

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



**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD EN LA APLICACIÓN
DE TRES TRATAMIENTOS DE UN SISTEMA NO TÉRMICO
PARA LA REDUCCIÓN DE CARGA BACTERIANA
(ELECTROPORACIÓN) EN FORMA ARTESANAL, EN
LECHE FRESCA DE VACA DE DOS EXPLOTACIONES
LECHERAS FAMILIARES, UBICADAS EN EL MUNICIPIO
DE MIXCO**

RUDY JOSÉ LÓPEZ RODRÍGUEZ

Médico Veterinario

GUATEMALA, MARZO DE 2017

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



**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD EN LA APLICACIÓN DE TRES
TRATAMIENTOS DE UN SISTEMA NO TÉRMICO PARA LA
REDUCCIÓN DE CARGA BACTERIANA (ELECTROPORACIÓN) EN
FORMA ARTESANAL, EN LECHE FRESCA DE VACA DE DOS
EXPLOTACIONES LECHERAS FAMILIARES, UBICADAS EN EL
MUNICIPIO DE MIXCO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

RUDY JOSÉ LÓPEZ RODRÍGUEZ

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, MARZO DE 2017

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

DECANO: M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA: M.V. Blanca Josefina Zelaya Pineda
VOCAL I: M.Sc. Juan José Prem González
VOCAL II: Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel
VOCAL III: Lic. Zoot. Alex Rafael Salazar Melgar
VOCAL IV: Br. Brenda Lissette Chávez López
VOCAL V: Br. Javier Augusto Castro Vásquez

ASESORES

M.V. LUIS ALFONSO MORALES RODRÍGUEZ

M.A. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA

M.V. JULIA VIRGINIA BOLAÑOS DE CORZO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD EN LA APLICACIÓN DE TRES TRATAMIENTOS DE UN SISTEMA NO TÉRMICO PARA LA REDUCCIÓN DE CARGA BACTERIANA (ELECTROPORACIÓN) EN FORMA ARTESANAL, EN LECHE FRESCA DE VACA DE DOS EXPLOTACIONES LECHERAS FAMILIARES, UBICADAS EN EL MUNICIPIO DE MIXCO

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO A:

- A DIOS:** Porque de tal manera amo Dios al mundo que ha dado a su hijo unigénito para que todo aquel que en Él crea no se pierda más tenga vida eterna.
- A MI MAMÁ:** Amparito Rodríguez Molina, ¿mujer virtuosa, quien la hallará? Gracias mamita por nuestros 34 años, que increíble fue tenerte. Te amo.
- A MI PAPÁ:** Rudy Enrique López Aguilar, porque si alcanzó a ser en toda mi vida la mitad de lo que sos, me daría por afortunado. Te amo.
- A MI HERMANO:** Samuel Enrique López Rodríguez, Dios nos da regalos inesperados, todos los días me empujas a ser una mejor persona. Te amo.
- A MIS TIAS Y TIOS:** María Elena, Sheny, Tita, Violeta, Rolando, Jorge, Genaro, Héctor, Berito, Tony, Salvador y Omar. Gracias por su ejemplo y apoyo.
- A MIS PRIMOS Y PRIMAS:** Héctor Hugo, Tonito, Farid, Juan Pablo, Iris, Ángel, Diego y Renato.
- A VETERINARIA SAN CRISTÓBAL:** Ixmucané, Natalia, José Pablo, Ramón, Marzia, Gian Luca, Miguel, por su amor y amistad incondicional.

A MIS AMIGOS:

Flor de María, Gaby, Juan Pablo, Rolandito, Karlita, Manuel, Gaby, Valeria, Héctor (gato), Diego, Héctor (oso), Romeo (canchito), Lucky Arens, Andreita, Rosio, Nicole, Luz, Chechita, José (goofy), Pedro, Andrea, Luisa, Natalia, Margarita, Leslie, Chisco, Claudia Cerezo, Willsito Valdez, Karin, Carlitos, Airam, Marvin, Chema, Don Bene, Don Gere, Don George, Elías, Salomé, Webster, Miss Debbie, Walter Berny, Milvia Castañeda, Ingrid Lima, Bruno, Enano, Octavio, Emma y Braulio.

AGRADECIMIENTOS

- A:** La Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi casa de estudios.
- A:** La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme las puertas para alcanzar este logro.
- A:** Mis asesores Dra. Virginia de Corzo, Dr. Luis Morales, Dr. Jaime Méndez por su asesoría, revisión y corrección en la realización del presente trabajo. Pero ante todo por su valiosa amistad.
- A:** Mis profesores por haber compartido su conocimiento conmigo.
- A:** Todas las personas que participaron en la realización de este estudio, por su valiosa colaboración e información.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
-----------------------------	----------

II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
	3.1 Objetivo General.....	3
	3.2 Objetivos Específicos.....	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
	4.1 Leche de vaca.....	4
	4.1.1 Definición de leche.....	4
	4.1.2 Composición nutricional de la leche.....	5
	4.1.3 El agua.....	5
	4.1.4 Hidratos de carbono.....	6
	4.1.5 Proteínas.....	6
	4.1.5.1 La caseína.....	6
	4.1.6 Proteínas séricas.....	7
	4.1.6.1 La albúmina.....	7
	4.1.6.2 Las globulinas.....	7
	4.1.7 Componente graso.....	7
	4.1.8 Elementos minerales.....	8
	4.1.9 Vitaminas.....	9
	4.1.10 Enzimas.....	10
	4.1.11 Componentes que influencias la calidad de la leche.....	11
	4.1.11.1 Células en la leche.....	11
	4.1.11.2 Componentes indeseables en la leche.....	11
	4.2 Tecnologías emergentes en la conservación de alimentos.....	13
	4.3 Electroporación.....	14
	4.4 Factores que influyen en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje.....	17
	4.4.1 Condiciones de tratamiento.....	17
	4.4.1.1 Fuerza del campo eléctrico.....	17
	4.4.1.2 Forma de pulso.....	18
	4.4.1.3 Anchura del pulso.....	19

4.4.1.4	Energía del pulso.....	19
4.4.1.5	Frecuencia.....	19
4.4.1.6	Tiempo de tratamiento.....	20
4.4.1.7	Temperatura.....	20
4.4.2	Características de los microorganismos.....	21
4.4.2.1	Tipo de microorganismos.....	21
4.4.2.2	Tamaño celular.....	22
4.4.2.3	Fase de crecimiento celular.....	22
4.4.3	Características del medio de tratamiento.....	22
4.4.3.1	Conductividad eléctrica.....	23
4.4.3.2	pH.....	23
4.4.3.3	Actividad del agua.....	23
4.4.3.4	Composición del medio de tratamiento.....	23
4.4.3.5	Presencia de sustancias con actividad antimicrobiana.....	24
4.4.4	Inactivación de microorganismos.....	24
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1	Materiales.....	25
5.1.1	Recursos humanos.....	25
5.1.2	Recursos biológicos.....	25
5.1.3	Recursos de campo.....	25
5.1.4	Recursos de laboratorio.....	26
5.1.5	Centro de referencia.....	27
5.2	Metodología.....	27
5.2.1	Metodología del trabajo de campo.....	27
5.2.1.1	Ubicación de la toma de muestras.....	27
5.2.2	Metodología en Laboratorio de Salud Pública.....	28
5.2.3	Metodología en Laboratorio de Microbiología.....	29
5.3	Análisis estadístico.....	30
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31

VII.	CONCLUSIONES	37
VIII.	RECOMENDACIONES	38
IX.	RESUMEN	39
	SUMMARY	40
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
XI.	ANEXOS	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1

Control de temperatura en grados centígrados, de los tres
tratamientos aplicados.....33

Cuadro 2

Conteo de los UFC/ml en las muestras iniciales y después
de aplicar los tres tratamientos.....34

Cuadro 3

Síntesis de la disminución o aumento en porcentajes, por
muestra, respecto a las UFC/ml de la muestra inicial.....35

Cuadro 4

Control del análisis microbiológico de tres diferentes
tratamientos de electroporación aplicados en leche
cruda de vaca.....36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1

Control de la temperatura en grados centígrados de las muestras

iniciales y de las muestras después de haber aplicado los tres
tratamientos.....44

Figura 2

Conteo de UFC/ml de las muestras iniciales y después de haber
Aplicado los tres tratamientos.....44

Figura 3

Recipiente plástico hermético con tapadera y capacidad para
2 litros.....45

Figura 4

Cable #12.....45

Figura 5

Varillas de cobre calibre 10.....45

Figura 6

Espiga.....45

Figura 7

Interruptor de corriente.....45

Figura 8

Cinta de aislar.....45

Figura 9

Tapones de hule.....45

Figura 10

Diagrama de los tratamientos aplicados.....	49
---	----

I. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento de alto valor económico y nutricional, por lo que es de suma importancia que carezca en el mayor grado posible de bacterias, que son las causantes de mayor relevancia en la descomposición. Para reducir bacterias presentes en la leche se emplean actualmente productos químicos y procesos sometidos a altas temperaturas, los que disminuyen la carga bacteriana pero al mismo tiempo afectan las propiedades nutricionales.

Para mantener la composición física y química de la leche sin afectar sus componentes, se hace necesario el conocimiento de la aplicación de técnicas alternativas que conserven al máximo las características principales y disminuyan en un alto grado y mayor eficiencia la cantidad de bacterias.

El principio de acción de la electroporación consiste en que los campos pulsados (serie de impulsos eléctricos aplicados) pueden inactivar microorganismos, esto se da cuando se sobrepasa cierto umbral de intensidad del campo eléctrico externo que lleva a una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana celular conocido como potencial transmembrana. Cuando el mismo alcanza un valor crítico, tiene lugar la electroporación o formación de poros en la membrana celular. La permeabilidad de la membrana celular aumenta, esto es reversible si la fuerza del campo eléctrico externo es igual o excede ligeramente a un valor crítico.

