



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL DETERGENTE EN SISTEMA
DE ORDEÑO Y TINA DE ENFRIAMIENTO CON TRATAMIENTO DE
AGUA PARA MEJORAR INOCUIDAD DEL PREDIO EN NANEGALITO



AUTOR

Tatiana Elizabeth Carrera Barahona

AÑO

2020



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL DETERGENTE EN SISTEMA DE
ORDEÑO Y TINA DE ENFRIAMIENTO CON TRATAMIENTO DE AGUA PARA
MEJORAR INOCUIDAD DEL PREDIO EN NANEGALITO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía

Dr. Joar Marcelino García Flores

Autora

Tatiana Elizabeth Carrera Barahona

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, determinación de la eficacia del detergente en sistema de ordeño y tina de enfriamiento con tratamiento de agua para mejorar inocuidad del predio en Nanegalito, a través de reuniones periódicas con el estudiante Tatiana Elizabeth Carrera Barahona, en el semestre 2020-10, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Dr. Joar García Flores

CC: 170865547-5

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, determinación de la eficacia del detergente en sistema de ordeño y tina de enfriamiento con tratamiento de agua para mejorar inocuidad del predio en Nanegalito, del estudiante Tatiana Elizabeth Carrera Barahona, en el semestre 2020-10, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



MVZ. David Francisco Andrade Ojeda MgSc.

CC: 1712693165

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes."

A handwritten signature in purple ink, appearing to be 'Tatiana EB', written over a horizontal line.

Tatiana Elizabeth Carrera Barahona

CC: 172440104-5

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que con su guía culmine una etapa más de mi vida.

A mis hermanos Carlin y Estefy que me apoyaron en todo momento.

A Faby que siempre me apoyo en toda circunstancia, me brindo su amistad, cariño y consejos.

A mis amigas Majo y Yessy que me apoyaron con ánimos para seguir durante la vida universitaria.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi familia que siempre estuvo apoyándome emocionalmente como económicamente y me permitió llegar hasta aquí.

A mi Toby, Lucas y Oso que fueron mi inspiración para seguir esta carrera

RESUMEN

Introducción: Los equipos que se utilizan en el sistema de ordeño y las superficies internas o externas pueden mantenerse afectados negativamente por la contaminación bacteriana, luego de haber sido limpiados y desinfectados con productos químicos. **Objetivo:** evaluar el efecto del detergente en el sistema de ordeño y tina de enfriamiento con la prueba de cultivo aplicando el tratamiento de aguas duras para la mejorar de la calidad de leche y procesos de limpieza y desinfección. **Metodología:** se hizo el tratamiento de aguas duras con el método de hervir el agua para bajar la dureza y los análisis se hicieron el laboratorio Labanncy; se recolectó muestras utilizando hisopos Quick Swab® 3M, en el laboratorio Livexlab se hicieron pruebas la primera fue de cuantificación de UFC y la segunda fue de identificación bacteriana. **Resultados:** mostraron en cuantificación con el detergente alcalino una disminución de carga bacteriana en pezoneras 28 UFC, tapa del tanque 20 UFC, manguera 280 UFC, tanque 280 UFC y en la identificación presencia de bacterias *Pseudomona spp.* *Eschericha coli*, *Klebsiella spp*; al igual se encontró baja cantidad de microorganismos con el detergente ácido en pezoneras 20 UFC, tapa del tanque 930 UFC, manguera 300 UFC, tanque 260 UFC, tina de enfriamiento 256 UFC y en su identificación la presencia de nuevas bacterias *Bacillus spp*, *Estreptococo uberis* y manteniéndose la *Eschericha coli*. **Conclusión:** es un llamado a la producción lechera de las haciendas para verificar los protocolos de limpieza y desinfección, recalcando que deben analizar la dureza del agua que utilizan en las instalaciones del sistema de ordeño, ya que se comprobó que el efecto del detergente si varía con relación a la dureza del agua, el estudio mostró los resultados de 79mg/L CaCO₃ dureza temporal y con la aplicación del tratamiento de la dureza del agua se consiguió el resultado de 58mg/L CaCO₃ convirtiéndola en agua blanda, lo que favoreció y mejoró el proceso de limpieza y desinfección para bajar la cantidad bacteriana.

ABSTRACT

Introduction: The equipment used in the milking system and internal or external surfaces can be negatively affected by bacterial contamination, after having been cleaned and disinfected with chemicals. **Objective:** evaluate the effect of the detergent on the milking system and cooling tub with the culture test by applying the hard water treatment to improve the quality of milk and cleaning and disinfection processes. **Methodology:** the hard water treatment was done with the method of boiling the water to lower the hardness and the analyzes were made in the Labancy laboratory; samples were collected using Quick Swab® 3M swabs, in the Livexlab laboratory tests were performed the first was quantification of CFU and the second was bacterial identification. **Results:** they showed in quantification with the alkaline detergent a decrease of bacterial load in teats 28 CFU, tank cover 20 CFU, hose 280 CFU, tank 280 CFU and in the identification presence of *Pseudomone spp* bacteria. *Eschericha coli*, *Klebsiella spp*; Likewise, a low amount of microorganisms was found with the acid detergent in 20 UFC lids, tank cover 930 UFC, hose 300, tank 260 UFC, cooling tub 256 UFC and in its identification the presence of new bacteria *Bacillus spp*, *Streptococcus uberis* and maintaining the *Eschericha coli*. **Conclusion:** it is a call to the dairy production of the farms to verify the cleaning and disinfection protocols, emphasizing that they must analyze the hardness of the water they use in the milking system facilities, since it was verified that the effect of the detergent does vary with regard to water hardness, the study showed the results of 79mg / L CaCO₃ temporary hardness and with the application of water hardness treatment the result of 58mg / L CaCO₃ was achieved by converting it into soft water, which favored and improved the cleaning and disinfection process to lower the bacterial amount.

Key words: cleaning, disinfection, bacteria, water hardness.

ÍNDICE

1. CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo General	3
1.1.2 Objetivo Específicos	3
1.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	4
2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO	5
2.1 FACTORES DE CONTAMINACIÓN DEL AGUA	5
2.2 Clasificación de compuestos minerales del agua	7
2.2.1 Características de agua dura	7
2.2.2 Clasificación de la dureza del agua	7
2.2.3 Tratamiento de la dureza del agua	8
2.3 HIGIENE, LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN	8
2.3.1 Higiene de personal	8
2.3.2 Higiene de instalaciones antes, durante y después del ordeño	9
A Limpieza en el equipo y mangueras	10
B Frecuencia de la limpieza	12
C Materiales de limpieza y desinfección	13
D Productos que se utiliza para la limpieza	14

E Volumen de agua para desinfección	14
F Temperatura de agua para la desinfección.....	15
2.3.3 Agentes químicos de desinfección	15
2.3.3.1 Detergente alcalino	15
2.3.3.2 Detergente ácido	15
2.4 INOCUIDAD.....	16
2.4.1 Bacterias aerobias mesófilas	16
2.4.2 Bacteria Pseudomona spp	16
2.4.2.1 Características.....	16
2.4.2.2 Patogénesis.....	17
2.4.2.3 Diagnóstico de laboratorio	17
A Cultivo in vitro	17
2.4.2.4 Identificación de Pseudomona spp.....	18
2.4.3 Bacteria Escherichia coli.....	18
2.4.3.1 Características.....	19
2.4.3.2 Patogénesis	19
2.4.3.3 Diagnóstico de laboratorio	19
A Cultivo in vitro.....	19
2.4.3.4 Identificación de Escherichia Coli	20
2.4.4 Bacteria Klebsiella spp.....	20

2.4.4.1 Características.....	20
2.4.4.2 Patogénesis	21
2.4.4.3 Diagnóstico de laboratorio	21
A Cultivo in vitro.....	21
2.4.4.4 Identificación de Klebsiella spp.....	22
2.4.5 Bacteria Bacillus spp.....	22
2.4.5.1 Características.....	22
2.4.5.2 Patogénesis	22
2.4.5.3 Diagnóstico de laboratorio	23
A Cultivo in vitro.....	23
2.4.5.4 Identificación de Bacillus spp.....	23
2.4.6 Bacteria Streptococcus uberis	23
2.4.6.1 Características.....	23
2.4.6.2 Patogénesis	24
2.4.6.3 Diagnóstico de laboratorio	24
A Cultivo in vitro.....	24
2.4.6.4 Identificación de Streptococcus uberis.....	24
2.5 OTRAS BACTERIAS EN GENERAL	25
3 CAPITULO III METODOLOGÍA.....	26
3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	26

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	27
3.2.1 Muestras	27
3.3 MATERIALES	28
3.3.1 Materiales para toma de muestras y transporte.....	28
3.3.2 Materiales de laboratorio.....	29
3.3.3 Equipos de laboratorio	30
3.4 METODOLOGÍA	30
3.4.1 Preparación de medios de cultivo y entrenamiento en el laboratorio	30
3.4.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio.....	33
3.4.4 Identificación bacterias	34
3.4.5 Análisis Estadístico	36
4 CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1 Resultados de la dureza total del agua	37
4.3 Resultados del detergente ácido.....	42
5 CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
5.1 Conclusiones	48
5.2 Recomendaciones	49
REFERENCIAS.....	50

ANEXOS	55
--------------	----

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Tipos generales de contaminantes del agua</i>	6
Tabla 2 <i>Clasificación de aguas según el grado de dureza</i>	8
Tabla 3 <i>Limpieza de Equipo</i>	11
Tabla 4 <i>Resumen de características más importantes</i>	13
Tabla 5 <i>Resultados de la dureza total del agua</i>	38
Tabla 6 <i>Resultados del detergente alcalino sin y con el tratamiento de dureza del agua y valor %</i>	40
Tabla 7 <i>Resultados del detergente ácido sin y con el tratamiento de dureza del agua y valor %</i>	44

Índice de figuras

<i>Figura 1</i> Detergente Alcalino en gráfico de barras	41
<i>Figura 2</i> Detergente Acido en grafico de barras	45

1. CAPITULO I INTRODUCCIÓN

La calidad de leche en función del mercado y seguridad de los productos lácteos puede afectarse negativamente por la contaminación bacteriana. Los equipos que se utilizan en el ordeño y las superficies externas e internas de las instalaciones que están en contacto con la leche, pueden ser afectados por la suciedad o el estiércol y estos deben ser limpiados y desinfectados después de cada ordeño. La tina de enfriamiento y tanques de almacenamiento también deben tener un proceso de desinfección (Simoes M., 2010).

