaluación de su carga Bacteriana a 1 hora, 6 horas y 24 horas, post-adición.

### 5.2.3 Metodología de muestreo:

La toma de muestras de leche se realizó al momento del ordeño habitual, de las vacas en producción de la granja experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Las ubres reciben un tratamiento de lavado con agua y jabón y posteriormente con desinfección con amonio cuaternario en cada ordeño, posteriormente se eliminó los primeros cuatro chorros de leche de cada cuarto, luego se procedió a tomar la muestra para el estudio (800 ml), en recipientes estériles identificados debidamente, para luego así

ser transportadas en hieleras al departamento de Salud Pública Veterinaria en donde se realizaron los análisis correspondientes.

#### **5.2.4 Procedimiento de siembra de petrifilm:**

##### **Inoculación de las placas.**

Se utilizó 1 ml de dilución  $10^{-3}$  de leche fresca, en los diferentes tiempos, y concentraciones de miel.

Sembrar y distribuir con el aplicador una placa de Petrifilm antes de empezar a inocular siguiente.

1. Colocar la placa Petrifilm EC en una superficie plana
2. Levantar el film superior y colocar 1 ml de la muestra o su dilución en el centro del film inferior.
3. Bajar con cuidado el film superior sobre la muestra evitando introducir burbujas de aire
4. Colocar el aplicador con la cara hacia abajo en el centro de la placa
5. Distribuir la muestra uniformemente presionando suavemente en el centro del aplicador. No deslizar el aplicador sobre el film.
6. Sacar el aplicador y esperar al menos un minuto para permitir que solidifique el gel.
7. Incubar las placas en una posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas. El incubador debe estar

humidificado. La humedad perdida por la placa (que se indica en el peso) no debe exceder del 15% durante las 48 h de incubación.

### 5.3 ANÁLISIS DE DATOS:

Para establecer la reducción de la carga bacteriana de los diferentes tratamientos se realizó un **análisis de Varianza** en cada tiempo establecido, para comparar los promedios de carga bacteriana.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto bactericida de la miel de abeja en leche cruda de vaca en tres diferentes concentraciones (3%, 5%, 10% más un grupo control); se utilizaron cinco muestras de leche cruda, para lo cual se hicieron 10 repeticiones efectuando siembras a una, seis, y veinticuatro horas post-adición de miel; y sus respectivas lecturas a 24 - 48 horas después.

En el tratamiento de la leche con 10% de miel a una hora de aplicada se obtuvo el mejor efecto bactericida alcanzando una destrucción del **64.47%** de la carga bacteriana aerobia; en tanto que con el mismo 10%, pero con 6 horas de tiempo, se observó que fue decreciendo su efecto bactericida llegando tan solo al **47.73%** de la carga bacteriana aerobia; a las veinticuatro horas se observa que la adición de los diferentes porcentajes de miel no reduce el crecimiento de aerobios sino por el contrario este se incrementa. (anexo 2 y 3)

Los resultados que se obtuvieron se deben a las propiedades antimicrobiales de la miel como lo son su pH, factores fitoquímicos, peróxido de hidrógeno, y la inhibina, estos actúan en un tiempo relativamente corto ( 1 y 6 horas); el pH de la miel juega un papel importante ya que por

ser ácido (3.2 - 4.5) no es el adecuado para la mayoría de microorganismos que necesitan un pH óptimo de 7.2 a 7.4 para su crecimiento, los demás factores como el peróxido de hidrógeno, la inhibina y los factores fitoquímicos se encuentran en menor cantidad en la miel por lo tanto su actividad inhibitoria es baja.

En el tratamiento de la leche de vaca con 3% de miel adicionada a una hora; se puede observar que alcanza el mayor efecto bactericida reduciendo en un **18.96%** la cantidad de coliformes, en tanto que la adición de miel en los distintos porcentajes (5% y 10%) no tienen efecto en ellas sino más bien incrementa el recuento de coliformes a las seis y veinticuatro horas. (Anexo 4, 5)

El porcentaje obtenido en la reducción de coliformes no fue tan evidente como se esperaba, por las características antimicrobiales de la miel, todos los factores disminuyen la carga bacteriana, pero en el caso de los coliformes debido a que se desarrollan en pH bajos, el efecto bactericida no se cumple como tal y los demás factores son de corto tiempo de duración por eso en los porcentajes del 5% y 10% a 6 y 24 horas aumenta su carga bacteriana.

