

Efecto del ozono en la disminución de carga bacteriana y en el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas de la leche: una alternativa para el consumo humano

Soque Alex¹, Baquero María Inés¹, Estupiñán Pamela¹, Medina José Luis¹, Puga Byron¹, Mosquera Jorge¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador

Correspondencia: Alex Soque; awsoque@uce.edu.ec

Recibido: 06 marzo 2019; **Aceptado:** 30 junio 2019

Resumen

Introducción: La pasteurización de leche muy contaminada principalmente con esporas de clostridios, no es muy segura debido a que el calor no destruye a este agente biológico. Una alternativa es el uso de ozono (O₃), un gas altamente oxidativo con amplio espectro antimicrobiano, pero no se conoce la dosis máxima que pueda ser aplicada a los alimentos.

Objetivo: Determinar la dosis y tiempo de exposición de la leche cruda al ozono, a fin de reducir la carga bacteriana, sin afectar las características físico-químicas.

Métodos: Estudio experimental en muestras de leche cruda cultivadas antes y después de la aplicación de O₃ a diferentes dosis (50, 75 y 100 mg/L) y periodos de tiempo (10, 20 y 30 minutos), total nueve grupos (T1-T9) y un grupo control sin O₃. El efecto del ozono fue evaluado a través de la determinación de carga de mesófilos, coliformes y *Escherichia coli* y de parámetros físico químicos en leche, en comparación con leche cruda, leche hervida y ultrapasteurizada.

Resultados: Todos los tratamientos fueron efectivos en reducir la carga bacteriana con respecto a la leche cruda. El T9 (100 mg O₃/L durante 30 minutos), fue el más efectivo al permitir una reducción del 64.87% (2.53 Log₁₀ UFC/mL) del conteo inicial de mesófilos aerobios totales, una reducción del 100% (3.68 Log₁₀ UFC/mL) para coliformes totales y una reducción del 100% (3.67 Log₁₀ UFC/ml) para *Escherichia coli*. No hubo cambios físico-químicos en la leche ozonizada ($P \geq 0.05$), pero si en leche hervida y UHT comparada con la leche cruda.

Conclusiones: La ozonización es efectiva en la disminución de la carga bacteriana de leche cruda, sin alterar sus características físico-químicas.

Palabras clave: Ozono, leche, carga bacteriana, características físico-químicas

Effect of ozone on the reduction of bacterial load and on the maintenance of the physicochemical properties of milk: an alternative for human consumption

Abstract

Background: Pasteurization of heavily contaminated milk, mainly with clostridial spores, is not safe because heat does not destroy this biological agent. An alternative is the use of ozone (O₃), a highly oxidative gas with a broad antimicrobial spectrum, but the maximum dose that can be applied to food is unknown.

Objective: To determine the dose and exposure time of raw milk to ozone, in order to reduce the bacterial load, without affecting the physical-chemical characteristics.

Methods: Experimental study on raw milk samples grown before and after the application of ozone at different doses (50, 75 and 100 mg/L) and time periods (10, 20 and 30 minutes), total 9 groups (T1-T9) and a control group without O₃. The effect of ozone was evaluated through determination of the load of mesophiles, coliforms and *Escherichia coli*, as well as the physical chemical parameters in milk, compared to raw milk, boiled and ultrapasteurized milk.

Results: All treatments were effective in reducing the bacterial load with respect to raw milk. T9 (100 mg O₃/L for 30 minutes) was the most effective, allowing a reduction of 64.87% (2.53 Log₁₀ CFU/mL) of the initial total aerobic mesophil count, a 100% reduction (3.68 Log₁₀ CFU/mL) for total coliforms and a 100% reduction (3.67 Log₁₀ CFU/mL) for *Escherichia coli*. There were no physical-chemical changes in ozonized milk ($P \geq 0.05$), but in boiled milk and UHT compared to raw milk.

Conclusion: Ozonation is effective in reducing the bacterial load of raw milk, without altering its physical-chemical characteristics.

Keywords: Ozono, milk, bacterial load, physical-chemical characteristics

Citación: Soque A, Baquero MI, Estupiñán P, Medina JL, Puga B, Mosquera J. Efecto del ozono en la disminución de carga bacteriana y en el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas de la leche: una alternativa para el consumo humano. Rev Fac Cien Med (Quito) 2019; 44 (1): 38-47



Introducción

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), durante el 2011 Sudamérica alcanzó una producción de leche equivalente a 68 millones de toneladas, correspondiéndole el 9.3% de la producción mundial total [1]. En Ecuador, de acuerdo a datos de la Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente, la producción láctea para el año 2015 fue 5.5 millones de litros [2]. La última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reveló que a nivel nacional, se consumen 181 mL/día per capita de lácteos y derivados [3], lo que equivale a 66.1 litros /año /per cápita.