El desarrollo de esta tecnología como alternativa al tratamiento térmico clásico es prometedor, debido a que el alimento conserva, en mayor medida, sus características físicas, químicas y nutricionales.

II. HIPÓTESIS

El sistema de electroporación artesanal con 110 voltios, en tres diferentes tratamientos, es capaz de reducir 50% del total de bacterias presentes en un litro de leche fresca de vaca.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Aportar información sobre una técnica alternativa para la reducción de la carga bacteriana en leche fresca de vaca (electroporación).

3.2 Objetivos Específicos

- Comprobar que la aplicación de corriente eléctrica de 110 voltios, funciona como una técnica alternativa en la disminución de la carga bacteriana en leche fresca de vaca.
- Comparar la efectividad de tres tratamientos de electroporación sobre la carga bacteriana de las muestras de leche fresca de vaca.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Leche de vaca

La leche de vaca es un alimento de primera necesidad. De gran demanda por su alto valor nutricional que se refleja en sus componentes, es considerada un alimento básico en la dieta de toda la población. (1)

Los mamíferos dependen fundamentalmente de la leche en sus primeros periodos de vida y el hombre la ha aprovechado para su alimentación, empleándola directamente y transformándola para la obtención de productos como el queso, yogurt y mantequilla, entre otros. Su industrialización se ha desarrollado en todas las latitudes, permitiendo que cada día se obtenga una cantidad mayor de productos que son ideales para la nutrición humana. (1)

La leche por ser un alimento muy completo, es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, los que, si no son eliminados, pueden convertirse en un riesgo para los consumidores. Así mismo la leche puede ser un vehículo de enfermedades que pueden afectar a los consumidores, si no se realizan los controles de calidad necesarios en los procesos de la industrialización que parten en la granja y culminan en el consumidor final. (1)

4.1.1 Definición de leche

La definición física, señala que la leche es un líquido de color blanco opalescente característico. (1)

Desde el punto de vista dietético la leche es el alimento puro más próximo a la perfección. Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y como fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye

significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina). Por otra parte, los lípidos y la lactosa constituyen un importante aporte energético. (8)

Químicamente, la leche es uno de los fluidos más completos que existen. El término “sólidos totales” se usa ampliamente para indicar todos los componentes con exclusión del agua y el de “sólidos no grasos” cuando se excluye el agua y la grasa. El agua representa aproximadamente un 82% de la leche, los sólidos totales alcanzan habitualmente la cifra de 12% hasta un 13% y los sólidos no grasos casi siempre están muy próximos al 9%.(8)

4.1.2 Composición nutricional de la leche

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas como: agua, grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuáles se les denomina extracto seco o sólidos totales. Los sólidos totales varían por múltiples factores como lo son: la raza, el tipo de alimentación, el medio ambiente y el estado sanitario de la vaca entre otros. (8)

4.1.3 El agua

El valor nutricional de la leche como un todo es mayor que el valor individual de los nutrientes que la componen debido a su balance nutricional único. La cantidad de agua en la leche refleja ese balance. En todos los animales, el agua es el nutriente requerido en mayor cantidad y la leche suministra una gran cantidad de agua, conteniendo aproximadamente 90% de la misma. La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua que va en la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria. La producción de leche es afectada rápidamente por una disminución de agua y cae el mismo día que su suministro es

limitado o no se encuentra disponible. Esta es una de las razones por las que la vaca debe de tener libre acceso a una fuente de agua abundante todo el tiempo. (8)

4.1.4 Hidratos de carbono

El principal hidrato de carbono en la leche es la lactosa. A pesar de que es un azúcar, la lactosa no se percibe por el sabor dulce. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante y promedia alrededor de 5% (4.8%-5.2%). A diferencia de la concentración de grasa en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras y no puede alterarse fácilmente con prácticas de alimentación. Las moléculas de las que la lactosa se encuentra constituida se encuentran en una concentración mucho menor en la leche: glucosa (14 mg/100 g) y galactosa (12 mg/ 100 g). No todos los productos lácteos poseen proporciones similares de lactosa. La fermentación de lactosa durante el procesado baja su concentración en muchos productos, especialmente en los yogures y quesos. (8)

4.1.5 Proteínas

La proteína contenida en la leche es del 3.5% (variando desde el 2.9% al 3.9%). Está “proteína láctea” es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares distintos.

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). (8)

4.1.5.1 La caseína

Es la proteína más abundante, además de ser la más característica de la

leche por no encontrarse en otros alimentos, existen tres tipos de caseínas (α , β y Kapa caseína), en la leche también se encuentra la albúmina y la globulina. El valor biológico de la caseína en la alimentación obedece a su contenido en aminoácidos esenciales. (8)

4.1.6 Proteínas séricas

4.1.6.1 La albúmina

Es la proteína de la leche, que sigue en cantidad a la caseína, con una cifra aproximada de 0.5%. Mientras que la caseína es relativamente estable a la acción del calor, las albúminas se desnaturalizan con facilidad al calentarlas. Por esta razón durante el proceso de calentamiento a altas temperaturas se destruye gran parte de la proteína sérica. (8)

4.1.6.2 Las globulinas

Son proteínas de alto peso molecular que se encuentran preformadas en la sangre. También es posible que parte se produzca en las células del parénquima mamario. (8)

4.1.7 Componente graso

Normalmente, la grasa (o lípido) constituye desde el 3,5 hasta el 6,0% de la leche, variando entre razas de vacas y con las prácticas de alimentación. Una ración demasiado rica en concentrados que no estimula la rumia en la vaca, puede resultar en una caída en el porcentaje de grasa (2,0 a 2,5%). La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre

que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión. La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en la forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos. Las proporciones de ácidos grasos de diferente largo determina el punto de fusión de la grasa y por lo tanto la consistencia a la mantequilla que deriva de ella. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta (cadenas de menos de ocho átomos de carbono) producidos de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación rumial. Esta es una característica única de la grasa de la leche comparada con otras clases de grasas animales y vegetales. Los ácidos grasos de cadena larga en la leche son principalmente los insaturados (deficientes en hidrógeno), siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), y los polisaturados linoleico y linolénico. (8)

4.1.8 Elementos minerales

La leche de vaca contiene sodio, potasio, magnesio, hierro, cobalto, cobre, fósforo, fluoruros, yoduros. Además, se reconoce la presencia de otros en cantidades vestigiales, como el aluminio, molibdeno y plata. En la membrana de los glóbulos grasos se encuentran en mayor concentración el calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo y zinc. Una parte de los metales, sobre todo los alcalinos y los halógenos, se encuentran libres en forma de iones en solución. El calcio, por el contrario, se halla en su mayor parte ligado a la caseína. Tan solo un tercio del calcio y del magnesio se encuentra en disociación iónica. Además de los cloruros y fosfatos, deben mencionarse también los citratos, presentes en una cuantía media de 2.3 gr/Lt. (1)

Durante la lactancia descienden primero los contenidos de calcio y fósforo, para al final volver a aumentar ligeramente. Asimismo disminuye la tasa de potasio, mientras que la de sodio muestra desde el principio tendencia a aumentar. El contenido de calcio se ve influido por la época del año. La tasa de

magnesio permanece prácticamente invariable. Reviste especial interés la cantidad de cobalto ya que este elemento es imprescindible para la síntesis de vitamina B12, tan importante para los animales como para el hombre. (8)

El cobre por su parte experimenta notables oscilaciones (entre 0 y 80 mg/L), la concentración de este mineral se halla disminuida en la leche de vacas que pastaron en llanuras ácidas. La leche de épocas secas es más pobre en cobre, que la de la época lluviosa. Las alteraciones secretoras, las enfermedades del metabolismo y otros estados patológicos originan en su mayoría notables cambios en la concentración de los elementos minerales. Como primer signo de un trastorno secretor es particularmente frecuente que descienda la tasa de calcio, haciendo que la leche pierda sus propiedades de coagulación. (8)

4.1.9 Vitaminas

La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, su concentración está sujeta a grandes oscilaciones. El calostro posee una extraordinaria riqueza vitamínica, contiene de 5 a 7 veces más vitamina C y de 3 a 5 veces más vitaminas B2, D y E que la leche normal. También influye la época del año, tiempo atmosférico, ambiente y la alimentación; este último factor repercute especialmente en los carotenos y en la vitamina A como consecuencia de la abundante ingestión de carótenos cuando la base de la alimentación son forrajes frescos. (8)

La vitamina E por su parte es 10% más abundante en épocas en que el ganado tienen acceso a forrajes más toscos, lo cual posiblemente dependa del mayor contenido graso de la leche en verano. Por lo general, la concentración de las vitaminas hidrosolubles se conserva constantemente. En la vitamina C se observan cambios dependiendo de la alimentación. Son variadas las influencias de la manipulación de la leche sobre su contenido vitamínico ya que en el simple

almacenamiento se producen pérdidas de vitaminas, dependientes de la temperatura y de las radiaciones lumínicas. (8)

4.1.10 Enzimas

Las enzimas contenidas en la leche se aprovechan para efectos de inspección y control, ya que muchas de ellas influyen en la calidad de la leche y en el origen de distintas alteraciones. Las enzimas de la leche carecen de valor desde el punto de vista alimenticio, sobre todo para los organismos ya desarrollados.