La disponibilidad de instalaciones en el sistema de ordeño, no aseguran la asepsia en su totalidad durante el proceso de recolección de leche. A pesar de los protocolos de limpieza y desinfección se da la probabilidad de encontrar bacterias que pueden producir enfermedades si llegan a desarrollarse. Esto puede generarse por falta de protocolos estandarizados en los hatos lecheros para la limpieza y desinfección (Sundberg M., 2011).

Otro punto importante es la dureza del agua que afecta la eficacia del detergente en el proceso de limpieza y desinfección, sobre este tema se desarrolla el presente estudio con el tratamiento de agua para evaluar la eficacia del detergente tanto alcalino y ácido (Jones, 2019).

Los efectos del agua dura más frecuentes son que se manifiesta sobre los jabones, si el agua es dura puede se puede perder la eficacia del detergente usado y producir un mayor desgaste y almacenamiento en forma de manchas de cal en las griferías (Aldabe y Aramendía , 2005).

La eficacia de las sustancias químicas que se utilizan para la desinfección puede afectarse ya que no toman en cuenta la dureza del agua que se utiliza para la

desinfección (Ramesh C. Chandan, 2009). Las áreas superficiales pueden contaminarse fácilmente o bien el detergente puede tener alguna alteración y por ello la eficacia del detergente puede perderse (Jones, 2019).

La leche es un alimento de alto valor nutritivo y de su industrialización se derivan gran cantidad de productos. Por ello es importante la inocuidad ya que si se da alguna alteración en la calidad de leche cruda hay que considerar esto como un problema de salud pública (Ramesh C. Chandan, 2009).

El problema es la carga microbiológica que se presenta en la leche cruda si esta se mantiene o aumenta por la falta de una adecuada inocuidad. La identificación de bacterias en las superficies puede ayudar para evitar enfermedades en el momento del consumo humano (Martin J. Green, 2012).

Los procedimientos que se apliquen para la limpieza y desinfección en el sistema de ordeño y tina de enfriamiento son fundamentales para garantizar la seguridad y calidad de los productos lácteos (Ievgeniia Ostrov, 2016).

Las bacterias como *Salmonella*, *Escherichia Coli* y *Klebsiella spp* pueden provocar enfermedades en los seres humanos a nivel gastro entérico, generando un grave problema de salud pública (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

El propósito de este trabajo es evaluar la dureza del agua para darle un tratamiento, y conocer sobre la eficacia del detergente mediante aislamiento de bacterias que se encuentren en las superficies aplicando la prueba de cultivo e identificación de bacterias. Para ello este trabajo se subdivide en: dos fases, la primera fase es toma de muestras en el reservorio de agua para evaluar la dureza y toma de muestras de las superficies del sistema de ordeño y tina de enfriamiento para evaluar el protocolo de desinfección que llevan en la hacienda;

la segunda fase corresponde a la toma de muestras de agua ya tratada, tomas de muestra de las superficies del sistema de ordeño y toma de muestra de la tina de enfriamiento ya ajustado y modificado el protocolo de desinfección.

En el presente trabajo se ha realizado una investigación sobre los efectos de la limpieza de los detergentes en condiciones controladas tanto en cantidad de agua como en temperatura, para garantizar el nivel óptimo de higiene en los equipos del sistema de ordeño y tina de enfriamiento, se determinó evaluar la eficacia del detergente para la eliminación de las bacterias que estén en las superficies del equipo en la industria láctea (Sundberg M., 2011).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del detergente en el sistema de ordeño y tina de enfriamiento con la prueba de cultivo aplicando el tratamiento de aguas duras para mejorar la calidad de leche y procesos de limpieza en la hacienda Cachillacta ubicada en Nanegalito.

1.1.2 Objetivo Específicos

- Determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias de las superficies y sistema de ordeño con recuento de mesófilos aerobios totales para valorar la eficacia del detergente en agua tratada.

- Identificar las bacterias patógenas presentes en las superficies antes y después del tratamiento de aguas duras con pruebas diagnósticas para mejorar proceso de limpieza y la calidad en la leche.

1.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El tratamiento de agua tiene efecto sobre la eficacia del producto desinfectante y el protocolo de sanitización en el sistema de ordeño y tina de enfriamiento?

2. CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1 FACTORES DE CONTAMINACIÓN DEL AGUA

El agua es la fuente de vida de todo ser vivo y es importante considerar la calidad del agua. El agua que no tiene condiciones salubres es decir que esté contaminada causa problemas a las personas, puede ser insalubre o contaminada por fuentes naturales o humanas, esto le da un valor alto ya que se utiliza para beber, para regar a las plantas y para limpieza de las diferentes aéreas (Manahan, 2007).

La contaminación del agua tiene diversos factores: agentes patógenos estos son bacterias, virus y parásitos que pueden entrar al agua por desechos orgánicos; sedimentos o materia suspendida estos son partículas que se encuentran en el suelo que enturbian al agua (Chiou, 2002).

A continuación, se presenta en la tabla 1 sobre los diferentes tipos de contaminantes del agua, según (Manahan, 2007):

Tabla 1 *Tipos generales de contaminantes del agua*

Tipo de contaminante	Impacto
Metales pesados	En salud puede ser toxico.
Contaminantes	Toxicidad al agua
Asbesto	Afectando la salud humana
Nutrientes de origen de plantas	Eutrofización
Residuos petroleros	Efectos en la fauna, contaminación visual
Alcantarillado, residuos humanos y de animales	Calidad del agua, niveles de oxígeno
Patógenos	Efectos en la salud

Tomado de (Manahan, 2007).

Todos los factores ya mencionados que contaminen a las aguas residuales causarían serios problemas a la salud tanto de los animales y de los humanos. Por ello es necesario aplicar un tratamiento antes de su vertido, con el fin de bajar la mayor carga de contaminación (Manahan, 2007).

2.2 Clasificación de compuestos minerales del agua

2.2.1 Características de agua dura

La dureza del agua determina la calidad del agua y este parámetro químico permite calificar al agua, se denomina agua dura al agua calcárea, esta posee un alto contenido de minerales, principalmente sales de calcio y magnesio, también la presencia de azufre o hierro, por esta razón la dureza del agua puede ser expresada como dureza total (Alvarado, 2009).

Existen minerales en el agua ya sean iones cargados positivos es catalogada como dureza. La dureza se debe a la presencia de carbonatos y esta se la puede eliminar al hervir el agua, por ejemplo, al agua que es dura no es tan recomendable para el lavado con jabón, ya que el jabón se hace menos soluble en presencia de minerales (Viloria, 2002).

2.2.2 Clasificación de la dureza del agua

La dureza del agua puede ser expresada como las concentraciones de carbonato de calcio. Existen varias clasificaciones del agua respecto a la dureza total, siendo la más utilizada la de la Organización Mundial de Salud (OMS) detallada en la tabla 2 el siguiente orden:

Tabla 2 *Clasificación de aguas según el grado de dureza*

CaCO ₃ y Mg. (mg/L)	Tipo de Agua
0 - 60	Blanda
61 - 120	Moderadamente dura (semi-dura)
121 - 180	Dura
>180	Muy dura

Tomado de (OMS, 2020)

2.2.3 Tratamiento de la dureza del agua

Para esto va a depender si la dureza del agua es temporal o también conocida por la adición de carbonatos de potasio o sodio que van a precipitarse, se hace hervir el agua para ablandarla, solo funciona si la dureza es temporal o el agua es semidura (Alvarado, 2009).

2.3 HIGIENE, LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

2.3.1 Higiene de personal

La calidad de leche exige normas rigurosas, el proceso de obtención de leche en las haciendas cubre aspectos tanto en la salud de las vacas y el correcto procedimiento de ordeño para que sea rápido y eficaz; por ello se debe tener un protocolo de limpieza y desinfección de las instalaciones del hato lechero basado en POES (FAO, 2016).

Es necesario capacitar y concienciar a todo el personal de la hacienda sobre los POES. Con las capacitaciones el personal va a tener conocimiento sobre los productos de limpieza y desinfección de las instalaciones, máquinas y equipos; cabe recalcar que la higiene depende del humano (Agrocalidad, 2012).