La leche es un alimento con alto grado de nutrientes, posee una consistencia líquida y un pH ligeramente ácido [4], características que la convierten en un medio ideal para el crecimiento de microorganismos [5]. La norma técnica ecuatoriana del Instituto Nacional de Normalización (INEN) define a la leche cruda como aquella que no fue sometida a una temperatura superior a 40°C, estableciendo como límite máximo un recuento de microorganismos aerobios mesófilos de 5×10^4 UFC/mL [6]. En leche pasteurizada, los niveles son más exigentes permitiéndose un índice máximo permisible de buena calidad estimado en 3×10^4 UFC/mL [7].

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), por lo general, son de tipo infeccioso o tóxico, ocasionadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas contaminantes que pueden contener los productos finales o las materias primas, como es la leche cruda [8]. En este sentido y para garantizar el consumo de productos seguros e inocuos, la industria alimenticia ha investigado diversos procesos que contrarresten a estos agentes microbianos, entre ellos el uso de ozono [9].

El ozono es un gas de color azulado a temperatura ambiente cuando es generado a partir de aire seco y es incoloro al generarse de oxígeno puro [10]. Está compuesto por tres átomos de oxígeno [10] altamente oxidativo, con un amplio espectro antimicrobiano, capaz de inactivar cé-

lulas vegetativas y esporuladas, levaduras, mohos, virus e incluso micotoxinas [11].

La acción del ozono se basa en la oxidación que se produce en ácidos grasos polinsaturados que constituyen parte de la pared celular bacteriana, que provoca pérdida de la permeabilidad selectiva y posterior disrupción celular [11]. Esto, sumado a su alta capacidad de difusión en la materia orgánica (hasta 3000 veces más rápida que el cloro), lo convierte en una estrategia a considerar en la obtención de alimentos inocuos [12].

La eficacia del ozono en su forma gaseosa como agente antimicrobiano en el empaque y almacenamiento de alimentos está documentada [13]. Su acción ha sido comprobada contra *Salmonella infatis* y *Pseudomonas aeruginosa* en carcasas de pollo [14]. Además, es eficaz contra residuos de fungicidas en la producción de vino [15] y su acción antimicrobiana en frutas tales como melón [16], arándanos [17], higos secos [18] y uvas [19]. La eficiencia antibacteriana del ozono en solución acuosa fue investigada en productos como el pimienta rojo, berros y fresas [20].

Los tratamientos térmicos utilizados en la leche, generan alteraciones en las características organolépticas del producto final [21]. El calor induce un daño de diferente magnitud sobre el valor biológico [22], más notorio en la industria [23]. La bibliografía señala que la pasteurización de la leche merma la actividad del cuajo, dificultando la separación del queso y el lactosuero [24] además, la precipitación parcial de las albúminas y globulinas dificultan el desuerado [25], originando quesos con excesiva humedad [26]. El queso almacenado con exceso de humedad y un pH bajo se caracteriza por una textura blanda y un sabor amargo [27], efecto más evidente en quesos de pasta hilada [28]. La pasteurización puede tener efectos perjudiciales en leche muy contaminada con esporas de clostridios, debido a que el calor no destruye a este agente biológico y se estimula la fermentación butílica en quesos elaborados con leche pasteurizada [29].

Estudios experimentales previos demuestran la efectividad del ozono aplicado por burbujeo sobre bacterias psicrofílicas, enterobacterias y *Staphylococcus* [11,30,31]. No se dispone información sobre la aplicación directa del ozono en tanques de leche transportados al centro de acopio. La Food and Drug Administration (FDA) no estipula una dosis máxima de ozono que pueda ser aplicada a los alimentos; sin embargo, afirma su actividad microbiológica efectiva permitiendo su uso, siempre y cuando no altere la composición del alimento tratado o ponga en riesgo al medio ambiente o al operario [32]. Con estos antecedentes en este estudio se establecieron las dosis y el tiempo de aplicación de ozono adecuado para la reducción bacteriológica conservando las características físico químicas de la leche pasteurizada, acordes a la normativa técnica NTE INEN 10 "Leche Pasteurizada. Requisitos" (INEN, 2012) [7,33].