Las enzimas lácteas tienen dos orígenes: las corporales y las enzimáticas. Las primeras llegan directamente a la leche en la que se encuentran en forma libre procedente de la sangre, o bien de las células corporales. Pero también pueden llegar a la leche con las células. En ambos casos se trata de enzimas originadas en el organismo. Las segundas se originan en la leche misma, producto de la acción de los gérmenes. (1)

Existen dos grupos de enzimas: las hidrolasas cuyo mecanismo de acción se caracteriza por un desdoblamiento hidrolítico, a este grupo pertenecen entre otras, las esterasas, lipasas, carbohidratasas y proteasas. Entre las esterasas es importante la lipasa que actúa cuando la leche es depositada sin refrigeración, dándole un sabor rancio. (1)

El otro grupo importante son las oxido-reductasas, las más importantes son la catalasa y la peroxídasa que sirven como indicadores de la calidad microbiológica de la leche. (8)

4.1.11 Componentes que influncian la calidad de la leche

4.1.11.1 Células en la leche

Las células somáticas en la leche no afectan la calidad nutricional en sí. Ellas son solamente importantes como indicadores de otros procesos que pueden estar sucediendo en el tejido mamario, incluyendo inflamación. Cuando las células se encuentran presentes en cantidades mayores de medio millón por mililitro, existe una razón para sospechar de mastitis (8)

4.1.11.2 Componentes indeseables en la leche

La leche y sus subproductos son alimentos perecederos. Altos estándares de calidad a lo largo de todo el procesado de la leche son necesarios para alcanzar o mantener la confianza del consumidor, y para hacer que ellos decidan comprar productos lácteos. La leche que deja la finca debe de ser de la más alta calidad nutricional-inalterada y sin contaminar.

Está es una lista parcial de las substancias indeseables más comunes que se encuentran en la leche:

- Agua adicional;
- Detergentes y desinfectantes;
- Antibióticos;
- Pesticidas o insecticidas;
- Bacterias.

La vigilancia de los productores en seguir las instrucciones en el uso de productos químicos, como también un buen ordeño, limpieza y almacenamiento de

los productos no son solo esenciales para su éxito propio pero también para el éxito de la industria lechera en general. (8)

La leche contiene pocas bacterias al extraerla de la ubre de una vaca sana, sin embargo, durante el ordeño, la leche se puede contaminar a partir del animal, especialmente de las zonas externas de la ubre y áreas próximas, del medio ambiente, desde el estiércol y el suelo, así como del lecho en el que descansan los animales, y a través del polvo, aire, agua e insectos (particularmente moscas). Probablemente las dos fuentes de contaminación más significativas sean el equipo y utensilios utilizados para su obtención y recolección, así como las superficies que entran en contacto con la leche, incluidas las manos de los ordeñadores y demás personal.

El número de microorganismos presentes en la leche varía de cuarto a cuarto y de vaca a vaca, dependiendo de los sistemas de limpieza y desinfección utilizados; cuando es obtenida en condiciones asépticas, oscila entre 100 y 1000 UFC/mL. En la práctica, la leche recién obtenida contiene de 1000 a 10000 UFC/mL, constituidos por contaminantes procedentes del entorno de la ubre, el equipo de ordeño y los manipuladores. (10)

Los grupos de bacterias presentes en la leche pueden dividirse en:

- Bacterias acidolácticas: El grupo incluye bacilos y cocos, que pueden formar cadenas de longitud variable pero que nunca dan lugar a esporas. Las bacterias acidolácticas son anaerobias facultativas, la mayor parte de ellas mueren por calentamiento a 70°C.
- Bacterias coliformes: Son anaerobias facultativas con una temperatura óptima de 30-37°C. Se encuentran en los intestinos, estiércol, suelo, aguas contaminadas y en plantas.

- Bacterias de ácido butírico: Se encuentran en suelos, plantas, estiércol, piensos y ensilados almacenados en condiciones defectuosas, son del tipo anaerobio, forman esporas y tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37°C.
- Bacterias formadoras de ácido propiónico: No forman esporas, su temperatura óptima es de alrededor de 30°C.
- Bacterias de la putrefacción: Comprende un gran número de especies, tanto cocos como bacilos, que crecen tanto aeróbica como anaeróbicamente. Contaminan la leche, procedentes del estiércol, piensos y agua. (11)

4.2 Tecnologías emergentes en la conservación de alimentos

Los métodos no térmicos de conservación de alimentos están bajo investigación evaluando su potencial como un proceso alternativo o complementario a los métodos tradicionales de conservación de alimentos. Tradicionalmente la mayoría de los alimentos conservados son procesados térmicamente sometiendo al alimento a temperaturas elevadas, durante este tiempo de tratamiento se transmite gran energía al alimento, la misma puede provocar reacciones indeseables, como la formación de subproductos. Durante el procesado no térmico, la temperatura del alimento se mantiene por debajo de la temperatura que normalmente se utiliza en el procesado térmico y se espera que durante el procesado no térmico las vitaminas, nutrientes esenciales y aromas no experimenten cambios o que los mismos sean mínimos, estos procedimientos emplean menos energía que los térmicos. Técnicas que se emplean son la alta presión hidrostática, campos magnéticos oscilantes, campos de alta intensidad de pulsos eléctricos, pulsos lumínicos intensos, irradiación, aditivos químicos – bioquímicos y tecnología de barreras. (5)

4.3 Electroporación

La inactivación de microorganismos con ayuda de pulsos eléctricos de alta intensidad fue demostrada en 1960 por Doevenspeck. Durante el procesamiento de líquidos, el alimento se expone durante microsegundos a un pulso de alta intensidad de campo eléctrico, esta exposición de la célula microbiana induce la formación de poros en la membrana celular. Este fenómeno físico es conocido como electroporación, la cual puede ser reversible o irreversible de acuerdo a la intensidad del campo eléctrico aplicado. La electroporación ocasiona cambios en las funciones de la membrana celular así como rompimiento de la célula microbiana por lo que se inactiva el microorganismo. (5)

Desde hace décadas se han estudiado diversas tecnologías para la conservación de alimentos, buscando siempre un fin común: la seguridad alimentaria y la conservación de las propiedades organolépticas de los mismos. Una alternativa es el uso de electricidad, con la que se han realizado estudios que permitieron incorporarla como una de estas tecnologías. Algunos estudios señalan que el uso de pulsos eléctricos podía higienizar alimentos líquidos como la leche sin afectar en gran medida su sabor y propiedades. Actualmente, los pulsos eléctricos son considerados como una tecnología emergente, el tratamiento se realiza colocando alimentos líquidos, semisólidos o sólidos en una solución electrolítica y con baja conductividad térmica entre dos electrodos, mediante los cuales se hace pasar una corriente eléctrica con determinados tiempo (generalmente microsegundos μs), intensidad y frecuencia. El tratamiento térmico es altamente efectivo en productos alimenticios para lograr una mejor estabilización, inactivación de enzimas y destrucción de microorganismos pero que muchas veces resulta en pérdidas de los nutrientes esenciales y cambios en sus propiedades organolépticas; por esto, el tratamiento de pulsos eléctricos ha incrementado su popularidad pues provee una alternativa a los cambios indeseables generados por la pasteurización. (5)

Morfológicamente, todas las bacterias y las células de los hongos comparten una estructura común compuesta por una membrana delgada de fosfolípidos cuya función es encapsular organelos celulares y otras estructuras suspendidas en el citoplasma. Estas membranas son complejas estructuras heterogéneas que separan el citoplasma del medio extracelular. La integridad de la membrana y su función de barrera es fundamental para la viabilidad celular. Si un campo eléctrico de suficiente intensidad y duración se aplica a una célula viva, la integridad de la membrana puede ser gravemente perturbada, causando perforación mecánica, la lisis y la muerte. Este proceso se conoce como la electroporación. Por lo tanto, la electroporación puede ser utilizada como un medio para matar a los organismos microbianos. (7)

La permeabilización de las membranas celulares mediante la aplicación de campos eléctricos de alto voltaje es un hecho bien conocido. Sin embargo, no se conoce con precisión cuál es el mecanismo último por el cual los campos eléctricos de alto voltaje provocan la aparición de poros en las membranas celulares. De todas las teorías que se han propuesto, la más aceptada es la de Zimmerman. Según esta teoría, la membrana celular se compara con un condensador en cuyo interior existe un material con una constante dieléctrica baja, en relación con la constante dieléctrica del interior de las células y la del medio en el que se encuentran suspendidas. En estas condiciones se produce un acumulo de cargas a ambos lados de la superficie de la membrana celular que genera una diferencia de potencial, denominado potencial transmembrana, de alrededor de 10 mV. Al aplicar un campo eléctrico externo, el número de cargas a ambos lados de la membrana aumenta y, por lo tanto, también aumenta el potencial transmembrana. (2)

El incremento de las cargas de diferente signo a ambos lados de la membrana provoca que estas se atraigan entre sí con lo que la membrana se comprimiría. Cuando el campo eléctrico aplicado genera un potencial

transmembrana de alrededor de 1 V la compresión de la membrana provoca la formación de poros. El número y tamaño de los poros formados depende de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo del tratamiento. Al valor umbral del campo eléctrico en que comienza a permeabilizarse la membrana se le denomina campo eléctrico crítico. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza valores próximos al del campo eléctrico crítico o el tiempo del tratamiento es muy corto, el número y tamaño de los poros formados es muy pequeño. (2)

En estas condiciones, la permeabilización de la membrana es reversible de modo que, cuando cesa el campo eléctrico, la membrana celular vuelve a su estado normal. Cuando se aplican campos eléctricos más intensos o tiempos de tratamientos más largos, aumenta el número y tamaño de los poros, lo que provoca una permeabilización irreversible de la membrana o incluso su ruptura mecánica. (2)