La higiene del personal es de gran importancia por ello es necesario dar los materiales de trabajo necesarios para el personal de ordeño como son botas de caucho, guantes, overol o mandil, gorro; estos deben ser limpios y en buen estado, ya que esto baja la contaminación microbiana y favorece a la explotación lechera (FAO, 2016).

El estado de salud del personal debe ser óptimo, las manos del personal de ordeño deben estar limpias con uñas cortas sin adornos, y siempre deben lavarse antes de empezar el ciclo nuevo de ordeño; en las instalaciones del sistema de ordeño debe haber un lavabo, jabón y toallas desechables para la limpieza y desinfección de manos y brazos (Agropal, 2017).

2.3.2 Higiene de instalaciones antes, durante y después del ordeño

La higiene de las instalaciones para el proceso de ordeño debe seguir un protocolo ya que diariamente, se utiliza bastante agua y productos para la asepsia y desinfección. El personal que se encarga del ordeño debe seguir el protocolo como rutina de ordeño para minimizar la incidencia de contaminación ambiental. La higiene ayuda a mejorar o mantener una buena calidad de leche (Agropal, 2017).

A Limpieza en el equipo y mangueras

Para iniciar el proceso de ordeño hay que verificar si el equipo de ordeño está limpio, los materiales que se usan para el proceso de ordeño deben ser resistentes y adecuados para no afectar la composición de la leche (FAO, 2016).

Es necesario seguir las instrucciones de los fabricantes de productos químicos para tener una adecuada limpieza en las instalaciones y sala de ordeño, ya que estas se utilizan diariamente y de manera que no deben provocar un efecto negativo sobre la leche (Agropal, 2017).

En las instalaciones las máquinas de ordeño deben ser limpiadas cuidadosamente luego de cada uso. Cuando el proceso de ordeño se termina, toda esta sucio y es visible por ello los residuos que quedan de leche deben ser limpiados o lavados de las superficies del ordeño y también los tubos flexibles que se usan deben ser cepillados y enjuagados con agua limpia para un próximo uso (Health, 2017).

En la tabla 3 se detalla los pasos para la limpieza del equipo y mangueras, según (Schuiling, 2018):

Tabla 3 *Limpieza de Equipo*

Paso	Temp. del agua	Duración (MIN)	Acción y comentarios
1.Pre lavado	35° a 45°C		Mueve los residuos de leche de la máquina; “precaliente”
2.Lavado (detergente alcalino)	Min. 50°C Max. 75°C	10	Ayuda a mover la grasa dependiendo de la calidad o dureza del agua.
3.Enjuague con agua			Opcional
4.Enjuague con ácido	35° a 45°C	5	Neutraliza los residuos alcalinos y previene los depósitos minerales, elimina las bacterias
5.Enjuague con agua			La temperatura tibia favorece al secado rápido
6.Sanidad			Antes de volver a usar el equipo, recomiendan aplicar una solución de hipoclorito para reducir el número de bacterias.

Adaptado de (Schuiling, 2018)

B Frecuencia de la limpieza

La frecuencia de la limpieza debe ser obligatoriamente después de cada ordeño, ya que es de gran importancia para mantener la calidad sanitaria de leche, existen procedimientos para llevar a cabo una adecuada limpieza en los sistemas de ordeño. Esto comprende de un procedimiento (por circulación del agua o limpieza con agua caliente), se tiene en cuenta el tiempo empleado y la cantidad que se consume de agua (Agropal, 2017).

El tiempo de lavado que se aplica varía entre 37 a 130 minutos por día y el consumo de agua va a ser un aproximado entre 284 a 495 litros. Teniendo en cuenta que se realiza hasta 2 limpiezas diarias para que la transferencia de microorganismos patógenos a través de las pezoneras y el quipo disminuya y se reduzca la contaminación bacteriana (Schuiling, 2018).

A continuación, se detalla en la tabla 4 un resumen de las características de limpieza, adaptado de (Schuiling, 2018):

Tabla 4 *Resumen de características más importantes*

SISTEMA DE ORDEÑO AUTOMÁTICO (v	1	2	3	4
LIMPIEZA DEL SISTEMA:				
Circulación (C)/ agua caliente(AC)	C	C	AC	C
Tiempo de lavado (min)	35	30	20	17
Consumo de agua (L)	75	70	90	70
Control de Temperatura (t) / concentración de detergente (d)	t	td	t	t
LIMPIEZA DE LA UNIDAD DE ORDEÑO:				
Tiempo de lavado (min)	10	1	9	10
Consumo de agua (L)	15	0.9	30	12
LIMPIEZA DE PEZONERAS:				
Tiempo de lavado (min)	0.25	1	0.4	0.5
Consumo de agua (L)	0.14	0.9	1	0.75
CONSUMOS DIARIOS ESTIMADOS:				
Tiempo (min)	130	93	83	76
Agua (L)	284	347	495	353

Adaptado de (Schuiling, 2018).

C Materiales de limpieza y desinfección

Los materiales que se utiliza para la limpieza son (FAO, 2016):

- esponja con fibras reutilizable para lavado

- jabón en crema para eliminar la grasa (lava de vajilla)
- cepillos de cerdas plásticas liviano y resistente
- cepillo de pezoneras
- papel absorbente desechable
- detergente alcalino (usado una vez por semana)
- detergente ácido (usado diariamente)
- baldes plásticos con medidor en litros
- envase plástico pequeño para medidor de detergente
- Solución a base de detergente para lavado de tina de enfriamiento (tipol)
- cepillos para lavar la tina

D Productos que se utiliza para la limpieza

Se debe utilizar el producto químico adecuado para las máquinas de ordeño para que el material que poseen las instalaciones en el sistema de ordeño no se dañen con el tiempo. Existen productos como los desinfectantes en este grupo específicamente los detergentes para el lavado y desinfección del sistema de ordeño. Estos van a tener instrucciones en sus envases para su correcto uso (Agropal, 2017).

E Volumen de agua para desinfección

Se debe asegurar un suministro suficiente de agua limpia, debe haber una muy buena cantidad de agua y ser de fácil acceso para utilizar en el proceso de ordeño y la limpieza del equipo, y se debe utilizar el volumen de agua de acuerdo a lo que se prepara el desinfectante como es el caso del detergente alcalino va a variar de acuerdo al tipo de dureza de agua va requerir la cantidad de litros, para que sea eficaz el efecto de desinfección (FAO, 2016).

F Temperatura de agua para la desinfección

La limpieza es una acción donde se remueve la suciedad y grasa con ayuda de detergentes ya sean alcalino o ácidos y agua caliente, para ello la temperatura del agua va a ser de un aproximado 75°C a 80°C. La desinfección es la acción de eliminar agentes microbiológicos o bacterias contaminantes que puedan dañar o alterar la calidad de la leche (Agrocalidad, 2012).

2.3.3 Agentes químicos de desinfección

2.3.3.1 Detergente alcalino

Este tipo de detergente se utiliza diariamente para la desinfección en el sistema de ordeño, ayuda a remover grasas y proteínas, es altamente concentrado y balanceado con tenso activos, secuestrantes y dispersantes que remueven rápidamente y efectivamente, mantienen los equipos totalmente limpios (Agrocalidad, 2012).

2.3.3.2 Detergente ácido

Este tipo de detergente remueve la piedra de leche y proteínas, evita la propagación de bacterias, su uso es una vez por semana y su formulación es secuestrante, tenso activos y complejantes que impide la formación de depósitos de minerales, también neutraliza los residuos de cloro y alcalinidad y equilibra el pH, favorece a la vida útil de las pezoneras y demás partes del equipo de ordeño (Agrocalidad, 2012).

2.4 INOCUIDAD

La inocuidad hace referencia a un control de peligros o factores que causen daño para preservar la calidad de los alimentos o productos y así prevenir la contaminación y las enfermedades que afecten la salud de los seres humanos; los alimentos insalubres o contaminados pueden ser por bacterias, virus y parásitos causando más de 200 enfermedades (OMS, 2020).

2.4.1 Bacterias aerobias mesófilas

Son bacterias heterótrofas, aerobias, capaces de crecer en un medio nutritivo o caldo de cultivo. Para la determinación, se realiza una siembra directa de las muestras en los diferentes medios de cultivo. La determinación de estas bacterias, depende de las condiciones de la temperatura de desarrollo y el tiempo de incubación (María José Bermejo, 2005).

2.4.2 Bacteria *Pseudomona spp*

La *Pseudomona aeruginosa* tiene mayor importancia en medicina veterinaria por ser la mayor causante de enfermedades, le sigue *Pseudomona fluorescens* (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.2.1 Características

Son bacilos gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, su tamaño es aproximadamente 0.6 por dos micras, comúnmente encontrada en el suelo, agua, superficies de plantas y en superficies de animales, crece en agar MacConckey (Gentilini, 2007).

La *Pseudomonas spp* se desarrolla favorablemente en los ambientes de humedad ya sean veterinarios o de humanos y también pueden encontrarse en el ambiente del sistema de ordeño ya sea en materiales como mangueras de los aparatos que se utilizan en la máquina de ordeño (Todar, 2012).