Métodos

Diseño

Se realizó un estudio experimental en leche cruda para determinar el efecto de tres dosis de ozono en la disminución de carga bacteriana y en el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas de la leche. La leche cruda se obtuvo de una hacienda lechera localizada en la parroquia de Amaguaña, Cantón Quito, provincia de Pichincha. Se colectó una muestra semanal de 10 litros de leche obtenida directamente del tanque de recolección durante tres semanas.

Las muestras se tomaron de ordeños aleatorios e independientes y fueron transportadas a 4°C al laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador para su procesamiento bacteriológico. Además, tres muestras de leche (una por repetición) fueron sometidas a un tratamiento térmico simulando el proceso doméstico de ebullición realizado en casa. Por último, el análisis físico químico tuvo lugar en el laboratorio de Lácteos de la Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, donde se analizaron la leche procedente de los distintos tratamientos con ozono, la leche esterilizada a alta temperatura después de ser envasada (Ultra High Temperature, UHT) de marca comercial y la leche con tratamiento térmico.

Ozono y tratamientos

Para determinar la concentración efectiva de ozono en miligramos y el tiempo de exposición de la muestra de leche en minutos, se adaptó las recomendaciones de los estudios de Cavalcante [11] y Sung [34], considerándose tres concentraciones -50, 75 y 100 mg/L- y tres periodos de tiempo -10, 20 y 30 minutos-. Los tratamientos realizados constan en la **Tabla 1**.

El ozono fue producido a partir de oxígeno médico a través de un generador marca Bioline® de seis gramos. Durante la aplicación de ozono, cada muestra de leche sometida a un tratamiento fue colocada en una bolsa plástica hermética estéril (una por tratamiento) y luego se aplicó el ozono de manera directa a cada muestra manteniéndose una agitación constante durante la fase de dispersión del elemento químico en función a la concentración y tiempo establecidos para cada tratamiento. Concluida la etapa de aplicación y dispersión del ozono, las muestras fueron transportadas en contenedores herméticos a 4°C hasta el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Laboratorio de Industrias Lácteas de la Universidad Central del Ecuador.

Análisis microbiológico

La carga bacteriana para aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Escherichia coli* fueron estudiados mediante cuantificación en cada una de las muestras tratadas con ozono, UHT y con tratamiento térmico. Además se evaluó la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. Para la cuantificación se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ y 10⁻² en agua peptonada tamponada (Difco

Tabla 1. Tipos de tratamiento a muestras de leche según dosis de ozono y tiempo de exposición al químico.

| Tratamientos | Concentración Ozono (mg/L) | Tiempo (minutos) |
|---------------------------------|----------------------------|------------------|
| Testigo o control (Leche cruda) | 0 | 0 |
| T1 | 50 | 10 |
| T2 | 50 | 20 |
| T3 | 50 | 30 |
| T4 | 75 | 10 |
| T5 | 75 | 20 |
| T6 | 75 | 30 |
| T7 | 100 | 10 |
| T8 | 100 | 20 |
| T9 | 100 | 30 |

BD Sparks®) y se utilizó el sistema Petrifilm® 3M® para mesófilos totales (AOAC 990.12) [35], coliformes totales y *Escherichia coli* (AOAC 991.14) [36] siguiendo las indicaciones de la casa comercial. *Listeria monocytogenes* (AOAC-RI 030601) [37] y *Salmonella* spp (AOAC 2014.01) [38] fueron identificados utilizando el mismo sistema Petrifilm.

Análisis físico-químico

Los análisis de densidad relativa de líquidos [39], porcentaje de grasa [40], acidez titulable [33], sólidos totales [41], y cálculo de agua [41] se realizaron en base a la normativa ecuatoriana.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos tras la cuantificación de microorganismos y pruebas físico-químicas de la leche, fueron analizados a través del programa IBM SPSS Statistics® versión 23. Por la naturaleza de los datos se optó por la aplicación de la prueba de varianza de una vía de Kruskal Wallis y de la prueba de U de Mann Whitney para identificar diferencias significativas entre tratamientos, con un intervalo de confianza del 95%. Además, a fin de establecer relación entre el recuento microbiológico resultante en las distintas muestras con la dosis de ozono y el tiempo de exposición

en cada tratamiento, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre tratamientos.