La aplicación de un campo eléctrico externo provoca la permeabilización de la membrana tanto en su fracción proteica como lipídica. Debido a que la apertura de los canales proteicos de las membranas depende del potencial transmembrana, el potencial transmembrana generado por un campo eléctrico externo provoca la apertura de los mismos. Una vez abiertos, el calentamiento provocado por el paso de la corriente eléctrica puede producir la desnaturalización de sus proteínas. Por lo que respecta a la fracción lipídica, el campo eléctrico externo provoca la reorientación de los lípidos de la membrana dando lugar a la formación de poros hidrofílicos. Además, el paso de corriente eléctrica a través de los poros existentes en condiciones normales en la fracción lipídica, puede incrementar la temperatura y modificar la fluidez de los lípidos de la membrana. El incremento en la permeabilidad de la membrana provoca un desequilibrio osmótico de la célula que da lugar a una entrada de agua y de solutos de pequeño tamaño. Como consecuencia, se incrementaría el tamaño celular hasta producirse la ruptura de la membrana. La membrana celular de los microorganismos es una

estructura que protege el contenido citoplasmático y que actúa como una barrera semipermeable regulando el paso de sustancias entre el interior y el exterior de la célula. La permeabilización de esta membrana por los pulsos eléctricos de alto voltaje se ha puesto de manifiesto por la entrada al interior citoplasmático de diversas sustancias que, en condiciones normales, no son capaces de atravesarla y por la salida de componentes del interior celular, como ATP y ácidos nucleicos, al medio en el que se encuentran suspendidos los microorganismos. También se ha observado que estos tratamientos alteran algunas funciones de la membrana citoplasmática como su capacidad para mantener el pH citoplasmático o para experimentar plasmólisis en un medio hipertónico. (2)

4.4 Factores que influyen en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje

Los factores que influyen sobre la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje se pueden clasificar en tres grupos: Factores dependientes de las condiciones de tratamiento, factores dependientes de las características de los microorganismos y factores dependientes de las características del medio de tratamiento. (2)

4.4.1 Condiciones de tratamiento

Los parámetros que definen un tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje son: fuerza del campo eléctrico, forma del pulso, anchura del pulso, energía del pulso, frecuencia, tiempo de tratamiento y temperatura. (2)

4.4.1.1 Fuerza del campo eléctrico

La fuerza del campo eléctrico es uno de los principales parámetros que determina la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Hay que

considerar tanto la intensidad del campo eléctrico como su distribución en la cámara de tratamiento.

Por encima de una fuerza de campo eléctrico umbral, denominada campo eléctrico crítico, la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje aumenta al aumentar la intensidad del campo eléctrico. Este campo eléctrico crítico depende del microorganismo y del medio en el que se encuentre suspendido y suele estar comprendido entre 6-13 kV/cm. Por encima del campo eléctrico crítico y para un tiempo de tratamiento constante se considera que la inactivación microbiana aumenta exponencialmente al aumentar la fuerza del campo eléctrico aplicado.

Es muy importante que el campo eléctrico esté distribuido homogéneamente en la cámara de tratamiento. Una mala distribución del mismo puede favorecer la existencia de zonas donde los microorganismos no reciban el tratamiento deseado. (2)

4.4.1.2 Forma de pulso

Los equipos de pulsos eléctricos de alto voltaje aplican, fundamentalmente, dos tipos de pulsos: pulsos de caída exponencial y pulsos de onda cuadrada. Cuando se compara la inactivación obtenida mediante pulsos de la misma energía e intensidad de campo eléctrico, los pulsos de onda cuadrada son ligeramente más eficaces que los pulsos de caída exponencial. La menor eficacia de los pulsos de caída exponencial se cree que es debida a que, en una parte de su duración, el campo eléctrico aplicado está por debajo del campo eléctrico crítico del microorganismo. (2)

También, se ha observado que los pulsos eléctricos de caída exponencial bipolares son más letales que los pulsos monopolares. Esta mayor eficacia se ha

atribuido a que la variación de la polaridad del campo eléctrico entre dos pulsos consecutivos cambia la posición de los grupos cargados de la membrana celular haciéndola más susceptible a su ruptura mecánica. (2)

4.4.1.3 Anchura del pulso

Algunos autores han observado, tanto con pulsos de caída exponencial como con pulsos de onda cuadrada, que el efecto inactivante de un tratamiento de una determinada fuerza de campo eléctrico y duración no depende de la anchura del pulso con el que se aplique el mismo. Por el contrario, se han obtenido mayores niveles de inactivación sobre *Listeria innocua* al aumentar la anchura de los pulsos desde 2 hasta 3.9 μ s. (2)

4.4.1.4 Energía del pulso

La energía eléctrica necesaria para aplicar un pulso eléctrico de alto voltaje de una forma determinada en un medio de tratamiento depende de su anchura y voltaje. Desde un punto de vista práctico, es interesante establecer la combinación de voltaje y anchura de pulso que permita obtener la máxima inactivación con el menor consumo energético. Se ha observado que para conseguir la misma inactivación microbiana en *Escherichia coli* era necesaria menos energía cuando se aplicaban pulsos de mayor voltaje y menor anchura. Sin embargo, también se ha visto que la inactivación de células vegetativas de *Bacillus subtilis* únicamente dependía de la energía aplicada independientemente del voltaje y la anchura del pulso empleados. (2)

4.4.1.5 Frecuencia

Los tratamientos mediante pulsos eléctricos de alto voltaje se aplican de forma intermitente a una frecuencia que puede variar desde 1 hasta 5000 Hz. El

aumento de la frecuencia permite reducir el tiempo de procesado. Sin embargo, se ha observado que, tras un mismo tiempo efectivo de tratamiento, la frecuencia no influye en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. (2)

Hay que considerar que la temperatura del medio de tratamiento aumenta a medida que la frecuencia es mayor. A frecuencias elevadas, se pueden alcanzar temperaturas letales en la cámara de tratamiento que también pueden contribuir al efecto inactivador total. (2)

4.4.1.6 Tiempo de tratamiento

Es el tiempo efectivo en el que los microorganismos están sometidos a la acción del campo eléctrico. Depende del número y la anchura de los pulsos aplicados. La inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje aumenta con el tiempo de tratamiento. Sin embargo, no está claro cuál es la cinética de inactivación microbiana por los pulsos eléctricos de alto voltaje. Algunos autores han encontrado una relación exponencial entre el número de supervivientes y el tiempo de tratamiento. Otros, sin embargo, han observado la existencia de una relación lineal entre el número de supervivientes y el tiempo de tratamiento cuando ambas variables se representan en escala logarítmica. En general, estas relaciones se han observado en experimentos en los que la inactivación alcanzada no suele superar los cuatro ciclos logarítmicos. Cuando se prolonga el tiempo de tratamiento para conseguir mayor inactivación, se observa, en una representación semilogarítmica, una rápida inactivación en los primeros momentos del tratamiento y, posteriormente, el número de supervivientes decrece lentamente a medida que se incrementa el tiempo de tratamiento. (2)

4.4.1.7 Temperatura

Los pulsos eléctricos de alto voltaje se caracterizan porque son capaces de

inactivar a los microorganismos a temperaturas no letales. Sin embargo el efecto inactivante de estos tratamientos es mayor al incrementar la temperatura. Este efecto se ha observado tanto a temperaturas no letales como a temperaturas letales. Esta mayor inactivación se ha relacionado con el incremento de la fluidez de los fosfolípidos de la membrana de los microorganismos a mayor temperatura.

Desde un punto de vista práctico, el aumento de la temperatura que se produce como consecuencia del paso de la corriente eléctrica durante la aplicación del tratamiento, puede resultar beneficioso siempre que no se alcancen temperaturas que alteren las propiedades del alimento. Este calentamiento puede reducir el tiempo de procesado o aumentar el grado de inactivación conseguido en el mismo tiempo de tratamiento. (2)

4.4.2 Características de los microorganismos

Las características propias de los microorganismos también influyen en la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Entre éstas, se pueden destacar el tipo de microorganismo, su tamaño y la fase de crecimiento. (2)

4.4.2.1 Tipo de microorganismo

Los tratamientos mediante pulsos eléctricos de alto voltaje son capaces de inactivar las formas vegetativas de las bacterias, los mohos y las levaduras. De los estudios realizados, se desprende que las levaduras son los microorganismos más sensibles y que las bacterias Gram (-) son más sensibles que las Gram (+). Se han logrado inactivar 3, 4 y 5 ciclos logarítmicos la población de esporas de *B. subtilis* y *B. cereus* respectivamente mediante un tratamiento a 50 kV/cm.

Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran que estas esporas bacterianas son resistentes a los tratamientos incluso tras su germinación. También, se ha observado que los tratamientos mediante pulsos eléctricos de alto voltaje no son capaces de inactivar los ascosporos de mohos. (2)

4.4.2.2 Tamaño celular

La mayor sensibilidad de las levaduras frente a los pulsos eléctricos de alto voltaje se atribuye a su tamaño celular. La influencia del tamaño en el efecto inactivador de los pulsos eléctricos de alto voltaje se ha relacionado con el potencial transmembrana creado por un campo eléctrico externo. Cuanto menor es el tamaño celular, menor es el valor del potencial transmembrana inducido por la acción de un determinado campo eléctrico y mayor es la resistencia del microorganismo al tratamiento. (2)

4.4.2.3 Fase de crecimiento celular

La influencia de la fase de crecimiento en la resistencia microbiana a los pulsos eléctricos ha sido estudiada por diferentes autores. Todos estos estudios muestran que los microorganismos que se encuentran en la fase exponencial de crecimiento son más sensibles a los pulsos eléctricos de alto voltaje que los que se encuentran en la fase estacionaria. (2)

4.4.3 Características del medio de tratamiento

La influencia de la conductividad eléctrica, el pH, la actividad del agua, la composición del medio de tratamiento, junto con la presencia de sustancias con actividad antimicrobiana en el efecto letal de los pulsos eléctricos de alto voltaje ha sido estudiada por diferentes autores. (2)

4.4.3.1 Conductividad eléctrica

Diversos autores han observado que la inactivación microbiana es mayor cuanto menor es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento. Sin embargo, cuando se estudia la influencia de la conductividad en la resistencia microbiana a los pulsos eléctricos de alto voltaje hay que considerar que la conductividad del medio influye en la intensidad del campo eléctrico y en la anchura del pulso que se obtiene en la cámara de tratamiento. (2)

4.4.3.2 pH

Los datos que existen en la actualidad sobre la influencia del pH en la resistencia de diferentes microorganismos a los pulsos eléctricos de alto voltaje son contradictorios. Algunos autores han observado que el pH no afecta al efecto letal de los pulsos eléctricos de alto voltaje. Otros han observado que *E. coli*, *L. innocua* y *Saccharomyces cerevisiae* son más sensibles a los pulsos eléctricos a pH's más ácidos. (2)

4.4.3.3 Actividad del agua

Apenas existen estudios sobre la influencia de la actividad del agua en el efecto inactivador de los pulsos eléctricos de alto voltaje. De los primeros estudios realizados, se desprende que, al igual que ocurre con la inactivación microbiana por el calor, el descenso de la actividad del agua protege a los microorganismos frente a los pulsos eléctricos de alto voltaje. (2)

4.4.3.4 Composición del medio de tratamiento

Se ha observado que en medios de la misma conductividad obtenidos añadiendo diferentes sales al agua, la resistencia de *E. coli* era mayor en

presencia de sales en cuya composición había cationes divalentes como el Ca^{++} y el Mg^{++} . También se ha observado que la resistencia de *E. coli* a los pulsos eléctricos de alto voltaje aumentaba al aumentar la concentración de grasa de la leche. (2)

4.4.3.5 Presencia de sustancias con actividad antimicrobiana

Diferentes autores han estudiado el efecto inactivante de los pulsos eléctricos de alto voltaje en presencia de sustancias con actividad antimicrobiana. Se ha visto que, en un medio de pH 3,4, la aplicación de un pulso de una intensidad de campo eléctrico de 12 kV/cm incrementaba el efecto inactivador del ácido benzoico y ácido sórbico tres ciclos logarítmicos. También, se ha observado que la adición de nisina (37 UI/ml) a leche desnatada y a huevo líquido aumenta el efecto inactivador de un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje (50 kV/cm) sobre *L. innocua* alrededor de 1 ciclo logarítmico. (2)

4.4.4 Inactivación de microorganismos

La inactivación de células vegetativas de microorganismos como *E. coli*, *S. typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium welchii*, *Candida albicans*, *S. cerevisiae*, y esporas de *B. cereus* y *B. subtilis* entre otros, ha sido observada. (3)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos humanos

- Estudiante.
- Asesores de tesis.
- Propietarios y trabajadores de las fincas.
- Personal docente y técnico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

5.1.2 Recursos biológicos

- Vacas lecheras.
- 30 litros de leche fresca.

5.1.3 Recursos de campo

- Vehículo de transporte.
- Hielera.
- Hielo.
- Recipiente hermético.
- Lazos.
- Lapicero.
- Botas de hule.

5.1.4 Recursos de laboratorio

- Frascos estériles para recolección de las muestras.
- Placas de petri.
- Medios de cultivo.
- Masking tape.
- Hielera.
- Agua peptonada 1 Lt.
- Pipetas.
- Removedor de plástico estéril.
- Gradillas de metal.
- Cámara de siembra.
- Probetas.
- Beaker (10 ml).
- Libreta de apuntes.
- Refrigerador.
- Incubadora.
- Autoclave.
- Microscopio.
- Equipo de electroporación.

Para la elaboración del aplicador de pulsos eléctricos se emplearon los siguientes materiales:

- Espiga para conducción eléctrica de 110 voltios.
- Cable paralelo de 2/14, con terminales para conectarse a la serie de electrodos.
- Electrodo de barras de cobre.

- Tres recipientes herméticos de plástico con tapadera y capacidad para un litro cada uno.
- Interruptor de corriente eléctrica para aplicar los pulsos como lo requiera cada tratamiento.

5.1.5 Centro de referencia

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Internet.

5.2 Metodología

5.2.1 Metodología del trabajo de campo

- Se adquirió la leche fresca de vaca en el lugar del ordeño. El ordeño se realizó manualmente y las vacas que proporcionaron la leche debían de estar sanas y bajo ningún tratamiento médico.
- La muestra comprendió de 3 litros de leche, obtenidos de la producción total del ordeño de la mañana, los cuales fueron almacenados en un recipiente hermético y colocados dentro de una hielera con suficiente hielo para luego trasladarlos al Laboratorio de Salud Pública de la FMVZ.

5.2.1.1 Ubicación de la toma de muestras

El municipio de Mixco está ubicado en el extremo oeste de la ciudad capital. Se localiza a 90° 34' de longitud oeste y 14° 16' de latitud norte, con un área total de 99 km² de los cuales 45,26 km² están dentro de la cuenca. Algunas áreas de

Mixco son de carácter húmedo y otras semi seco. Colindancias físicas: al norte con San Pedro Sacatepéquez (Guatemala), al sur con Villa Nueva (Guatemala), al este con Chinautla y Guatemala (Guatemala) y al oeste con San Lucas Sacatepéquez y Santiago Sacatepéquez (Sacatepéquez). (5) (8)

5. 2.2 Metodología en Laboratorio de Salud Pública

- Se tomó una muestra antes de realizar los tratamientos, identificándose y almenándose a 4°C, para determinar las unidades formadoras de colonias de los tres litros de leche y establecer la carga bacteriana inicial.
- Se inició la aplicación del primer tratamiento que consistió en someter 1 litro de leche cruda de vaca a corriente eléctrica de 110 voltios continuos durante 5 minutos.
- Se tomó la muestra del primer tratamiento, la identifiqué y coloqué a 4°C.
- Se continuó con la aplicación del segundo tratamiento, consistiendo en someter 1 litro de leche a un pulso continuo de corriente eléctrica de 110 voltios durante 25 segundos, con repeticiones a cada minuto. (a 5 pulsos con una duración de 25 segundos cada uno e intervalos de descanso entre cada uno).
- En la muestra del segundo tratamiento, se identificó y colocó junto a la muestra inicial y a la del primer tratamiento a 4°C.
- Se finalizó con la aplicación del tercer tratamiento que consistió en someter 1 litro de leche a corriente eléctrica de 110 voltios (durante 1 segundo) intermitentemente cada 3 segundos durante 5 minutos.

- En la tercera muestra del tratamiento, se identificó y se almacenó junto a la inicial, el primer y segundo tratamiento se almaceno a 4°C, trasladándolas luego al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ para su análisis.
- Se determinaron las unidades formadoras de colonias/ml. (UFC/ml.), de bacterias totales, mediante el recuento estándar en placa. (3)
- Se realizó el recuento estándar en placa en: UFC/ml. de leche.
- Se realizaron 40 análisis consistiendo en 10 repeticiones por cada tratamiento, para un total de 30 muestras y 10 muestras más que fueron las iniciales, que se tomaron antes de aplicar los tratamientos.
- En una tabla se anotaron los resultados las cargas bacterianas iniciales, antes y después de aplicar los tratamientos.
- Los resultados se emplearon para realizar el análisis estadístico.

5. 2.3 Metodología en Laboratorio de Microbiología

- Se prepararon las placas de petri estériles con 20 ml de agar para recuento (Plate Count).
- Se prepararon tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada.
- Se midió una porción adecuada de la muestra, 10 ml.
- La cifra pesada se multiplicó por 9 y el resultado de la multiplicación fue el volumen de mililitros de diluyente que se añadieron a la muestra para obtener 1:10.

- A partir de la dilución anterior se agregó 1 ml al tubo 2, se agitó, y así sucesivamente a los tubos siguientes.
- A partir de las diluciones decimales y por duplicado, se transfirieron 0.1 ml a cada una de las placas de agar, con la pipeta. El inóculo se diseminó por la superficie del agar con la ayuda de un removedor.
- Se dejaron las placas en reposo, una vez sembradas, hasta que el inóculo fue absorbido.
- Se colocaron las placas en la incubadora en posición invertida.
- Se incubaron a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 – 48 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de las colonias. El número total de colonias contadas multiplicado por el factor de dilución de la placa dando el recuento total en 1 mililitro.

5.3 Análisis estadístico

Los resultados de las muestras de leche fresca de vaca iniciales y después de aplicados los tres tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza y diferencia de medias de Tukey, para determinar si las medias de los cuatro grupos representados por la aplicación de los tratamientos fueron iguales o no.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la efectividad del sistema de electroporación en forma artesanal utilizando energía eléctrica de 110 voltios, cambiando la frecuencia de las descargas, de tres diferentes tratamientos en muestras de leche fresca de vaca. La electroporación ocasiona cambios en las funciones celulares así como rompimiento de la célula microbiana, induciendo la abertura de poros en la membrana, lo que provoca la inactivación del microorganismo. Esta puede ser reversible o irreversible de acuerdo a la intensidad de campo eléctrico aplicado, la frecuencia y el tiempo. La integridad de la membrana y su función de barrera es fundamental para la viabilidad celular. Si un campo eléctrico de suficiente intensidad y duración se aplica a una célula viva, la integridad de la membrana puede ser gravemente perturbada, causando perforación mecánica, lisis y muerte.