2.4.2.2 Patogénesis

La infección que se origina por bacterias del género *Pseudomonas* puede darse el crecimiento factible en lugares como suelo, agua almacenada, equipos médicos, equipos del presente del sistema de ordeño. La *Pseudomonas spp* es un microorganismo que ha creado resistencia a ciertos antibióticos, se la puede encontrar en la piel, mucosas y a nivel del tracto gastrointestinal (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

Se presenta esta bacteria en lugares como suelo, agua almacenada, intestino de mamíferos, equipos en general. La bacteria puede desarrollarse en colonias, posee pilis y enzima S que favorecen su adherencia. (Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, 2009).

2.4.2.3 Diagnóstico de laboratorio

A Cultivo in vitro

Esta bacteria puede aislarse de múltiples muestras con los medios de cultivo. El medio selectivo para este género de bacterias es el agar MacConkey y P (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

B Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica de laboratorio de reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) para identificar gérmenes microbiológicos (Elmer W. Koneman, Stephen Allen, 2008).

C Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH)

Esta técnica detecta la presencia de secuencias de ácidos nucleicos en células o tejidos empleando una sonda marcada de fluorocromo, la cual emite fluorescencia que se observa en el microscopio (Rodríguez & Suescún, 2013).

2.4.2.4 Identificación de *Pseudomona spp*

La identificación en el laboratorio es un proceso de siembra en el medio de cultivo durante 24-48 horas a una temperatura de 35°C, posterior a eso se realiza la identificación y se pueden observar las colonias grandes con brillo metálico distintivo color azul verdoso (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.3 Bacteria *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* es conocida como habitante saprófito del intestino (Parma, 2000).

2.4.3.1 Características

Es un bacilo recto que tiene características morfológicas y tintoriales estas son gramnegativo no exigente, sin esporas, es anaerobio facultativo (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.3.2 Patogénesis

La bacteria *E. coli* tiene una alta virulencia ya que tiene la presencia de fimbrias que actúan favoreciendo la adherencia de los antígenos O y K, puede llegar a causar generalmente infecciones intestinales graves y afectando la salud del hospedador (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.3.3 Diagnóstico de laboratorio

A Cultivo in vitro

El método diagnóstico para esta bacteria es el cultivo de preferencia el agar MacConkey o Eosin Methylene Blue Agar (E.M.B), cada microorganismo requiere ambiente de crecimiento, en este caso las bacterias se las siembra en una caja de Petri que contiene un medio de crecimiento (solución gelatinosa llamada agar) con nutrientes que la bacteria empezará su desarrollo. (Elmer W. Koneman, Stephen Allen, 2008).

B Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Esta técnica es molecular y permite la identificación por medio de ácido nucleico, es rápida y tiene alta sensibilidad, su costo es elevado (Nelson & Bradley, 2006).

2.4.3.4 Identificación de *Escherichia Coli*

Una vez sembradas las muestras en los medios selectivos agar EMB y agar MacConkey, se procede a realizar la confirmación con pruebas bioquímicas IMViC, (i) sigla de formación de indol, (M) prueba del rojo de metileno, (V) reacción de Voges y Proskauer, (C) utilización del citrato (Stanchi, 2007).

La *E. coli* se diferencia por prestar la prueba IMViC (Elmer W. Koneman, Stephen Allen, 2008):

- Producción de indol (positiva)
- Viraje del rojo metileno (positiva)
- Reacción de V y P (negativa)
- Utilización citrato (negativa).

2.4.4 Bacteria *Klebsiella spp*

Son bacterias móviles, Gram negativas, que tienen una cápsula de polisacáridos, anaerobias facultativas (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

2.4.4.1 Características

Son conocidos como el bacilo de friedlander, bastones cortos, gramnegativos, no esporulados, capsulados e inmóviles. Se desarrollan bien medios mejorados como en el medio agar Sangre y en medios especiales para enterobacterias como son agar MacConkey, agar Endo, agar EMB y agar Levine (Stanchi, 2007).

En cuanto a la colonización son grandes de tipo mucoide muy adherentes, y al ser tocadas con el ansa se extiende con facilidad, tiene una cápsula que rodea al soma bacteriano. A las colonias son denominadas ojo de pescado por poseer un centro oscuro con brillo metálico o rojo, rodeado de una zona periférica blanquecina (Gentilini, 2007).

2.4.4.2 Patogénesis

Las bacterias de este género están presentes en la naturaleza y en el tracto intestinal de los animales y del hombre. En medicina humana la bacteria puede dar origen a patologías como neumonías, meningitis, peritonitis, septicemia, infecciones urinarias. Si es el caso de neumonía se produce una destrucción tisular y origina extensas zonas de necrosis y hemorragias (Elmer W. Koneman, Stephen Allen, 2008).

2.4.4.3 Diagnóstico de laboratorio

A Cultivo in vitro

Se aplica el aislamiento en el medio de cultivo de las muestras obtenidas, las muestras pueden ser obtenidas del tracto respiratorio por esputo, sangre, orina, heridas contaminadas y también pueden ser aisladas a partir de plantas, suelo agua. Se toma la muestra se tiñe con tinción de Gram, se cultiva y se examina al microscopio (Stanchi, 2007).

2.4.4.4 Identificación de *Klebsiella spp*

Para este género la identificación debes con pruebas bioquímicas, la bacteria *Klebsiella spp* es inmóvil, fermentadora de lactosa y productora de ureasa. La prueba de indol sirve para diferenciar las principales especies (Elmer W. Koneman, Stephen Allen, 2008).

2.4.5 Bacteria *Bacillus spp*

Es una bacteria Gram positiva, encontrada en el suelo, aerobia y catalasa-positiva (Stanchi, 2007).

2.4.5.1 Características

Es un bacilo recto, grande de 1 a 3 um por 5 a 8 um con extremos truncados, Gram positivo y móvil, se los observa en pares rodeados por una cápsula. También esta bacteria es aerobia y anaerobia facultativa, se desarrollan y forman colonias grandes, elevadas, granulosas con bordes irregulares (Stanchi, 2007).

2.4.5.2 Patogénesis

Las bacterias de este género ingresan al hospedador a través de heridas, picaduras de insectos, por ingestión o por inhalación, una vez ya ubicados en los tejidos germinan y se multiplican, expresando los factores de virulencia en el hospedador; en los animales la infección se produce generalmente por la ingestión de las esporas (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.5.3 Diagnóstico de laboratorio

A Cultivo in vitro

Se aplica el aislamiento en el medio de cultivo del agar Sangre, las muestras pueden ser obtenidas de heridas y áreas contaminadas.

Se toma la muestra se tiñe con tinción de Gram, se cultiva y se examina al microscopio (Stanchi, 2007)

2.4.5.4 Identificación de *Bacillus spp*

Para la identificación de esta bacteria se extiende en agar sangre y se observa el desarrollo de bacilos Gram positivos capsulados, la ausencia de hemólisis en el agar sangre demuestra su presencia, así como también sus características y falta de movilidad (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.6 Bacteria *Streptococo uberis*

Son grupo de bacterias Gram positivos que crecen en cadenas o pares por ello su nombre (Stanchi, 2007).

2.4.6.1 Características

Son cocos de 0,5 a 2 um de diámetro, se agrupan en cadenas, no forman esporas, son inmóviles; su estructura es amorfa unidad por la pared celular; este

microorganismo es el responsable de producir mastitis bovina (Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D., 2013).

2.4.6.2 Patogénesis

Los microorganismos de este género son piógenos comúnmente asociados con la supuración y formaciones de abscesos por ellos patógenos oportunistas. Este microorganismo puede estar en las amígdalas, tracto gastrointestinal y genital de las vacas causando mastitis, también es encontrada en el medio ambiente (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

2.4.6.3 Diagnóstico de laboratorio

A Cultivo in vitro

Los microorganismos de este género tienen requerimientos físicos y químicos complejos para su desarrollo en el laboratorio, generalmente producen pequeñas colonias después de 48 horas de incubación el medio para su crecimiento es el agar sangre (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

2.4.6.4 Identificación de *Streptococo uberis*

Tiene características fenotípicas parecida a parauberis, la única diferencia para identificarla es por la capacidad de crecer a 10 ° C, presentan las características de cápsula de ácido hialurónico, proteínas M-like y R-like y adhesinas que les permite fijarse a las células epiteliales (Stanchi, 2007).

2.5 OTRAS BACTERIAS EN GENERAL

Otras bacterias que se pueden encontrar son los estafilococos, clostridium, listeria estas podemos hallarlas en los equipos, superficies o en el ambiente del sistema ordeño; pueden afectar a la salud de los seres humanos provocando enfermedades bacterianas (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

3 CAPITULO III METODOLOGÍA

3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Ubicación. La propiedad donde se realizó el estudio se localiza en la provincia de pichincha, cantón Quito, parroquia Nanegalito, a 5 kilómetros vía a Nanegal. Cuyas coordenadas son: En 0.083076, -78.663371 y coordenadas geográficas son: 0°04'59.1"N 78°39'48.1"W.