Resultados

Análisis microbiológico

El recuento microbiológico de las muestras control y especímenes tratados con ozono consta en la **Tabla 2**. El mayor recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) correspondió a las muestras control (T0, leche cruda). Los especímenes de leche tratada con ozono presentaron carga microbiana; sin embargo, los recuentos en UFC fueron gradualmente disminuyendo en función a la dosis de ozono y tiempo de administración hasta alcanzar valores bajos a la dosis máxima de O₃ (100 mg/L/30 minutos), la cual evidencia mejores resultados.

En promedio, si se compara con las muestras control, la reducción de microorganismos posteriores al tratamiento T9 de ozono fue de 99.71 %, para mesófilos aerobios totales y 100% para coliformes y *Escherichia coli*. El análisis estadístico del recuento microbiológico para cada muestra tratada con ozono relacionada a dosis y tiempo, evidenció diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) respecto a las muestras control. Se encontró similar recuento de microorganismos (mesófilos aerobios totales, coliformes totales y

Escherichia coli) en los tratamientos T2 (50 mg O₃ / 30 minutos), sin demostrarse diferencias significativas ($P \geq 0.05$). No se reportaron recuentos de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en los distintos tratamientos.

Tabla 2. Recuentos microbiológicos (Log10 UFC/mL) observados en leche cruda y leche tratada con ozono según dosis y tiempo de exposición.

| Recuentos microbiológicos | Testigo | Tratamientos | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | T0 | T1 ^a | T2 ^a | T3 ^a | T4 ^a | T5 ^a | T6 ^a | T7 ^a | T8 ^a |
| Mesófilos aerobios totales | 3.9 | 3.2 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 2.9 | 2.7 | 2.5 | 1.7 | 1.4 |
| Coliformes totales | 3.7 | 3.07 | 2.3 | 2.3 | 2.2 | 2.4 | 2.3 | 1.9 | 1.0 | 0.0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 3.7 | 2.6 | 2.4 | 2.5 | 2.2 | 2.1 | 1.8 | 1.2 | 0.7 | 0.0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| <i>Salmonella</i> spp. | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |

A= ausencia. T0 = control. T1 a T9 = tratamientos con ozono

^a Control vs cada Tratamiento $P < 0.05$

El recuento microbiano en leche sometida a los diferentes esquemas de tratamiento con ozono mostró una reducción considerable comparado con leche hervida y UHT (no se muestran los datos). La disminución del recuento de mesófilos aerobios totales, coliformes y *Escherichia coli* fue más significativa en el grupo T9 ($P < 0.05$). No se reportó la presencia de *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* spp. en los tres tipos de leche (**Tabla 3**).

Tabla 3. Recuentos microbianos (Log10 UFC/mL) observados en leche cruda y leche tratada con ozono (T9), leche hervida y leche UHT.

| Recuentos microbiológicos | Tratamientos | | |
|-------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| | T9 | Leche hervida | Leche UHT |
| Mesófilos aerobios totales | 1.37 | 3.71 ^a | 2.50 ^b |
| Coliformes totales | 0.00 | 2.77 ^b | 0.00 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0.00 | 1.44 ^b | 0.00 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | A | A | A |
| <i>Salmonella</i> spp. | A | A | A |

A= ausencia.

Comparaciones de cada tipo contra T9: ^a $P = 0.035$; ^b $P < 0.05$

Se observó una correlación positiva entre el mayor tiempo de exposición y dosis de O₃ y menor recuento microbiano. Así la concentración de O₃ demostró muy buena correlación para mesófilos aerobios totales ($r_s = 0.96$), coliformes totales ($r_s = 0.90$) y *Escherichia coli* ($r = 0.96$). En cuanto al tiempo de exposición, se encontró moderada correlación para mesófilos

aerobios totales ($r_s = 0.45$) y *Escherichia coli* ($r_s = 0.44$), mientras coliformes totales presentaron baja correlación ($r_s = 0.39$).

Análisis físico-químico

Los resultados del análisis físico-químico para leche cruda y leche tratada con ozono

constan en la **Tabla 4**. Los valores de densidad relativa, porcentaje de grasa, acidez, sólidos totales, agua y sólidos no grasos fueron similares para todos los esquemas de tratamiento con ozono. Pese a que estos valores fueron menores que los de la leche cruda, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El valor de pH fue significativamente menor en todos los tratamientos con relación al testigo.