Al someter a los microorganismos presentes en la leche a corriente eléctrica, se produce un acumulo de cargas a ambos lados de la superficie de la membrana celular que genera una diferencia de potencial, denominado potencial transmembrana. Al aplicar un campo eléctrico externo, el número de cargas a ambos lados de la membrana aumenta y, por lo tanto, también aumenta el potencial transmembrana. (2)

Cuando aumentan las cargas de diferente signo a ambos lados de la membrana provoca que estas se atraigan entre sí con lo que la membrana se comprime, y da lugar a la formación de poros. El número de los poros formados depende de la intensidad del campo eléctrico, del tiempo y la frecuencia del tratamiento. Al valor umbral del campo eléctrico en que comienza a permeabilizarse la membrana se le denomina campo eléctrico crítico. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza valores próximos al del campo eléctrico crítico o el tiempo del tratamiento es muy corto, el número de los poros formados es muy bajo. En estas condiciones, la permeabilización de la membrana es reversible es

decir que, cuando finaliza el campo eléctrico, la membrana celular vuelve a su estado normal. (2)

Cuando se aplican campos eléctricos más intensos, aumenta la frecuencia o los tiempos de tratamientos son los adecuados, aumenta el número de los poros, lo que provoca una permeabilización irreversible de la membrana o incluso su ruptura mecánica. (2)

Al analizar los tratamientos uno por uno, podemos observar en el tratamiento # 1, que el pulso de corriente eléctrica aplicada fue de 110 voltios continuos durante 5 minutos, los resultados obtenidos fueron satisfactorios en el 50% de las muestras logrando disminuir la carga bacteriana en 5 muestras de las 10 repeticiones, mas no logró disminuir el 50% de la carga bacteriana en ninguna de las muestras respecto a la carga bacteriana inicial de las mismas, como se esperaba y se había planteado en la hipótesis. Se aplicó una sola carga permanente por 5 minutos, la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje aumenta al aumentar la intensidad del campo eléctrico. Se propició la abertura de poros una sola vez al inicio, pero no aumentó la intensidad, se mantuvo la misma carga durante 5 minutos, las membranas de las bacterias afectadas sufrieron daño al empezar la exposición y al no subir la intensidad, la cantidad de microorganismos destruidos no se incremento. Lo más significativo fue el aumento de la temperatura a 37°C siendo esta más propicia para el crecimiento bacteriano beneficiando la incubación en lugar de reducirla (Ver cuadro 1), como se determino en 5 muestras de 10 (50%) en las que aumento la carga bacteriana en relación a la muestra inicial. (Ver cuadro 3).

CUADRO 1 CONTROL DE TEMPERATURA EN GRADOS CENTÍGRADOS, DE LOS TRES TRATAMIENTOS APLICADOS

Muestra	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	Temperatura promedio
Temperatura Inicial	19°	18°	18°	18°	18°	18°	16°	18°	22°	20°	18.5°
Tratamiento 1	33°	34°	34°	33°	36°	39°	35°	32°	38°	36°	35.0°
Tratamiento 2	32°	34°	35°	32°	37°	36°	34°	30°	36°	32°	33.8°
Tratamiento 3	27°	29°	29°	29°	30°	30°	32°	28°	28°	27°	28.9°

Fuente: Elaboración propia

En el segundo tratamiento el pulso de corriente eléctrica fue de 110 voltios durante 25 segundos, con repeticiones a cada minuto. (5 pulsos con una duración de 25 segundos e intervalos de descanso de 1 minuto entre pulso y pulso). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en el 40% de las muestras logrando disminuir la carga bacteriana en 4 muestras de 10 (Ver cuadro 3), lo que provocó una muerte bacteriana mínima, reduciendo el conteo de la muestra inicial. En este tratamiento el campo eléctrico aplicado alcanza valores próximos al del campo eléctrico crítico o el tiempo no es suficiente, el número de los poros formados es muy pequeño. Bajo estas condiciones, la permeabilización de la membrana es reversible, cuando termina el campo eléctrico, la membrana celular regresa a su estado normal. Debido a este fenómeno la cantidad de UFC/ml disminuidas, no sobrepasó el porcentaje de efectividad alcanzado en las muestras del tratamiento # 1, y en ninguna de las muestras, en las que la carga bajo, se logra lo propuesto en la hipótesis, que es la disminución del 50% de la carga inicial (Ver cuadro 2).

CUADRO 2 CONTEO DE LAS UFC/ml EN LAS MUESTRAS INICIALES Y DESPUÉS DE APLICAR LOS TRES TRATAMIENTOS

Muestra	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	#10
Tratamiento inicial	25*10 ³	35*10 ³	17*10 ³	29*10 ³	40*10 ³	134*10 ³	144*10 ³	28*10 ³	109*10 ³	124*10 ³
Tratamiento 1	26*10 ³	30*10 ³	35*10 ³	43*10 ³	55*10 ³	111*10 ³	141*10 ³	46*10 ³	83*10 ³	93*10 ³
Tratamiento 2	29*10 ³	30*10 ³	58*10 ³	40*10 ³	57*10 ³	130*10 ³	143*10 ³	35*10 ³	99*10 ³	139*10 ³
Tratamiento 3	13*10 ³	12*10 ³	15*10 ³	30*10 ³	34*10 ³	106*10 ³	129*10 ³	25*10 ³	67*10 ³	73*10 ³

Fuente: Elaboración propia

En el tratamiento 3 el impulso de corriente eléctrica de 110 voltios se aplicó intermitentemente por 1 segundo cada 3 segundos (se dejó pasar corriente eléctrica por 1 segundo y se detuvo por 3 segundos, así repetitivamente por 5 minutos). Los resultados obtenidos en este tratamiento fueron del 90% de las muestras positivas disminuyendo la carga bacteriana en 9 de las 10 muestras procesadas. En este tratamiento se logró combinar voltaje (intensidad), frecuencia y tiempo de pulso adecuado, que permitió obtener la máxima inactivación de microorganismos con el mejor resultado de los tres tratamientos. Esto provocó mayor cantidad de poros en la membrana celular debido a que la frecuencia y el tiempo combinados trabajaron adecuadamente, a pesar de que la intensidad era la misma, cambiando el potencial transmembrana de la bacteria provocando la destrucción bacteriana más pronunciada y comprobable en las UFC/ml, en relación a la carga inicial de la muestras. A pesar de que se alcanzó el 90% de efectividad en este tratamiento, solamente en dos muestras (#1 y #2) se logró disminuir el 50% de la cantidad de UFC/ml en relación a las UFC/ml contadas antes de aplicar el tratamiento. (Ver cuadro 3)

Estadísticamente no existe diferencia significativa entre tratamientos en base a los resultados de las pruebas de análisis de varianza y diferencia de medias de

Tukey. Aunque las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas, ya que todos en diferentes porcentajes disminuyeron la carga bacteriana; se pudo observar que el tratamiento # 3 (aplicación intermitente) demostró un mejor porcentaje de efectividad en la reducción de la carga de las muestras iniciales.

CUADRO 3 SÍNTESIS DE LA DISMINUCIÓN O AUMENTO EN PORCENTAJES, POR MUESTRA, RESPECTO A LAS UFC/mi DE LA MUESTRA INICIAL

Muestra	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10
Tratamiento										
Tratamiento 1	↑ 4%	↓ 16%	↑ 105%	↑ 47%	↑ 38%	↓ 18%	↓ 3%	↑ 64%	↓ 25%	↓ 24%
Tratamiento 2	↑ 16%	↓ 14%	↑ 243%	↑ 39%	↑ 42%	↓ 3%	↓ 1%	↑ 25%	↓ 10%	↑ 12%
Tratamiento 3	↓ 52%	↓ 65%	↓ 14%	↑ 2%	↓ 15%	↓ 22%	↓ 11%	↓ 11%	↓ 39%	↓ 41%

Fuente: Elaboración propia

**CUADRO 4 CONTROL DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE TRES
DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ELECTROPORACIÓN APLICADOS EN
LECHE CRUDA DE VACA**

Fecha	No. Muestra (3 Lts. de leche)	Análisis Inicial UFC	Tratamiento # 1 (5 minutos continuos) UFC	Tratamiento # 2 (5 minutos, 1 descarga de 25 seg. cada minuto) UFC	Tratamiento # 3 (5 minutos, descargas a cada segundo) UFC	Total de Muestras
24/09/13	1	25*10 ³ /ml	26*10 ³ /ml	29*10 ³ /ml	13*10 ³ /ml	1
25/09/13	2	35*10 ³ /ml	30*10 ³ /ml	30*10 ³ /ml	12*10 ³ /ml	1
01/10/13	3	17*10 ³ /ml	35*10 ³ /ml	58*10 ³ /ml	15*10 ³ /ml	1
02/10/13	4	29*10 ³ /ml	43*10 ³ /ml	40*10 ³ /ml	30*10 ³ /ml	1
02/10/13	5	40*10 ³ /ml	55*10 ³ /ml	57*10 ³ /ml	34*10 ³ /ml	1
08/10/13	6	134*10 ³ /ml	111*10 ³ /ml	130*10 ³ /ml	106*10 ³ /ml	1
08/10/13	7	144*10 ³ /ml	141*10 ³ /ml	143*10 ³ /ml	129*10 ³ /ml	1
09/10/13	8	28*10 ³ /ml	46*10 ³ /ml	35*10 ³ /ml	25*10 ³ /ml	1
09/10/13	9	109*10 ³ /ml	83*10 ³ /ml	99*10 ³ /ml	67*10 ³ /ml	1
15/10/13	10	124*10 ³ /ml	93*10 ³ /ml	139*10 ³ /ml	73*10 ³ /ml	1

Fuente: Elaboración propia

VII. CONCLUSIONES

- La electroporación en forma artesanal utilizando energía eléctrica de 110 voltios, con intervalos en la exposición a corriente, es una alternativa para reducir la carga bacteriana en leche fresca.
- No existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres tratamientos utilizados en esta investigación, sin embargo todos funcionan disminuyendo la carga bacteriana inicial en diferentes porcentajes.
- El tratamiento 3 evidencio en la práctica, mayor efectividad en la reducción de carga bacteriana en leche fresca de vaca.
- La acertada combinación de la intensidad, frecuencia y tiempo del tratamiento aumenta el porcentaje de efectividad del mismo.
- Cuando la carga bacteriana es demasiado alta, el porcentaje de efectividad en la disminución de la misma es menos efectivo.