Condiciones Agroecológicas:

- El clima de Nanegalito está clasificado como subtropical, por lo general la temperatura media anual es de 18.3 °C (Ministerio del Ambiente y Agua, 2015).
- La precipitación generalmente es de 2071 mm al año, la lluvia es significativa la mayoría de los meses del año. La precipitación más baja es en agosto, con un promedio de 54mm. La mayor parte de la precipitación es en marzo, promediando 329mm (GAD-Parroquial de Nanegal Diagnóstico, 2015).
- La temperatura media es de 18.3 °C, abril parece ser el mes más caluroso del año, mientras Julio ser el mes más frío con temperatura promedio de 18.1 °C (Ministerio del Ambiente y Agua, 2015).
- La fuente de agua tiene procedencia de río, vertiente, acequia o canal con el 31.18% siendo usada en la mayoría de las haciendas o fincas de esta zona (GAD-Parroquial de Nanegal Diagnóstico, 2015).

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1 Muestras

Este estudio fue observacional permitió la identificación de la carga microbiológica de las superficies en el sistema de ordeño y tina de refrigeración de leche, por lo tanto, el número de animales en ordeño es un número dinámico, no obstante, hay un total de 70 animales, pero de los cuales 27 son las que están presentes para el ordeño. Se realiza un ordeño diario a base de máquina por sistema de ordeño a las 07:00 horas.

El sistema de ordeño es un sistema de 4 puestos con tanques de 40 litros de leche, de estos tanques se filtra y se lleva a una sola tina de refrigeración, por lo tanto, las muestras que equivalen al muestreo se obtuvieron de: pezoneras, mangueras, tanques de recolección, tanque de filtrado y tina de refrigeración.

De esto se tomaron un pool de muestras de cada una de las pezoneras de los puestos de ordeño, es decir en total 22 muestras pool del sistema de ordeño y tina de enfriamiento. Estas muestras fueron tomadas en dos fases al inicio de empezar el estudio, esto fue antes de realizar la corrección para ver el estado con el que se empieza el estudio y la segunda toma de muestras pool fueron al final del estudio cuando ya se aplicó la corrección de la dureza del agua y obviamente ajustando el protocolo de desinfección.

Este estudio se llevó a cabo mediante los análisis microbiológicos tomados a través de muestras de hisopados, para la parte de identificación de las bacterias fue a través de la utilización de: hisopo Quick Swab® como medios

de cultivo. Los procedimientos de siembra, conteo e identificación se realizaron en el laboratorio de Livexlab ubicado en la ciudad de Quito.

También se tomaron dos muestras de agua del tanque de reservorio, la primera fue en la fase de inicio para saber sobre la calidad del agua que es si el agua es dura y la segunda toma de muestra fue cuando ya se aplicó el tratamiento del agua. El tratamiento que se realizó al agua fue hervirla es decir que llegue a la temperatura de 91°C, para que el agua sea blanda.

Ambas muestras se llevaron a un análisis químico del agua para conocer la dureza total en el laboratorio Labanncy ubicado en la ciudad de Quito.

El presente estudio tuvo una duración de 1 mes y medio en ejecutarse la parte práctica, empezamos con la preparación de medios de cultivo o agares, entrenamiento para el ingreso práctico al laboratorio, la toma de muestras en la hacienda, transporte hacia el laboratorio; ya en el laboratorio se procedió a la incubación e interpretación de resultados). Ya con los datos obtenidos se analizó y se realizó la redacción teórica en la computadora sobre el estudio durante 2 meses.

3.3 MATERIALES

3.3.1 Materiales para toma de muestras y transporte

Los materiales que se utilizaron para la toma de muestras fueron:

- hisopo Quick Swab®, (este hisopo es específico para tomar muestras de las superficies por ello se utilizó para este estudio)

- pezoneras
- mangueras de leche
- tachos de recolección de leche
- tapas de los tarros
- tina
- guantes de examinación de látex
- mascarilla
- gorro o cofia
- mandil blanco
- botas de caucho
- gel refrigerante
- Cooler
- Termómetro digital de cocina
- agua (del lugar del almacenamiento)
- envases estériles
- Marcador indeleble

3.3.2 Materiales de laboratorio

- envases estériles como caja Petri
- medio de cultivo
- guantes estériles
- mandil
- mascarilla
- Asa de estriación
- hisopo
- mechero bunsen
- peptona estéril al 1%
- placas petrifil 3M® deshidratadas se observa en el anexo 5
- pipetas estériles

- difusor para contaje
- agar sangre de cordero
- agar Macconkey
- agar EMB
- tinción Gram
- cristal violeta
- yodo Gram
- alcohol acetona
- safranina
- bilis esculina
- rafinosa sorbitol
- cloruro de sodio al 6.5%.

3.3.3 Equipos de laboratorio

- Incubadora de Redline
- Cámara de flujo laminar HAIER
- Microscopio PILL

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Preparación de medios de cultivo y entrenamiento en el laboratorio

Se deben utilizar medios adecuados para la toma de muestras de las superficies que favorezcan la supervivencia del microorganismo o bacteria. Los medios de cultivo con hisopos son los más recomendables ya que tienen recipientes estériles y en nuestro caso utilizamos el hisopo para la toma de superficies llamado Quick Swab® que tiene su propio líquido que favorece para llevarlo

dentro de un cooler hacia el laboratorio (Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., 2005).

Todos los medios de cultivo para crecimiento de bacterias vienen con instrucciones de preparación para realizar el agar, sin embargo, en el laboratorio hay la guía para la preparación de los medios MacConkey, Sangre y EMB.

Todos los medios diluidos fueron realizados siguiendo una guía para su elaboración, se preparó y luego se cerraron, dejando un poco abierta la tapa rosca de la caja petri para favorecer al momento de someterlo al calor.

Durante el desarrollo del proceso se aplicaron las normas de seguridad del laboratorio que nos capacitaron, también se realizó el procedimiento de eliminación de desechos.

3.4.2 Toma y transporte de muestras

Lo que corresponde a la toma de muestras se realizó durante 4 semanas (en dos fases cada dos semanas), siguiendo todas con el mismo procedimiento. Tomado de: Manual de toma de muestras LIVEXLAB (2019) y sujeta a modificaciones de disponibilidad de materiales y costos.

1. Se hizo una ligera presión hacia un lado para vaciar el contenido líquido del hisopo Quick Swab® hasta que se moje por completo la torunda de algodón.
2. Se exprimió el exceso de líquido presionando contra la pared interior del tubo con un movimiento rotatorio circular.
3. Se introdujo el hisopo de Quick Swab® de 13cm en las superficies de pezoneras, mangueras, tanques, tapas y tina de enfriamiento y con

movimientos circulares se froto sobre las superficies, se lo dirigió hacia afuera, pasando por las paredes de las mismas en las zonas de estas superficies. En cada caso de subdivisión del sistema de ordeño, se realizó el hisopado en todas creando un pool de muestra, como se observa en el anexo 1.

4. Se regresó el hisopo Quick Swab® con la muestra obtenida al interior del tubo, y se tapó el tubo.
5. Se etiquetaron todas las muestras con las palabras y números de referencias correspondiente a cada espacio, utilizando el marcador de tinta indeleble o permanente.
6. Se posicionaron las muestras en el cooler manteniendo la cadena de frío, para que sean óptimas las muestras y lleguen al laboratorio en condiciones adecuadas de refrigeración.
7. Se realizaron en 2 fases la toma del muestreo para las superficies y tina de enfriamiento, ya que la primera fase correspondió a la toma de muestras de las superficies y tina de enfriamiento sin tratamiento de la dureza de agua, y la segunda fase se realizó con la aplicación del tratamiento de la dureza de agua.
8. Se llevó al laboratorio cumpliendo el tiempo de máximo 24 horas para la llegada al laboratorio, ya que esta condición fue relevante para la valoración de las muestras.

Lo que corresponde a los análisis de la dureza del agua se realizaron de la siguiente forma:

1. Se tomó las muestras de agua en la primera fase el agua normal y en la segunda fase el agua tratada.

2. Se abrió el envase estéril con mucho cuidado.
3. Se procedió a tomar la muestra de agua, la primera fase se tomó la muestra del reservorio de agua, la segunda fase se hizo la toma de muestra del agua tratada.
4. Para el agua con aplicación del tratamiento de dureza se hizo hervir el agua, con el termómetro digital de cocina se midió la temperatura que presentó 91°C; con el envase estéril se procedió a tomar la muestra de agua tratada.
5. Se llevaron al laboratorio Labanncy, para que se analice la dureza del agua, esto se hizo para las dos tomas de agua durante cada fase.

3.4.3 Procesamiento de muestras en el laboratorio

Tomado de: Clinical Veterinary Microbiology (2013) y sujeta a modificaciones de disponibilidad de materiales y costos.

1. Se procedió a encender el mechero de bunsen y a ordenar los materiales en la mesa de trabajo (medios de crecimiento, marcador indeleble, cinta adhesiva, esfero).
2. Se abrió y extrajo el hisopo Quick Swab® del cooler transportador manteniendo una distancia del mechero no mayor a 30 cm para evitar contaminación externa o del ambiente.
3. En la cámara de flujo laminar a cada hisopo se añadió con pipeta estéril 1 ml de agua peptonada al 1% por cada microorganismo y se mezcla por

inversión.