Los promedios obtenidos de los diferentes

tratamientos fueron sometidos a un análisis de Varianza y la prueba de Tukey; concluyéndose que; con respecto a los aerobios la mayor reducción estadísticamente significativa de bacterias fue adicionando el 10% de miel y en un tiempo corto de una y seis horas, y con los coliformes la mayor reducción de bacterias estadísticamente significativas fue al 3% de miel y una hora post-adición.

## VII. CONCLUSIONES

- La adición del 10% de miel de abeja a la leche cruda de vaca reduce en un 64.47% el recuento de aerobios una hora después de aplicada la miel.
- La adición del 10% de miel de abeja a la leche cruda de vaca, reduce en un 47.73% el recuento de aerobios a seis horas de aplicada la miel.
- En coliformes presentes en la leche el mejor efecto bactericida de la miel se observa al 3% a una hora, post-adición , alcanzando solamente el 18.96% de reducción de coliformes.
- Los diferentes porcentajes de miel de abeja, utilizadas en este estudio aplicadas en leche cruda de vaca después de 24 horas no tiene efecto bactericida.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Utilizar la miel de abeja como preservante natural de la leche a nivel rural; para el transporte a centros de acopios con un lapso de 1 a 6 horas.
- Que las instituciones que velan por la calidad de los alimentos difundan el uso de la miel, como preservante de la leche cruda, en un tiempo corto.
- Continuar los estudios para evaluar los cambios de las características organolépticas de la leche, por las diferentes concentraciones utilizadas para reducir carga bacteriana presente.
- Utilizar miel de abeja solamente en leche cruda de vaca, que ha sido sanitariamente manejada (libre de contaminación fecal).

## IX. RESUMEN

El estudio se enfocó en la evaluación del efecto bactericida de la miel de abeja aplicada a la leche cruda de vaca, el cual se efectuó en el laboratorio de Salud Pública Veterinaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se evaluaron 5 muestras de leche, estas mismas se subdividieron en 4 submuestras de 200 ml cada una, siendo estas la muestra control, la segunda muestra con adición al 3% de miel la tercera con el 5% de miel y una última muestra con 10% de adición de miel. La carga bacteriana se evaluó a la hora cero (muestra control), una hora, seis horas y 24 horas post adición de miel, a temperatura ambiente y todas estas con diez repeticiones de cada una.

Las siembras bacterianas se hicieron en placas petrifilm<sup>®</sup>, para recuento de Coliformes y para recuento de Aerobios (recuento total), se incubaron a 32 °C durante 24 – 48 horas, para su lectura, por medio del cuenta colonias Québec.

El tratamiento de la leche con 10% de miel de abeja se puede observar que alcanza la mayor reducción en el crecimiento de bacterias aerobias en un 64.47% a 1 hora de

adicionada la miel, al utilizar el 10% de miel de abeja se observa una reducción de 47.73% de bacterias aerobias a 6 horas de adicionada la miel. De los diferentes porcentajes de miel (3%, 5% y 10%) adicionados a la leche de vaca, al evaluarlos a 24 horas se estableció que no reduce el crecimiento de aerobios sino por el contrario este se incrementa.

El tratamiento de la leche con 3% de miel de abeja a una hora de adicionada, se observa que alcanza el mayor efecto en el crecimiento de bacterias coliformes reduciendo solo un 18.96% el recuento de estos. Los distintos porcentajes (5% y 10%) incrementa el recuento de coliformes a las seis y veinticuatro horas.

La disminución de la carga bacteriana observadas en el experimento tiene explicación basada en las propiedades antimicrobiales de la miel de abeja como lo son: Su ph, él peróxido de hidrógeno, factores fitoquímicos y la inhibina. Y su aumento de carga bacteriana horas después es debido a que estas propiedades se pierden rápidamente.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. AGENJO CECILIA, C. 1980. Enciclopedia de la inspección veterinaria y  
Análisis de alimentos. Madrid, España - Espasa-Calpe, S.A.  
p. 1039-1053, 1131-1140.
2. ALAIS, C. 1984. Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Trad.  
por Antonio Lacasa. México, Continental, S.A. p. 32-37, 178-201,  
217-239.
3. BIANCHI, E. M. 1990. Control de calidad de la miel y la cera. Boletín de  
servicios agrícolas de la FAO 68/3. Argentina, FAO.  
P. 3-7
4. CODEX STAN 12- 1981: Norma del codex para la miel.  
1981. s.n.t. 4p. Tomado de internet:  
[http://www.todomiel.com.ar/seccion\\_normativas/code\\_xstan12\\_81](http://www.todomiel.com.ar/seccion_normativas/code_xstan12_81).
5. DEL NÉCTAR a la miel. 2001. s.n.t. 2p. Tomado de internet:  
<http://www.juntex.es/consejerias/eic/dgc/miel/nectar/html>