Tabla 4. Análisis físico químico de leche cruda y de leche con los tratamientos de ozono

| Parámetros | Testigo | Tratamientos | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | T0 | T1 ^a | T2 ^a | T3 ^a | T4 ^a | T5 ^a | T6 ^a | T7 ^a | T8 ^a | T9 ^a |
| Densidad de líquidos a 20°C (g/mL) | 1029 | 1029 | 1029 | 1029 | 1029 | 1029 | 1030 | 1029 | 1029 | 1029 |
| Porcentaje de Grasa (%) | 4.2 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.2 | 3.9 | 4.0 | 4.2 | 4.1 |
| Acidez (°D) | 17.9 | 15.3 | 16.2 | 15.6 | 16.4 | 15.4 | 15.9 | 11.1 | 16.7 | 14.3 |
| Sólidos totales (%) | 13.1 | 12.9 | 12. | 12.9 | 12.9 | 13. | 12.8 | 12.9 | 12.9 | 12.9 |
| Agua (%) | 86.9 | 87.1 | 87.4 | 87.1 | 87.1 | 86. | 87.1 | 87.1 | 87.1 | 87.12 |
| Sólidos no grasos (%) | 8.8 | 8.8 | 8.5 | 8.8 | 8.8 | 8. | 8.9 | 8.7 | 8.8 | 8.8 |
| pH | 6.7 | 6.5 ^a | 6.7 | 6.6 | 6.68 | 6.5 ^a | 6.5 ^a | 6.6 ^a | 6.5 ^a | 6.56 ^a |

°D = grados Dornic. T0 = control. T1 a T9 = tratamientos con ozono.

^aValores con diferencia significativa con relación al control ($P < 0.05$).

El análisis físico-químico de la leche hervida, UHT y leche ozonizada (T9) se describe en la **Tabla 5**. La densidad de líquidos y sólidos totales son significativamente menores en la leche tratada con ozono con respecto a la leche cruda. Contrariamente, el porcentaje de agua fue significativamente mayor en la leche tratada con ozono. Sin embargo, la leche UHT en relación a la leche ozonizada no exhibió diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en la mayoría de parámetros físico-químico.

Tabla 5. Comparación de resultados físico-químicos de la leche cruda, leche hervida y leche UHT comparados con T9.

| Parámetros | Leche cruda | Leche hervida | Leche UHT | T9 |
|------------------------------------|-------------|---------------|-----------|------|
| Densidad de líquidos a 20°C (g/mL) | 1029 | 1035* | 1030* | 1029 |
| Porcentaje de Grasa (%) | 4.2 | 4.3 | 3.0 | 4.1 |
| Acidez (°D) | 17.9 | 18.7 | 15.2 | 14.3 |
| Sólidos totales (%) | 13.1 | 14.6* | 11.9 | 12.9 |
| Agua (%) | 86.9 | 85.4* | 88.0 | 87.1 |
| Sólidos no grasos (%) | 8.8 | 10.3 | 8.9 | 8.8 |

* Valores con diferencia significativa ($P < 0.05$ relacionados a T9)

Discusión

El principal hallazgo del estudio fue que el tratamiento de ozono produce reducción de la carga bacteriana de las muestras de leche sin

alterar sus características físico-químicas, respecto a las muestras control. Aunque se detectaron bacterias en las muestras tratadas con O_3 , se evidenció una reducción gradual en el recuento en función a la dosis y tiempo em-

pleados en cada uno de los tratamientos. En el tratamiento T9, el conteo de mesófilos aerobios totales fue $4.69 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, coliformes totales $1.0 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, y *Escherichia coli* $0.0 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, valores aceptados en la normativa ecuatoriana [35] y europea [42]. Los resultados concuerdan con otros estudios realizados en alimentos tratados con O_3 para disminuir la carga microbiana y aumentar la vida útil de los productos por lo que se colige que se detectarán mayores recuentos microbianos en productos no tratados con O_3 [14,20].

El recuento de mesófilos aerobios totales presentó valores más altos en leche cruda ($3.9 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$), observándose disminución de la carga microbiana en las muestras tratadas a medida que se incrementó la concentración y tiempo de aplicación de O_3 , (**Tabla 3**). Los resultados concuerdan con el estudio de Cavalcante y colaboradores que reporta un efecto similar del ozono para reducir la carga de mesófilos aerobios totales (1.5 mg O_3 por litro durante 15 minutos) [11].

El conteo final de coliformes totales en leche cruda fue $3.68 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, siendo este el valor de recuento más alto. A medida que se trató con ozono las distintas muestras, la carga bacteriana se redujo hasta $0 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$ en la muestra T9. La información disponible no reporta el efecto del tratamiento de la leche cruda con ozono sobre microorganismos coliformes; pero se ha reportado que el efecto del ozono en alimentos frescos (papaya) se traduce en recuentos bajos a una dosis de ozono de $9.2 \pm 2 \mu\text{L/L}$ [43].

El conteo total de *Escherichia coli* en leche cruda fue $3.67 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, mientras que en las muestras tratadas se demostró una disminución gradual en el recuento bacteriano a medida que se incrementó la dosis de O_3 , registrándose un recuento de $0.0 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$ en T9, resultado que coincide con el reporte de Sung y colaboradores [34], quienes destacan el efecto del ozono en forma gaseosa a dosis de dos a tres gramos $\text{O}_3 / \text{m}^3 / \text{minuto}$ y calor, aplicados a jugo de manzana pasteurizada el

que fue previamente inoculado experimentalmente con *Escherichia coli*.

En leche hervida, se logró las cargas bacterianas iniciales de mesófilos aerobios totales ($3.71 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$), coliformes totales ($2.77 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$) y *Escherichia coli* ($1.44 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$), resultado que concuerda con el reporte de Agarwal [44], donde se señala la reducción del recuento (valor inicial y final) de mesófilos aerobios totales y de coliformes; sin embargo, difieren los valores iniciales y finales del recuento de *Escherichia coli*, donde reportan $0.0 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$, atribuyéndose a que el estudio de Agarwal controló las variables tiempo y temperatura de ebullición de la leche. Con esta aclaración, se destaca la diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la reducción del recuento bacteriano al comparar leche hervida y leche tratada con ozono. En la leche UHT en este estudio se demostró mesófilos aerobios totales ($2.50 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/mL}$), resultado similar al realizado en Turquía, donde fueron evaluadas muestras de leche UHT obtenidas de supermercados locales [45].

La evaluación de las características fisicoquímicas de la leche permite afirmar que no existe diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) entre la leche cruda y la tratada con ozono a dosis variables y sus parámetros coinciden con la norma ecuatoriana [6]. Aún en el tratamiento con más concentración de O_3 y mayor tiempo (T9) mostró parámetros similares a los de la leche cruda y pasteurizada, lo que sugiere que el O_3 no altera las propiedades físicas y químicas de la leche, equiparándola en sus propiedades con la de la leche cruda por lo que cumple con la normativa nacional de la leche pasteurizada [7]. Contrariamente, en el caso de la leche hervida, la densidad de líquidos, el porcentaje de sólidos totales y el porcentaje de agua, mostraron diferencia estadística en relación a la leche UHT y a la muestra tratada T9. Posiblemente, las deshidrataciones más prolongadas durante la ebullición contribuyen a los cambios de los parámetros físico-químicos de la leche.

Hay que anotar que el estudio tiene algunas limitaciones: a) debido a restricciones de equipamiento no se probaron dosis más bajas de ozono, b) el estudio no midió la concentración de ozono residual luego de tratar las distintas muestras de leche por lo que, a mediano plazo, deberá complementarse nuevos estudios para determinar valores residuales y dosis menores a 50 mg/L en 10 minutos de exposición, y c) restó estimar el impacto del ozono sobre el medio ambiente y sobre el personal que labora para el sistema de manejo de la producción lechera del país.

La presente investigación permitió demostrar la disminución de la carga bacteriana de la leche cruda a través de la ozonización, proceso que se equipararía a otros tradicionalmente utilizados, sin alterar las propiedades físicas-químicas de la leche. Esta es una técnica innovadora (terapia de ozono en alimentos), y que además de poder ser aplicada sobre todo tipo de alimento, es amigable con el medio ambiente. Sería de gran utilidad futuras investigaciones acerca de los efectos del ozono sobre las propiedades organolépticas de leche, así como la percepción del consumidor ante productos tratados con ozono, y conocer la factibilidad económica del reemplazo de una planta pasteurizadora tradicional por una que utilice ozono en el proceso.

En conclusión, los resultados microbiológicos demostraron que la acción del O_3 aplicado directamente por agitación, fue efectiva para reducir la carga bacteriana inicial de la leche cruda. La dosis de 100 mg O_3 /L durante 30 minutos, permite una reducción del 64,87% (2.53 Log^{10} UFC/mL) del conteo inicial de mesófilos aerobios totales, una reducción del 100% (3.68 Log^{10} UFC/mL) para coliformes totales y una reducción del 100% (3.67 Log^{10} UFC/mL) para *Escherichia coli*. No se observaron cambios en los parámetros físico-químicos de la leche, manteniendo sus características acordes a la normativa nacional.

Conflictos de interés

Ninguno declarado por los autores.

Contribución de los Autores

MIB, PE y JM: diseño del modelo experimental y metodología de la investigación.

AS, MIB, PE, JLM y JM: redacción del manuscrito.

JM y AS: aplicación de tratamientos de ozono a la leche.

AS y MIB: cuantificación microbiológica de las muestras de leche.

BP y AS: análisis físico-químicos de las muestras de leche.

JLM: análisis estadísticos de los datos obtenidos.

Financiamiento

Fondos de Proyectos Semilla, Universidad Central del Ecuador.

Agradecimiento

Al Laboratorio de Bacteriología y Micología y Laboratorio de Industrias Lácteas, pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador.

Disponibilidad de datos

Los datos de esta investigación están disponibles mediante solicitud al autor de correspondencia.

Referencias

1. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), FEPALE (Federación Panamericana de Lechería). situación de la lechería en América Latina y el Caribe en 2011 [Internet]. Chile: Observatorio de la Cadena Lechera. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, División de Producción y Sanidad Animal. 2012:16-17 p. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/Paper_Lechería_AmLatina_2011.pdf
2. AGSO (Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente). La AGSO firmó convenio para producción de leche [Internet]. El Telégrafo. 2017 [cited 2017 Sep 13]. Disponible en: <http://tinyurl.com/ybubx3og>

3. Freire WB, Ramírez-Luzuriaga MJ, Belmont P, Mendieta MJ, Silva-Jaramillo K, Romero N, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de la población ecuatoriana de 0 a 59 años [Internet]. Quito: ENSANUT- ECU 2012. Ministerio de Salud Pública/Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. 2014. 314 p. Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/MSP_ESANUT-ECU_06-10-2014
4. Estrada M, editor. El libro blanco de la leche. 1ed. México: Camara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC); 2011.
5. Dahmer AM, Sauer L, Neto Figueredo L, García Barcajia A, Avi I, Grosso M. Gestão da qualidade na indústria exportadora de abate Mato Grosso Do Sul. No: XXVI Encontro Nac Eng Produção; 2006 Outubro 9 -11; Fortaleza, Brasil. Brasil: ENEGEP 2007:1-9.
6. Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. Leche cruda. Requisitos. NTE INEN 9:2015 [Internet]. Ecuador: INEN; 2015. Disponible en: <http://apps.normalizacion.gob.ec/download>
7. Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. Leche pasteurizada. Requisitos. NTE INEN 10:2012 [Internet]. Ecuador: INEN; 2012. Disponible en: <http://apps.normalizacion.gob.ec/download>
8. World Health Organization WHO. Inocuidad de los alimentos [Internet]. OMS; 2016 Disponible en: http://www.who.int/topics/food_safety/es/
9. Perry JJ, Yousef AE. Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011;10:2(1):281-98.
10. Sun DW. Emerging technologies for food processing. Second ed. San Diego: Elsevier; 2014.
11. Cavalcante MA, Leite Júnior BRC, Tribst AAL, Cristianini M. Improvement of the raw milk microbiological quality by ozone treatment. *Int Food Res J*. 2013; 20(4):2017-21.
12. Patil S, Bourke P, Frias JM, Tiwari BK, Cullen PJ. Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. *Innov Food Sci Emerg*. 2009;10(4):551-7.
13. Ligimol J, Puniya AK, Mishra V, Singh K. Ozone: A potent disinfectant for application in food industry - an overview. *J Sci Ind Res*. 2002;61:504-9.
14. Al-Haddad KSH, Al-Qassem RAS, Robinson RK. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. *Food Control*. 2005;16(5):405-10.
15. Karaca H, Walse SS, Smilanick JL. Effect of continuous 0.3µL/L gaseous ozone exposure on fungicide residues on table grape berries. *Postharvest Biol Technol*. 2012;64:154-9.
16. Selma MV, Ibáñez AM, Cantwell M, Suslow T. Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. *Food Microbiol*. 2008;25(4):558-65.
17. Varese C, Márquez L, Pretell C. Ozono gaseoso en la conservación de las características de calidad en arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.). *Pueblo Cont*. 2015;26(2):405-18.
18. Öztekin S, Zorlugenç B, Zorlugenç FK. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *J Food Eng*. 2006;75:396-9.
19. Valdiviezo B, Pretell C, Márquez L. Efecto de la concentración de ozono gaseoso sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y apariencia general en uva (*Vitis vinifera* L.) variedad red globe. *Agroindustrial Sci*. 2016;6(1):7-15.
20. Alexandre EMC, Santos-Pedro DM, Brandão TRS, Silva CLM. Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress. *J Food Eng*. 2011;105(2):277-82.
21. Sugawara E, Nikaido H. Properties of AdeABC and AdelJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7250-7.
22. Sarriá Ruiz B. Efectos del tratamiento térmico de fórmulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1988.
23. Romero S, Mestres J. Productos lácteos: tecnología [Internet]. Cataluña: Ediciones UPC; 2004. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2099.3/36810>
24. Grappin R, Beuquier E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int Dairy J*. 1997; 7(12):751-61.
25. Miralles B. Detección de caseinato y suero en leche y productos lácteos mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectroscópicas [Tesis]. Universidad Complutense de Madrid; 2001.
26. Ortigosa M, Torre P, Izco JM. Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of roncal cheese. *J Dairy Sci*. 2001;84(6):1320-30.
27. Fox PF, McSweeney PLH. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev Int*. 1996;12(4):457-509.
28. Imm JY, Oh EJ, Han KS, Oh S, Park YW, Kim SH. Functionality and physico-chemical characteristics of bovine and caprine mozzarella cheeses during refrigerated storage. *J Dairy Sci*. 2003;86(9):2790-8.

29. Mehta BM, Kamal-Eldin A, Iwanski RZ, editors. Fermentation: effects on food properties. USA: CRC Press; 2012.
30. Brodowska AJ, Nowak A, Śmigielski K. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(13):2176-201.
31. Sheelamary M, Muthukumar M. Effectiveness of ozone in inactivating *Listeria monocytogenes* from milk samples. *World J Young Researcher*. 2011;1(3):40-44.
32. Rice RG, Graham DM. US FDA regulatory approval of ozone as an antimicrobial agent – what is allowed and what needs to be understood. *Ozon News* 2001;29(5):22-31. Disponible en: <http://www.technozone.in/img/pdf/FDA-e.pdf>
33. Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. Leche: Determinación de la acidez titulable. NTE INEN 13:1984 [Internet]. Ecuador: INEN; 1984. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.0013.1984>
34. Sung HJ, Song WJ, Kim KP, Ryu S, Kang DH. Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *Int J Food Microbiol*. 2014;171:147-53.
35. AOAC International. Coliform and *Escherichia coli* counts in foods. In: Latimer G, editor. Official methods of analysis of AOAC International. 6th ed. USA: Official method 991.14; 2002.
36. AOAC International. Aerobic plate count in foods. In: Latimer G, editor. Official methods of analysis of AOAC International. 6th ed. USA: Official Method 990.12; 2002.
37. Lenati R. Environmental non-enrichment rapid *Listeria* test. Canada: 3M (Minnesota Mining and Manufacturing Company); 2009:10. Disponible en <https://www.cmc-cvc.com/sites/default/files/files>
38. Bird P, Flannery J, Crowley E, Agin J, Goins D, Jechorek R. Evaluation of the 3MTM Petrifilm™ *Salmonella* express system for the detection of *Salmonella* species in selected foods: collaborative study. *J AOAC Int*. 2014;97(6):1563-75.
39. Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. Leche. Determinación de la densidad relativa NTE INEN 11:1984 [Internet]. Ecuador: INEN; 1984. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.0011.1984>
40. Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. Leche. Determinación del contenido de grasa (IDT) NTE INEN-ISO 2446:2013 [Internet]. Ecuador: INEN; 2013. Disponible en: http://181.112.149.204/buzon/normas/nte_inen_iso_2446
41. Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN. Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas NTE INEN 14:1984 [Internet]. Ecuador: INEN; 1984. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.0014.1984>
42. European Commission EC. Microbiological criteria for foodstuffs No 2073/2005 [Internet]. Brussels: Official Journal of the European Union; 2005. Disponible en: https://www.fsai.ie/legislation/food_legislation/hygiene_of_foodstuffs/microbiological_criteria.html
43. Yeoh WK, Ali A, Forney CF. Effects of ozone on major antioxidants and microbial populations of fresh-cut papaya. *Postharvest Biol Technol*. 2014; 89:56–8.
44. Marwaha S, Awasthi V, Ganguly S, Agarwal A, Dua A, Garg V. Microbiological profile of milk: impact of household practices. *Indian J Public Health* 2012;56(1):88-94.
45. Tekinsen KK, Elmali M, Ulukanli Z. Microbiological quality of UHT milk consumed in Turkey. *Internet J Food Safety*. 2007;7:45-8.