4. Se rotulan con nombre de cada subdivisión (pezoneras, mangueras, tapa del tanque, tanque y tina de enfriamiento) las placas 3M Petrifilm para el cultivo de mesófilas aerobios.
5. Se aplicó el contenido en la placa 3M® deshidratada con el difusor (permite medir el área por 20cm^2 , para contaje de bacterias), se levantó la lámina semitransparente superior y se deposita 1 ml de la muestra proveniente del hisopo en el centro, se baja con cuidado la lámina alzada para evitar que atrape burbujas de aire, esto se observa en el anexo 2.
6. Se realizó repeticiones del mismo procedimiento para cada muestra tomada en cada fase.
7. Una vez obtenida estas placas para contaje se llevaron a incubación con cara hacia arriba por 48 horas a temperatura de 35°C a 37°C , se observa en el anexo 3.
8. Luego de la incubación se procedió al contaje de las colonias de color rojo sin importar el tamaño o tonalidad que hayan crecido en la placa, se registra el valor y se multiplica por 2 que fue el factor puesto que inicialmente se añadió 1 ml de agua peptonada a la muestra contenida en el hisopo.

3.4.4 Identificación bacterias

1. Luego se procedió a la identificación de bacterias para ello se realizó la siembra en los agares Sangre, MacConkey y EMB, se observa en el anexo 4.
2. Se cogió la caja Petri que contenía el medio de cultivo (agar) para

abrirlo, teniendo una distancia cercana del mechero y se realizó una estría o línea de la muestra con un asa de estiramiento, para que las bacterias crezcan en el agar.

3. Se procedió a realizar la siembra en una esquina también llamada inóculo primario y luego se procedió a realizar la extensión con el asa en el medio utilizado.
4. Una vez realizada la siembra, se procede a cerrar la caja Petri que contiene el agar y se anotó con palabras y números para referencia de cada una de las muestras.
5. Ya con la cinta adhesiva se etiquetó con las especificaciones del laboratorio (nombre de cada muestra, fecha, hora).
6. El mismo procedimiento se repitió con cada muestra tomada.
7. Se procedió a colocar la caja Petri con los agares sembrados en la incubadora por 48 horas.
8. Se obtuvieron los agares con crecimiento de bacterias.
9. Con un asa se hizo un raspado del agar y se colocó en el portaobjetos y se cubrió con el cubre objetos.
10. Para el estreptococo se hizo tinción Gram para diferenciación e identificación morfológica.
11. Se observó en el laboratorio para identificar las bacterias morfológicamente de acuerdo a sus características específicas de cada bacteria.

3.4.5 Análisis Estadístico

Para este análisis se hizo una agrupación de datos, conteniendo información de la cantidad de las UFC e identificación de los resultados obtenidos, para esto se utilizó el programa "Excel", donde se aplicó el volumen %, para los análisis se utilizó las tablas y gráficos sobre la cantidad de UFC y figuras de barras, que se observaron en cada fase del estudio y también se realizó la identificación de bacteria encontrada durante el proceso. Todo esto fue por el propósito de averiguar si la hipótesis planteada en este estudio se acepta o se descarta.

4 CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados de la aplicación del tratamiento de agua para valorar la eficacia del detergente en el sistema de ordeño y tina de enfriamiento, que se realizó en la hacienda Cachillacta en Nanegalito, las muestras fueron obtenidas en los meses de agosto, septiembre, octubre del año 2019.

Este estudio se realizó con la metodología descrita y detallada en el capítulo anterior, siguiendo con un protocolo y proceso para la obtención del recuento de microorganismos e identificación de las bacterias. Los resultados y discusión del estudio microbiológico se presentan a continuación en base a los componentes recuento e identificación de microorganismos y también al tratamiento de la dureza del agua.

4.1 Resultados de la dureza total del agua

Se obtuvieron dos resultados de dureza total ya que fueron dos muestras.

En la primera muestra de dureza total se obtuvieron un resultado 79mg/L CaCO_3 otorgándole para ubicarse en la clasificación semi-dura, siguiendo la clasificación de la OMS.

En la segunda muestra de análisis de dureza total del agua fue la que se aplicó el tratamiento de agua que fue hervir el agua a 91°C, aquí se obtuvo el resultado de 58mg/L CaCO_3 , otorgándole para ubicarse en la clasificación blanda.

A continuación, se detalla en la tabla 5 los resultados obtenidos de la dureza total del agua:

Tabla 5 Resultados de la dureza total del agua

Fecha	# Muestra	Análisis de agua	Unidades	Resultado	Métodos laboratorio	(referencia/ laboratorio)	C	-
23/09/2019	1	dureza total	mg/L CaCO ₃	79 semi-dura	APHA PEE/ANNCY/50	2340	C	-
03/10/2019	2	dureza total	mg/L CaCO ₃	58 blanda	APHA PEE/ANNCY/50	2340	C	-

De acuerdo a lo estipulado por Gómez García (2019) menciona que la dureza es temporal, si existe la presencia de iones de carbonatos y bicarbonatos de calcio magnesio e hidróxidos, esta puede desaparecer cuando hay una precipitación o ebullición prolongada, esto se presencia al hervir el agua; según Muñoz (1999) la dureza puede ser encontrada en la mayoría de las aguas naturales por ello es necesario diferenciar que tipo de dureza presenta. Esto concuerda con nuestros resultados.

Según Chulluncuy Camacho (2011) el ablandamiento de la dureza de agua se la puede obtener a través de ebullición, ya que al someter a hervir el agua semi dura o con dureza temporal se puede tener como resultado agua blanda, ya que las parte de carbonatos de calcio al ser hervidas, se precipita el bicarbonato de calcio fuera de la solución, dejando el agua menos dura, lo que coincide este estudio con el tratamiento aplicado para ablandar el agua semi dura o dureza temporal.

4.2 Resultados del detergente alcalino

Todos los resultados obtenidos del detergente alcalino sin el tratamiento de la dureza del agua nos indican la presencia de bacterias *E. coli* y *Pseudomonas spp* en todas las aéreas muestreadas, y se observa un cambio en los resultados con el agua que recibió tratamiento de la dureza, existe una variación de cantidad de carga microbiológica es decir que bajo la cantidad de UFC, pero en el aérea de las pezoneras apareció un nuevo agente que es *Klebsiella spp*, y en las demás se mantuvo la *E. coli*, como lo podemos observar en la figura 1.

A continuación, tenemos en la tabla 6 para observar estos resultados y también el valor % que indica la variación de UFC entre agua con y sin tratamiento:

Tabla 6 Resultados del detergente alcalino sin y con el tratamiento de dureza del agua y valor %

DETERGENTE ALCALINO					
LUGAR (pool)	UFC Agua		UFC Agua		% ((vf- vi)/vi)x100
	Sin Tratamiento	Agente identificado	Con Tratamiento	Agente identificado	
Pezoneras	220	<i>E. coli y</i>	28	<i>Klebsiella</i>	-87,27
		<i>Pseudomona</i> <i>spp</i>		<i>spp</i>	
Tapa del tanque	180	<i>E. coli y</i>	20	<i>Escherichia</i>	-88,88
		<i>Pseudomona</i> <i>spp</i>		<i>coli</i>	
Manguera	440	<i>E. coli y</i>	280	<i>Escherichia</i>	-36,36
		<i>Pseudomona</i> <i>spp</i>		<i>coli</i>	
Tanque	320	<i>E. coli y</i>	280	<i>Escherichia</i>	-12,50
		<i>Pseudomona</i> <i>spp</i>		<i>coli</i>	

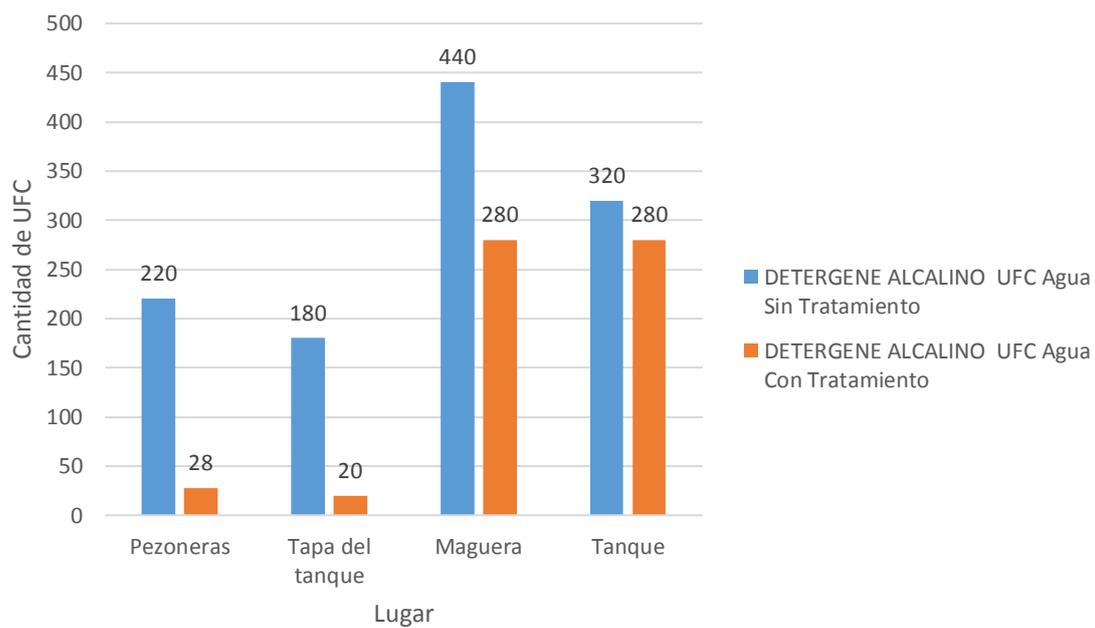


Figura 1 Detergente Alcalino en gráfico de barras

En las pezoneras que se desinfecto con el detergente alcalino y se aplicó el tratamiento de dureza del agua, hubo la disminución de cantidad UFC pero la aparición de la bacteria *Klebsiella spp*, según Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J., (2005) estas bacterias son gram negativas y su aparición fue por una contaminación cruzada externamente.

Según un estudio realizado de detección de riesgos de contaminación con microbios ambientales en un sistema de ordeño en Antioquia (2011) que público la revista Lasallista de Investigación coincide que la contaminación se dio por algún descuido motivo por el cual se da la presencia de bacterias en las pezoneras esto debió ser mientras se realizaba el proceso de lavado, secado y sellado de las pezoneras.

La tapa, la manguera y el tanque recolector mostraron que la cantidad bajaba de UFC con la aplicación del tratamiento de la dureza del agua pero que se mantenía la bacteria *E. coli*, como menciona Greene (2008), existe la presencia

de bacterias ya sean Gram positivas o Gram negativas en la mayor parte de ambientes, a esto se adiciona Markey (2013), comenta que los coliformes se los puede encontrar en el agua o superficies; con el crecimiento de estas colonias bacterianas se comprobó dicha información.

Según García Romana (2012), menciona que las actividades de limpieza y lavado que se realicen con agua caliente mejoran la eficacia de acción de los detergentes y desinfectantes, ya que la temperatura ayuda a que la dureza se precipite y por ello el agua se transforme a blanda si el agua tiene dureza temporal.

Por tal motivo este estudio si coincide con lo que menciona Greene (2008) sobre la existencia de las bacterias en los ambientes y de acuerdo a los resultados también se le atribuye a lo que dice Markey (2013) sobre la presencia de coliformes que están en el agua y en las superficies. Y finalmente García Romana (2012) comenta que la eficacia de los detergentes y desinfectantes es favorable si la calidad de agua es óptima.

4.3 Resultados del detergente ácido

Los siguientes resultados obtenidos del detergente ácido sin el tratamiento de la dureza del agua indicaron la presencia de bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomona spp*, y en se observa un cambio en los resultados con el agua que recibió tratamiento existe una variación de cantidad de carga microbiológica es decir que bajo la cantidad de UFC pero en las pezoneras apareció un nuevo agente que es *Bacillus spp* y en la manguera apareció *Streptococo uberis* y en las demás se mantuvo la *Escherichia coli*.

En el caso de la tina de enfriamiento solo hubo variación en los resultados de la cantidad de UFC pero en la identificación del agente se mantuvo la *Escherichia coli* en ambas tomas de muestra, como lo podemos observar en la figura 2.

Esto se evidencia en la tabla 7 para observar estos resultados y también el valor % que indica la variación de UFC entre agua con y sin tratamiento:

Tabla 7 Resultados del detergente ácido sin y con el tratamiento de dureza del agua y valor %

DETERGENTE ÁCIDO					
LUGAR (pool)	UFC Agua Sin Tratamiento		UFC Agua Con Tratamiento		% (vfvix1 vi)/vix1 00
	Agente Identificado	Agente Identificado	Agente Identificado	Agente Identificado	
Pezoneras	390	<i>E. coli</i> y <i>Pseudomona</i>	20	<i>Bacillus spp</i>	-94,87
Tapa del tanque	290	<i>E. coli</i> y <i>Pseudomona</i>	930	<i>Escherichia coli</i>	220,68
Manguera	960	<i>E. coli</i> y <i>Pseudomona</i>	300	<i>Streptococ o uberis</i>	-68,75
Tanque	2100	<i>E. coli</i> y <i>Pseudomona</i>	260	<i>Escherichia coli</i>	-87,61
Tina enfriamiento	417	<i>Escherichia coli</i>	256	<i>Escherichia coli</i>	-38,60

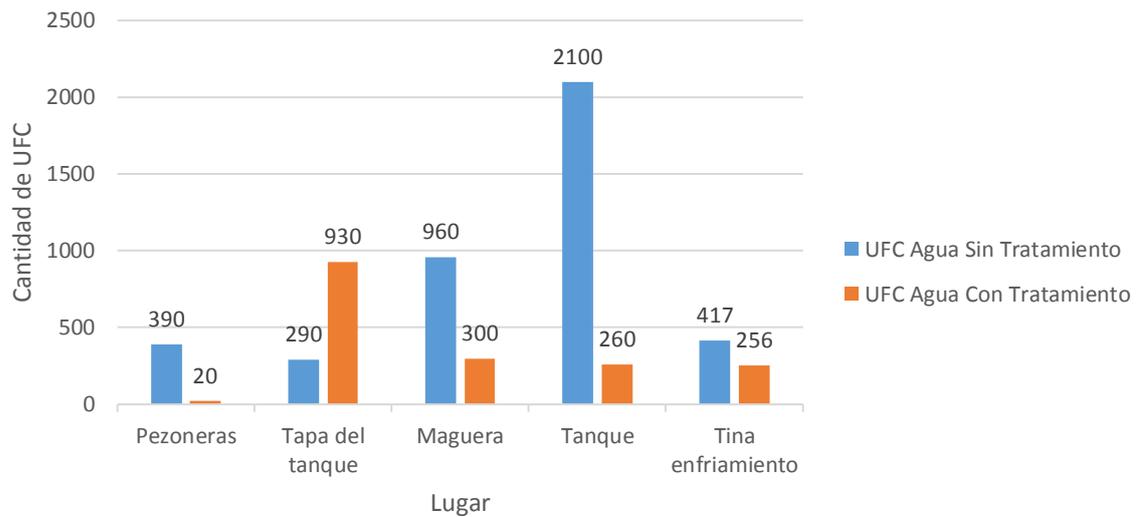


Figura 2 Detergente Ácido en gráfico de barras

De acuerdo a los resultados obtenidos se da la aparición de la bacteria *Bacillus spp* en las pezoneras, la cantidad de UFC baja con relación de agua sin tratamiento; pero la presencia positiva de *Bacillus spp* se confirma, según Stanchi (2007) los *Bacillus spp* crecen favorablemente en el agar sangre y se observa el desarrollo de bacilos Gram positivos capsulados, por ello se los identifica, y la contaminación pudo darse por otro factor.

Los resultados obtenidos de este estudio nos mostraron que la manguera con tratamiento de agua, presenta la presencia de *Streptococo uberis* y esto se confirma según Markey (2013), este microorganismo crece en colonias y su medio favorable de desarrollo es el agar sangre de cordero

Según Sussman (1997), las muestras que tienen la presencia de *E. coli* pudo darse por una contaminación ambiental, ya sea por las mismas heces de los animales, lo que sucede que en este estudio si presento bastantes veces la presencia de *E. coli*.

Según Málaga y Condemayta (2013), en un estudio que hizo sobre la contaminación bacteriana en superficies del sistema de ordeño obtuvo resultados evidentes y mantuvo estos resultados durante su estudio de *E. Coli* en las manos, utensilios, equipos, franelas; por lo cual corroboró que estos factores influyen mucho en la contaminación que se da durante el proceso de ordeño, le atribuyó a que esto se dio por el deficiente conocimiento del personal que participa en la actividad de ordeño, esto coincide con los resultados de este estudio.

Como menciona Forbes (2009) existen formas de contener cierto tipo de bacterias ya sea por el contacto con superficies contaminadas o incluso contacto directo hacia animales o personas. Por tal motivo se compara los resultados y existe la presencia de nuevos microorganismos como son *Bacillus spp* y *Streptococo uberis*. Razón por la cual a esto se adiciona un estudio similar realizado por Arias Saldaña (2018) en Lima, que el detergente ácido puede usarse sobre las superficies si los tiempos de contacto son cortos y debe existir la compatibilidad del agua, es decir que el agua sea blanda, ya que si existe dureza en el agua la eficacia del detergente baja.

Ríos Castillo (2013) hizo un estudio en Barcelona sobre evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes, donde confirmó que la supervivencia de los microorganismos es mayor en superficies de vidrio y plástico; también menciona que la bacteria *Eschericha coli* presenta la susceptibilidad a los desinfectantes de uso común, y que es importante considerar tiempo, cantidad de detergente o producto de limpieza, temperatura para el proceso de desinfección y limpieza. Esto concuerda con este estudio que también encontró la presencia de bacterias en las superficies del sistema de ordeño aun cuando ya se aplicó la desinfección.

A esto se le adiciona Salas Velázquez (2007), con un estudio realizado en Barcelona sobre evaluación de metodologías de control higiénico de superficies

alimentarias con el método de control de microorganismos, aquí mostró que no hay una limpieza y desinfección total ya que no hay homogeneidad ya que varios factores pueden influir sobre los resultados como son los factores ambientales, el material de la superficie, las propiedades de cada bacteria; por lo que afirma la existencia de la contaminación cruzada. Esto coincide con los resultados obtenidos ya que si se confirma la contaminación por otros vectores por ello la variabilidad de bacterias que se encontró.