6. DE LA leche y productos lácteos. 2000. s.n.t. 10p.  
Tomado de  
internet:  
[http://www.usembassy.cl/agriculture/fas8\\_9s.htm](http://www.usembassy.cl/agriculture/fas8_9s.htm)
7. DIAZ MENDO, P.M. 2000. La miel y su mundo. Apitec (Méx.) 20: 5-7
8. ERNOS, V. 1971. Hay dinero y salud en la abeja. España, Sintés, S. A.  
59-83p.
9. HARMAN, A. 1999. Antibacterial honey. s.n.t. 2p.  
Tomado de internet:  
<http://www.nhb.org/articles/antibac.html>
10. INTRODUCCIÓN A la apicultura. 2001. s.n.t. 2p.  
Tomado de internet:  
<http://www.galeon.com/ttukun/pagina2html>
11. MCCARTHY, J. 1995. Antibacterial effects of honey.  
University of  
Guelph, s.n. 2p Tomado de internet :  
<http://members.tripod.com/-ann/antibac.html>
12. MIEL DE abejas. 2001. s.l., Apitel. 3p Tomado de  
internet:  
<http://www.apitel.cl/miel.htm>

13. MOLAN, P. 2000. *Apitec (Méx)* 20:34-39
14. MORSE, R.A., and HOOPER. 1985. *The illustrated enciclopedia of Beekeeping*. E:E:U:U:, Dutton. 187p.
15. MIEL. 2001. s.l., Roberti. 2p. Tomado de internet:  
<http://www.dietetica-visual.com.ar/roberti/miel.htm>
16. ROOT, A.I. 1959. *ABC y XYZ de la apicultura: enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas*. Trad. por Julio L. Mulvany.  
15 ed. Argentina, Hachetre. 384-397p.
17. SANTOS GONZALEZ, A.A. 2000. *Evaluación del efecto bactericida de las ondas electromagnéticas aplicadas a la leche cruda*. Tesis  
Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala,  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 40 p.
18. SHAWKI, IBRAHIM, A. 2000. *Antibacterial action of honey*. s.n.  
Kuwait, Islam set. 4p Tomado de internet:

<http://www.islamset.com/sc/honey/shawki.html>

19. TECNICAS MEJORADAS de procesamiento de productos lácteos.

2000. s.l., FAO. 18p. Tomado de internet:

[http://www.fao.org/inpho/vlibrary/new\\_else/x5692s04.htm](http://www.fao.org/inpho/vlibrary/new_else/x5692s04.htm)

20. THE HEALING effects of honey. 2000. s.n. United Kingdom,

Salafi publications. 19p. Tomado de internet:

<http://www.spubs.co.uk/isco005b.htm>

21. UŞTÜNOL, Z. 2000. The effect of honey on the growth of

bifidobacteria: Summary of a research project funded by the

National Honey Board and conducted at Michigan State

University. s.n.t. 8p Tomado de internet:

<http://www.nhb.org>

22. VALUED-ADDED products from beekeeping. s.l., FAO. 21p

Tomado de internet:

<http://www.fao.org/docrep/wo076e/wo076e04.htm>

## XI. ANEXOS

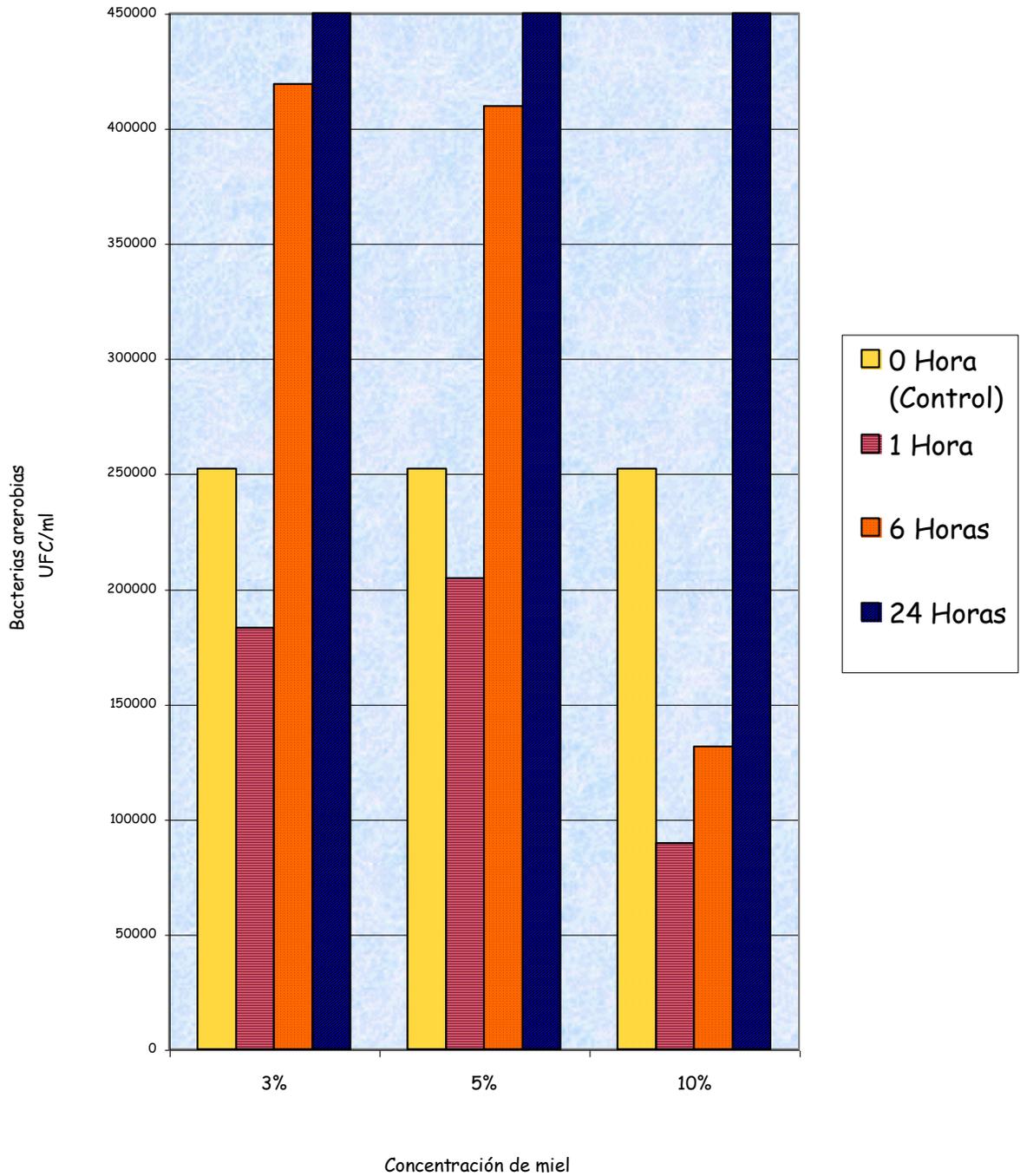


**ANEXO No 2 RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE MIEL APLICADOS A LECHE CRUDA DE VACA EVALUANDO SU EFECTO BACTERICIDA (AEROBIOS) EN DIFERENTES TIEMPOS. Guatemala 2001**

Tiempo	3% Miel UFC/ml	5% Miel UFC/ml	10% Miel UFC/ml
0 Hora (Control)	252000	252000	252000
1 Hora	182840	204680	89520
6 Horas	419200	409600	131640
24 Horas	*MNPC	*MNPC	*MNPC

\*MNPC = Muy numeroso para contar

ANEXO No. 3 RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE MIEL APLICADOS A LECHE CRUDA DE VACA EVALUANDO SU EFECTO BACTERICIDA (AEROBIOS) EN DIFERENTES TIEMPOS. Guatemala 2001



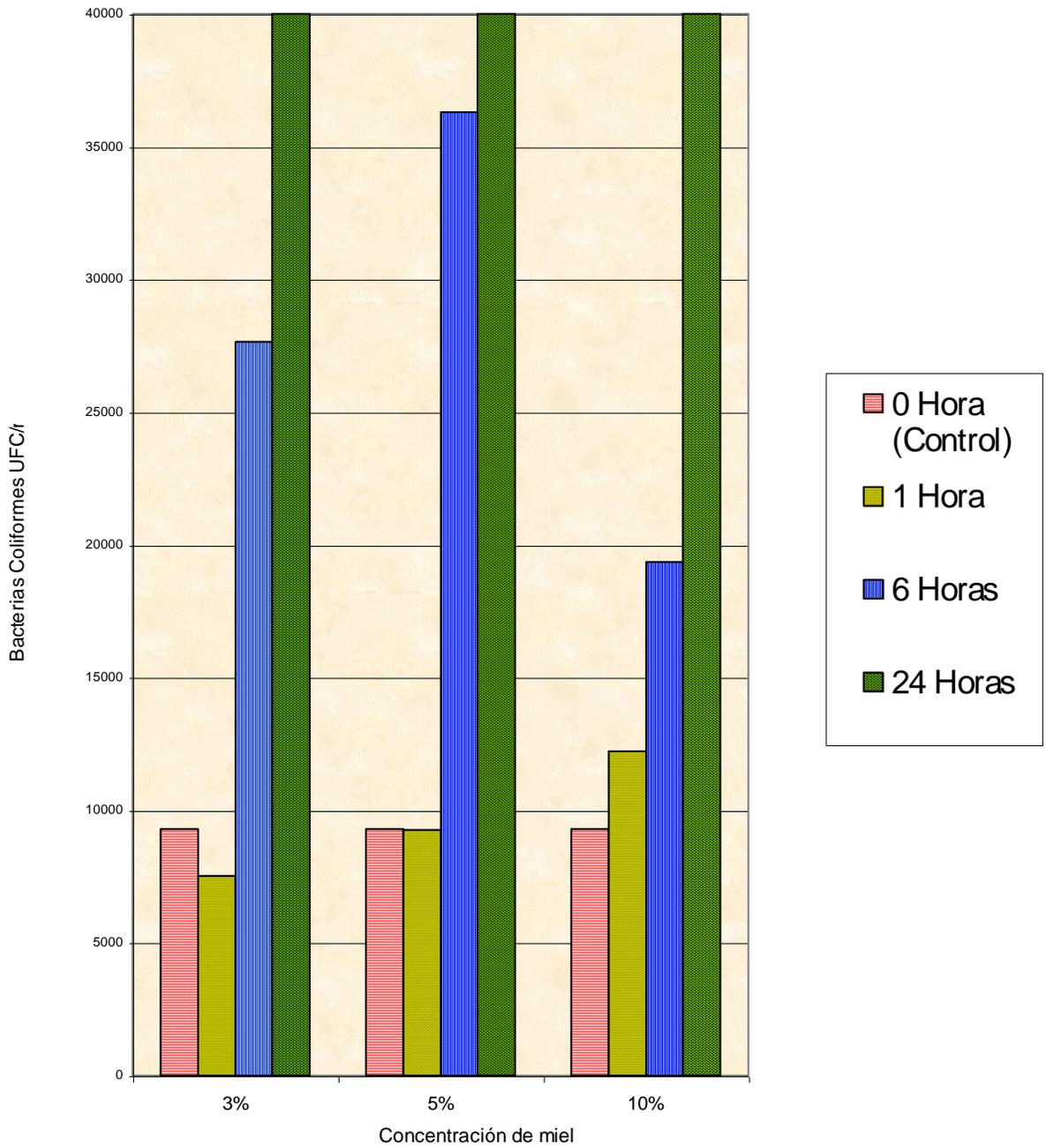
**ANEXO No 4 RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE MIEL APLICADOS A LECHE CRUDA DE VACA EVALUANDO SU EFECTO BACTERICIDA (COLIFORMES) EN DIFERENTES TIEMPOS.**

**Guatemala 2001**

Tiempo	3% Miel UFC/ml	5% Miel UFC/ml	10% Miel UFC/ml
0 Hora (Control)	9280	9280	9280
1 Hora	7520	9240	12200
6 Horas	27640	36280	19360
24 Horas	*MNPC	*MNPC	*MNPC

\*MNPC= Muy Numeroso Para Contar

**ANEXO No.5 RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE MIEL APLICADOS A LECHE CRUDA DE VACA EVALUANDO SU EFECTO BACTERICIDA (COLIFORMES) EN DIFERENTES TIEMPOS. Guatemala, 2001**



---

M.E.P.U. Juan Carlos Ramón Vidaurre Lemus  
Investigador

---

Dr. Willson Valdez Melgar  
R. Méndez S.  
Asesor

---

Dr. Jaime  
Asesor

---

Lic. Robin Ibarra  
Asesor

Imprímase

Quan

---

Dr. Mario E. Llerena

DECANO