VIII. RECOMENDACIONES

- Emplear la electroporación en forma artesanal como una opción o alternativa para la reducción de la carga bacteriana de la leche fresca.
- Realizar otras investigaciones en los cuales se utilice como base el tratamiento 3, pero en tiempos de exposición más largos 10, 15 y 20 minutos, con frecuencia de exposición a intervalos de 1 segundo cada 3 segundos ya que fue la frecuencia que mejor funcionó.
- Evaluar si estos tratamientos pueden afectar las características nutricionales y organolépticas de la leche fresca.

IX. RESUMEN

La electroporación es un sistema alternativo para la reducción de carga bacteriana en alimentos, que consiste en la formación de poros en la pared de la membrana de las bacterias para aumentar la permeabilidad de estas y permitir el ingreso de líquido extracelular al espacio intracelular, con el fin de inactivar a los microorganismos y brindar al consumidor final alimentos más sanos y sin procesos que alteren la composición física, química y nutricional en este caso de la leche fresca de vaca.

Utilicé para esta investigación tres tratamientos distintos en la aplicación de corriente eléctrica de 110 voltios en leche fresca, a frecuencia y tiempo diferentes, con el propósito de demostrar que la electricidad es capaz de disminuir la carga bacteriana y al mismo tiempo determinar cuál de los tres tratamientos es el más efectivo.

El tratamiento con mejores resultados fue el número tres, disminuyendo la carga bacteriana en el 90% de las muestras, el impulso de corriente eléctrica de 110 voltios se aplicó intermitentemente por 1 segundo, con periodos de reposo de 3 segundos, durante 5 minutos.

A pesar que solamente en 2 muestras de los 3 tratamientos se logró disminuir la carga bacteriana al 50%, como se había establecido en la hipótesis, todos los tratamientos son efectivos en distintos porcentajes, pero no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tres tratamientos evaluados.

SUMMARY

The electroporation is an alternative system for the reduction of bacterial load in food, which consists in the formation of pores in the wall of the membrane of the bacteria to increase the permeability of these and allow the entry of extracellular fluid to the intracellular space, in order to inactivate microorganisms and provide to the final consumer food more healthy and without processes that alter the physical, chemical composition and nutritional status in this case of the fresh cow's milk.

Use for this research three different treatments in the application of electrical current of one hundred and ten volts in fresh milk, different time and frequency, with the purpose of demonstrate that electricity is able to reduce the bacterial load and at the same time determine which of the three is the most effective treatments.

The treatment with better results was the number three, reducing the bacterial load in the ninety percent of the samples, the momentum of electrical current of One hundred and ten volts was applied intermittently for one second, with periods of rest of three seconds, during five minutes.

Despite the fact that only two in three samples of the treatments reduced the bacterial load to fifty percent, as had been established on the assumption, all treatments are effective in different percentages, but there is no statistically significant difference between the three treatments.

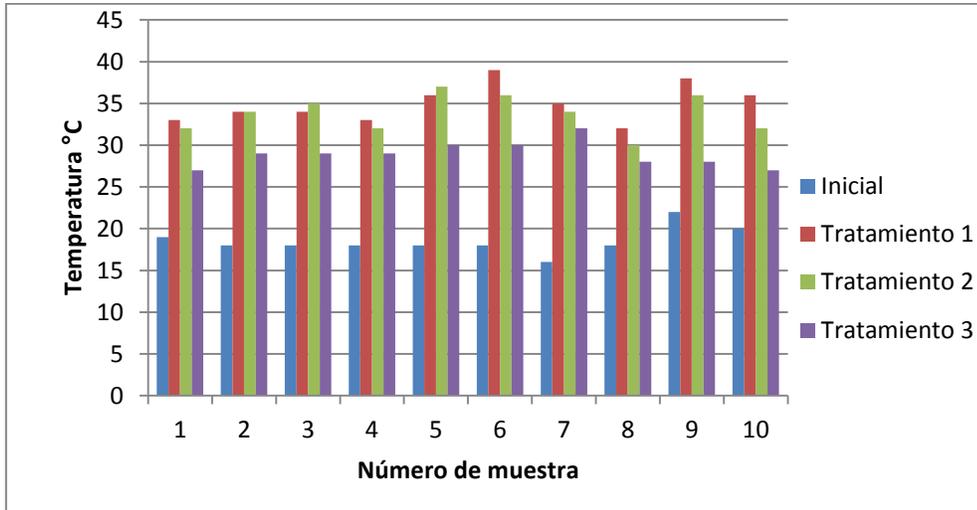
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agudelo, G., Divier, A., Bedoya, M., y Oswaldo (2005). Composición nutricional de leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación, enero-junio. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia. p. 38-42. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Universidad Autónoma del Estado de México. Vol. 2 (001). Recuperado <http://redalyc.uaemex.mx>
2. Alvarez, I., Raso, J., Pagán, R., y Sala, FJ. (2000). La conservación de los alimentos mediante pulsos eléctricos de alto voltaje. Aspectos biológicos. Tecnología de los alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Es.Acribia.143-151.P.
3. Calderon-Miranda, MA; San Martín González, MF; BARBOSA-CÁNOVAS, GV; SWANSON, BG (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: Variables e inactivación microbiana Recuperado de <http://bj.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v01nu01a.pdf>
4. Cátedra de: Tecnología de la leche. Trabajo práctico no. 5. (2007). Interpretación de los análisis de leche pool de tambo. Recuperado de <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/tp5.pdf>
5. Cerón-Carrillo, TG; Palou, E; López-Malo, A. (2010). Pulsos eléctricos: Fundamentos y aplicaciones en alimentos. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas, Puebla. Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla. 72810. México. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Recuperado de http://grupos.emagister.com/documento/temas de_ingenieria de_alimentos /1685-743136

6. CHIMALTENANGO.ORG. (2011). Municipio de Mixco. Recuperado de <http://www.chimaltenango.org/departamentos/guatemaladepartamento/mixco>
7. García, H.O (2002). Cuantificación de la calidad del agua del rio Villalobos en época seca y lluviosa en un periodo de 24 horas 2 veces al mes en un punto previo a la entrada al de Amatitlán. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsatesis/hgarcia.pdf>
8. May, Ruben; Technologies Inc. (2010). High Impedance Electroporation. Recuperado de http://acamp.ca/alberta-micronano/imagenes/cleantech/ACAMP_Cleantech_Ruben.pdf
9. M. Gèosta Bylund; López, Antonio. (2003). Manual de industrias lácteas. Capítulo 4. 436 P.
10. Reyes A., Blanca, R., y Soltero S., MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE CRUDA DE VACA (2011) Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, (COFOCALEC). Recuperado de <http://cofocalec.org.mx/docs/Microbiologia%20de%20la%20leche%20cruda%20de%20vaca.pdf>
11. WATTIAUX, M. (2011). Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera Universidad de Wisconsin-Madison. Recuperado de http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_06.es.pdf

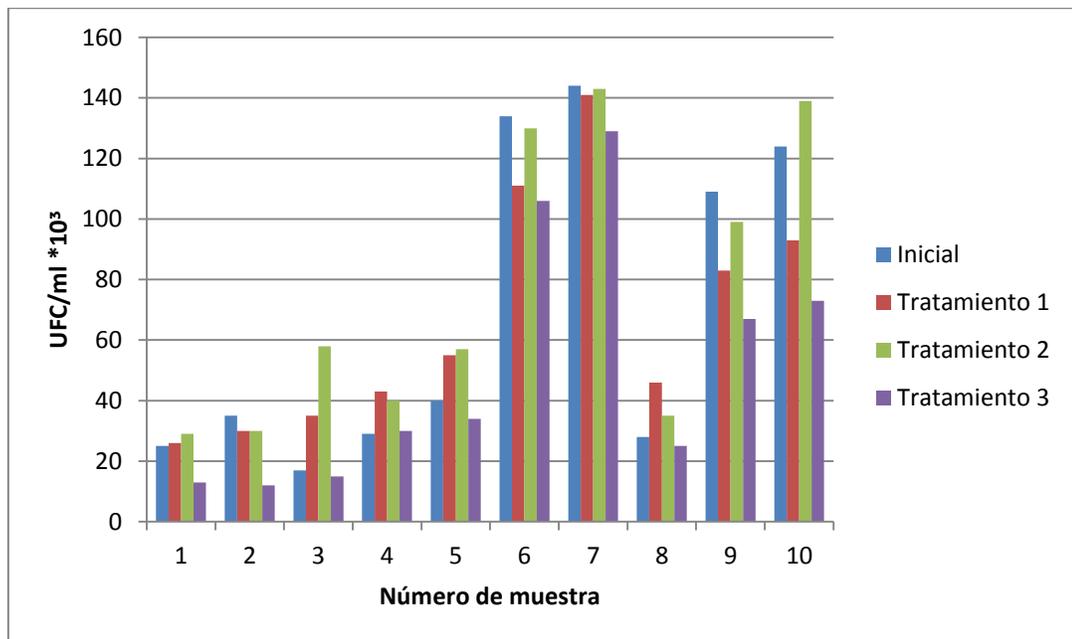
XII. ANEXOS

FIGURA 1 CONTROL DE TEMPERATURA EN GRADOS CENTÍGRADOS DE LAS MUESTRAS INICIALES Y DE LAS MUESTRAS DESPUÉS DE HABER APLICADO LOS TRES TRATAMIENTOS