5 CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Para concluir es un llamado a la producción lechera de las haciendas para verificar los protocolos de limpieza y desinfección, recalcando que deben analizar la dureza del agua que utilizan en las instalaciones del sistema de ordeño, ya que se comprobó que el efecto del detergente si varía con relación a la dureza del agua, el estudio mostró los resultados de 79mg/L CaCO₃ dureza temporal y con la aplicación del tratamiento de la dureza del agua se consiguió el resultado de 58mg/L CaCO₃ convirtiéndola en agua blanda, lo que favoreció y mejoró el proceso de limpieza y desinfección para bajar la cantidad bacteriana.

Se determinó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias de las superficies y la diferencia porcentual se puede decir que el tratamiento de la dureza del agua si fue efectivo, ya que tuvimos con el detergente alcalino una disminución de carga bacteriana en pezoneras 28 UFC, tapa del tanque 20 UFC, manguera 280 UFC y tanque 280 UFC; al igual se encontró baja cantidad de microorganismos con el detergente ácido en pezoneras 20 UFC, tapa del tanque 930 UFC, manguera 300, tanque 260 UFC y tina de enfriamiento 256 UFC.

Se identificó a las bacterias patógenas en las superficies antes del tratamiento y se encontró a las bacterias *Eschericha coli*, *Pseudomona spp* y *Klebsiella spp*, después con la aplicación del tratamiento de aguas duras y se halló a *Bacillus spp*, *Streptococo uberis* y *Eschericha coli*; las bacterias encontradas no son siempre son las mismas porque puede haber condiciones ambientales o actividades del desarrollo del personal que afecten y por ello existe la variación de tipos de bacterias en las diferentes superficies.

5.2 Recomendaciones

Se difunda a todas las personas que se dediquen a la producción lechera, se aplique el tratamiento de la dureza del agua y se haga más estudios en lo posterior.

Se recomienda realizar más estudios investigativos que profundicen sobre la eficacia de los detergentes alcalino y ácido con relación de la calidad de agua que se utiliza para desinfectar las diferentes aéreas.

Todo personal que esté relacionado con la producción lechera debe recibir capacitaciones en el tratamiento de la dureza del agua.

REFERENCIAS

- Agrocalidad. (2012). Manual de Aplicabilidad de buenas prácticas pecuarias de producción de leche. Recuperado el 03 de Noviembre de 2019
- Agropal. (2017). HIGIENE EN EL ORDEÑO Y CALIDAD DE LA LECHE. NUEVE NORMAS CLAVES". Recuperado el 1 de Noviembre de 2019, de <https://www.agronewscastillayleon.com/higiene-en-el-ordeno-y-calidad-de-la-leche-nueve-normas-claves>
- Aldabe y Aramendía . (2005). *Control de la calidad del agua procesos fisicoquimicos*. Barcelona - España: Editorial Reverté S.A.
- Alvarado, D. M. (2009). *Agua*. Costa Rica: Editorial Universal a Distancia .
- Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacterology* (Vol. 2). Estados Unidos: Springer: Michigan.
- Canet, J. J. (2016). Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I). *Betelgeux*. Recuperado el 28 de Octubre de 2019, de <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Castillo, A. G. (2013). Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo. *Departamento de Ciencia animal y alimentos* , 196.
- Chapelle, F. H. (2000). *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. Canada: United States Geological Survey.

Chiou, C. T. (2002). Partition and Adsorption of Organic Contaminants in Environmental Systems. *Jhon Wiley y Sons*.

Chulluncuy Camacho, N. C. (2011). *Tratamiento de agua para consumo humano*. Ingeniería Industrial .

Condemayta, J. M. (2013). Contaminación Bacteriológica en factores en el proceso de ordeño de leche Cip Chuquibambilla. *Revista Investigacion de Altoandin* , 7.

Elmer W. Koneman, Stephen Allen. (2008). *Diagnostico Microbiologico/ Microbiological*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

FAO. (2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/calidad-y-evaluacion/es/#.WAPKBfnhCO>

Forbes, B. A. (2009). *Diagnostico Microbiologico* . Virginia, Estados Unidos: Ed. Médica Panamericana.

GAD-Parroquial de Nanegal Diagnóstico. (2015). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial Parroquia Nanegal. Recuperado el 02 de Noviembre de 2019

Gentilini, E. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires, República de Argentina: Inter-Médica.

Gomez Garcia, L. F. (10 de Diciembre de 2019). *Indicadores de Calidad del agua*. Obtenido de 2009: http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41787961/INDICADORES_

- Health, A. M. (2017). Procedimiento de ordeño. *Agrovet Market Animal Health*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2019, de <https://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/procedimiento-de-ordeno>
- Ievgeniia Ostrov, A. H. (2016). Development of a Method to Determine the Effectiveness of Cleaning Agents in Removal of Biofilm Derived Spores in Milking System. *the journal Frontiers in Microbiology*, 7.
- Jones, G. (2019). Guidelines for installation, cleaning, and sanitizing of large parlor milking systems. *DAIRY-CATTLE*, 674-5.
- Jose, M. (1999). *"Aguas minerales del Ecuador y nociones de hidrología"*. Quito: Edición Corporacion Nacional.
- Josué Nicolás Ramón Estévez, Juan Esteban Restrepo Botero, Z. Tatiana Ruiz-Cortés, Martha Olivera Ángel. (2013). Detection of contamination risks with environment microorganisms in a mechanical milking system in the north of Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*, 7.
- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. España: Reverté Ediciones.
- María José Bermejo, M. F. (2005). En *Manuela del Auxiliar de laboratorio* (pág. 594). España : MAD, S. L. .
- Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinae, A y Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology* (Vol. Segunda Edición). Estados Unidos: S. Louis.
- Martin J. Green, . J. (2012). Dairy Herd Health. En . J. Martin J. Green, *Dairy Herd Health* (pág. 155). USA: Sarah Hulbert.

Martinez, F. O. (01 de Diciembre de 2019). *Scioteca "Banco de desarrollo de America Latina"*.

Obtenido de Análisis del sector agua potable y saneamiento:
<http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/388/14.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ministerio del Ambiente y Agua. (2015). Condiciones agroecológicas. Recuperado el 06 de

Noviembre de 2019, de <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/04/INFORME-RENDICION-DE-CUENTAS-PICHINCHA-2016.pdf>

Nelson, A., & Bradley, L. (2006). Enfoque en epidemiología de campo. *Focus on field epidemiology*, 8.

OMS, O. M. (10 de Febrero de 2020). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de

Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Parma, A. E. (2000). *Vet Microbiology*. Buenos Aires, República Argentina: Inter-Médica.

Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. (2009). Historical evolution and current status of the

taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet- Evol*, 1132-47. doi:doi:10.1016/j.meegid.2009.08.001.

Ramesh C. Chandan, . K. (2009). *Dairy Processing and Quality Assurance*. USA: Wiley-Blackwell.

Rodriguez , R., & Suescún, G. (2013). Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in

situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Revista Salud Uninorte*, 12.

Romana, A. G. (2012). *Seguridad e higiene en la manipulacion alimentaria (restaurantes, hoteles*

y otras colectividades). Madrid-España: Vision libros .

- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (Vol. Tercera Edición). D.F. México: Editorial Medica Panamericana.
- Saldaña, B. O. (2018). Evaluación de la concentración óptima de detergentes y desinfectante industrial, en el proceso de lavado y desinfección de envases de policarbonato para el embotellamiento de agua de consumo humano. Lima.
- Schuling, E. (2018). *Ganaderia*. Recuperado el 05 de Noviembre de 2019, de <https://docplayer.es/16452634-Limpieza-de-los-sistemas-de-ordeno-automatico.html>
- Simoes M., S. L. (2010). Una revisión de las estrategias de control actuales y emergentes. *LWT Food Sci. Technol*, 43 573–583.
- Stanchi, N. O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Sundberg M., C. A. (2011). Efectividad de limpieza de detergentes sin cloro para uso en granjas lecheras. *Frontiers in Microbiology*, 78 105–110.
- Sussman, M. (1997). *Virulence Microbiology*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Todar, K. (2012). Pseudomone characteristics. *The American Society for Microbiology educational*. Recuperado el 29 de Octubre de 2019, de <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- Velasquez, D. I. (19 de Diciembre de 2019). *Evaluacion de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias y adaptacion de la PCR en el tiempo real como metodo de control de patógenos*. Obtenido de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5708/disv1de1.pdf?sequence=1>
- Viloria, J. R. (2002). *Prontuario Básico de fluidos* . Madrid-España: Ediciones Parainfo, S.A. .

ANEXOS

Anexo 1 Toma de muestras



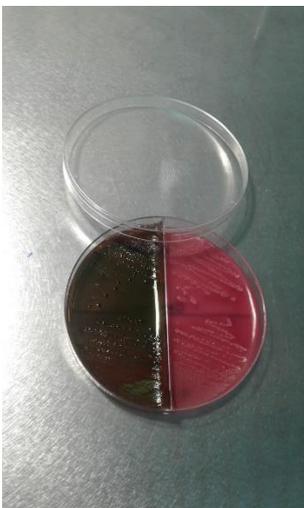
Anexo 2 Proceso de siembra en el laboratorio



Anexo 3 Incubadora con muestras sembrada



Anexo 4 Agares Sangre y Macconkey



Anexo 5 placas petrifil 3M® deshidratadas para contaje de UFC