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 2 CONTEO DE UFC/ml DE LAS MUESTRAS INICIALES Y DESPUÉS DE HABER APLICADO LOS TRES TRATAMIENTOS



Fuente: Elaboración propia

Elaboración del aplicador de electricidad

FIGURA 3 RECIPIENTE PLÁSTICO HERMÉTICO CON TAPADERA Y CAPACIDAD PARA 2 LITROS



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 4 CABLE # 12



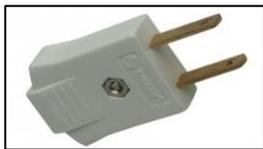
Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5 VARILLAS DE COBRE CALIBRE 10



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 6 ESPIGA



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 7 INTERRUPTOR DE CORRIENTE



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 8 CINTA DE AISLAR



Fuente: Elaboración propia

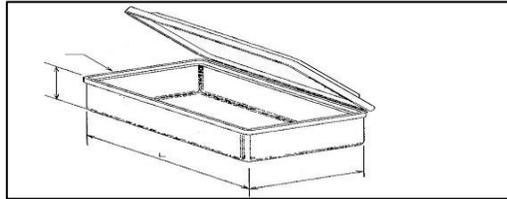
FIGURA 9 TAPONES DE HULE



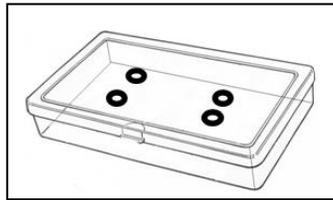
Fuente: Elaboración propia

Instrucciones para la fabricación del aplicador de corriente eléctrica

Paso 1: Marcar por la parte de afuera en el recipiente la medida para 1 litro.



Paso 2: Perforación de 4 agujeros, 2 por lado, centrados en cada mitad de la tapadera a una distancia de 10 cm. uno del otro, con barreno y broca 5/32" para colocar los tapones de hule, que servirán como aislantes de calor producido por el paso de corriente eléctrica.



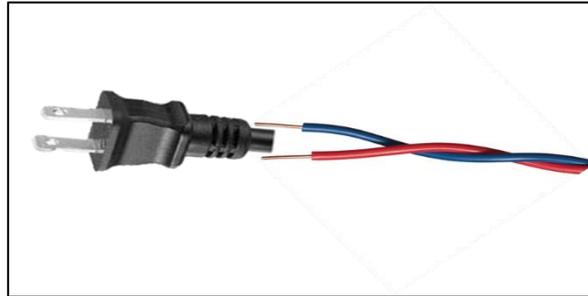
Fuente: Elaboración propia

Paso 3: Las varillas de cobre se doblan en forma de u y se remueven 3 cm. del forro de hule en la mitad de la u para unir el cable que conducirá la corriente eléctrica, se procede a eliminar 12 cm. del forro de hule de las puntas, las que estarán en contacto con el liquido al momento de conectarlo.



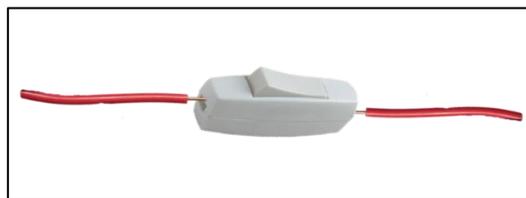
Fuente: Elaboración propia

Paso 4: Los cables que conducirán la corriente eléctrica se unen a la espiga, el de color rojo conducirá la corriente eléctrica y el cable azul será neutro (tierra).



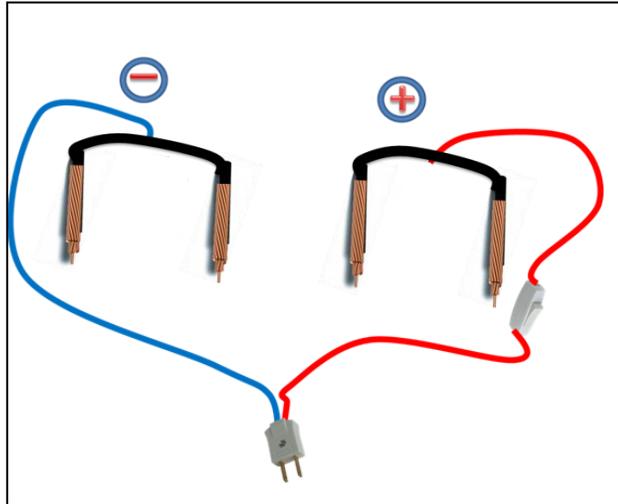
Fuente: Elaboración propia

Paso 5: El interruptor de corriente eléctrica se colocará a 45 cm. del final del cable rojo (corriente). El largo total de los cables dependerá de la distancia que sea necesaria para alcanzar la fuente de corriente eléctrica más cercana. En este caso se emplearon cables de 1.30 metros de largo.



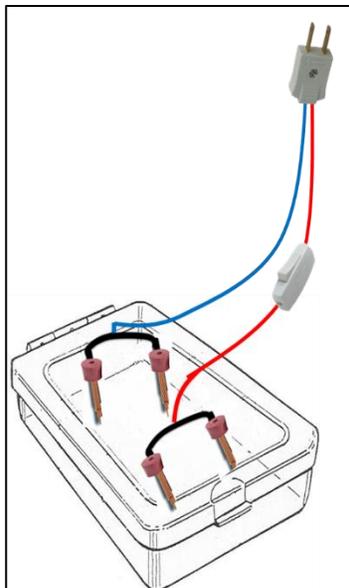
Fuente: Elaboración propia

Paso 6: Se une a la primera u el cable rojo (corriente) con cinta adhesiva y a la segunda u el cable azul (tierra) también con cinta adhesiva.



Fuente: Elaboración propia

Paso 7: Se instalan los electrodos uno frente al otro en los agujeros con hules que funcionan como aislantes. Todas las uniones entre cables deben de estar bien cubiertas por cinta adhesiva.



Fuente: Elaboración propia

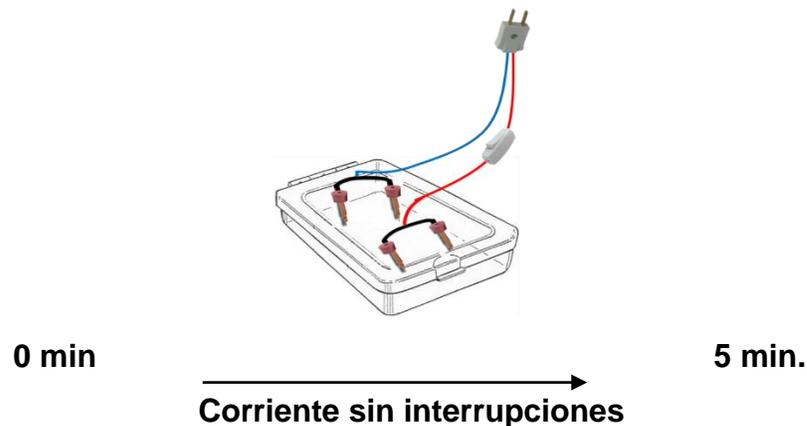
Normas Básicas de Uso y Seguridad

Antes de conectar el aplicador de corriente eléctrica es necesario tomar en cuenta:

- Todas las uniones de cables y alambres deben de estar bien cubiertas con cinta adhesiva.
- El interruptor debe de permanecer apagado hasta el momento de ubicar la tapadera sobre el recipiente con los electrodos.
- Por ningún motivo tocar los electrodos mientras el aplicador esté conectado a la corriente eléctrica.
- No destapar ni tocar el contenido del recipiente, mientras el aplicador esté conectado.
- Al finalizar cualquier tratamiento apagar el interruptor y desconectar de la corriente eléctrica para poder retirar la tapadera del recipiente.

Figura 10 Diagrama de los tratamientos aplicados

Tratamiento # 1



Fuente: Elaboración propia

En este tratamiento se sometió la leche a corriente eléctrica por 5 minutos continuos, es decir se dejó pasar la corriente de 110 voltios sin interrupciones.

En el último tratamiento la energía se aplicó intermitentemente por 1 segundo, cada 3 segundos, hasta completar un tiempo total de 5 minutos. Se inició dejando correr la energía por 1 segundo y se detenía el flujo de la misma por 3 segundos con ayuda del interruptor o switch, se empleó la misma repetición por un tiempo total de 5 minutos.

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

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD EN LA APLICACIÓN DE TRES
TRATAMIENTOS DE UN SISTEMA NO TÉRMICO PARA LA
REDUCCIÓN DE CARGA BACTERIANA (ELECTROPORACIÓN) EN
FORMA ARTESANAL, EN LECHE FRESCA DE VACA DE DOS
EXPLOTACIONES LECHERAS FAMILIARES, UBICADAS EN EL
MUNICIPIO DE MIXCO**

f. _____
RUDY JOSÉ LOPEZ RODRÍGUEZ

f. _____
M.V. Luis Alfonso Morales Rodríguez
ASESOR PRINCIPAL

f. _____
M.A. Jaime Rolando Méndez Sosa
ASESOR

f. _____
M.V. Julia Virginia Bolaños de Corzo
ASESORA

f. _____
M.V. Rolando Antonio Gudiel
Jovel
EVALUADOR

IMPRÍMASE

f. _____
M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO