



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos lácteos

Alumna: Manuela Isabel Sánchez Serrano

Julio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis Microbiológico de Productos Lácteos

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Manuela" o algo similar, con una línea horizontal que la atraviesa.

Alumna: Manuela Isabel Sánchez Serrano

Julio, 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1. ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Leche	3
2.2. Queso	4
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. Medios de cultivo	10
4.1.1. Agar triptona de soja	11
4.1.2. Agar de Man, Rogosa y Sharpe	11
4.1.3. Agar ácido kanamicina esculina	12
4.1.4. Agar eosina-azul de metileno	13
4.1.5. Agar Vogel-Johnson	13
4.2. Recuentos en placa	14
4.3. Tinción de Gram	15
4.4. Prueba de la catalasa	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Alimentos líquidos	26
5.2. Alimentos sólidos	30
5.3. Recuento total en placa	41
6. CONCLUSIÓN	44
7. BIBLIOGRAFÍA	46

1. RESUMEN

En la leche y los productos lácteos existe una determinada microbiota bacteriana debido a que son productos de origen animal, y en los productos fermentados, además, debido a su elaboración. Esta presencia bacteriana puede ser beneficiosa o alterante en función de las bacterias presentes; algunas son características de estos productos y otras se deben a la contaminación en algún momento de la línea de fabricación o a una contaminación posterior a ella. En la industria alimentaria es importante estudiar el proceso de elaboración de los productos y las posibles contaminaciones que en este pueden tener lugar ya que algunas bacterias pueden ser la causa de enfermedades transmitidas por los alimentos. Es por ello que durante el proceso existen diferentes protocolos de control y, una vez elaborado, el producto es sometido a un control de calidad. La industria alimentaria realiza exámenes para el aislamiento e identificación de las bacterias presentes en los alimentos y con ello determinan si los alimentos son seguros para el consumo humano.

Palabras clave: leche, queso, enfermedades transmitidas por los alimentos, aislamiento, identificación, contaminación.

1.1. ABSTRACT

In milk and in dairy products exist a certain bacterial microbiota because they are products of animal origin, and in fermented products, also, due to its elaboration. This bacterial presence can be beneficial or altering depending on the bacteria present; some bacteria are characteristic of these products and others are due to contamination at some point in the manufacture line or to contamination after processing. In the food industry is important study the process of elaboration of the products and the possible contaminations that can take place because these bacteria can be the cause of diseases transmitted by food. That is why during the process there are different protocols of control and, once elaborated, the product is subjected to a quality control. The food industry carries out tests for the isolation and identification of bacteria present in food and thereby determines whether food is safe for consumption.

Key words: milk, cheese, illnesses food borne, isolation, identification, contamination.

2. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son seres vivos o sistemas biológicos que solo pueden ser apreciados por el ojo humano a través de un microscopio. Están dotados de propiedades individuales, con organización biológica elemental y en su mayoría son de tipo unicelular (Drider & Rivera, 2016). Son microorganismos ubicuos y se adaptan a condiciones de temperatura extremas, desarrollándose en un amplio rango de ambientes; además, sobreviven a concentraciones de productos dañinos que serían fatales para otras formas de vida. Esta adaptabilidad, causa con frecuencia problemas en la industria alimentaria. (Forsythe & Hayes, 2007).

Las principales formas bacterianas son: esférica (cocos), bastón (bacilos) y curvada; los cocobacilos son una morfología bacteriana incluida dentro de la bacilar. Miden de 1 a 3 μm de largo por 0,41 a 1 μm de ancho, aunque también las hay de tamaños superiores e inferiores. Se reproducen a través de un proceso de fisión binaria, que consiste en una simple división de una célula madre en dos células hijas y, en función de cómo se lleve a cabo esta, se originan diferentes agrupaciones. En el caso de los cocos se pueden agrupar de forma característica, por ejemplo formando racimos o cadenas. Sin embargo, los bacilos, debido a su naturaleza no tienen tanta variedad, de hecho se separan al dividirse, por lo que se pueden encontrar incluso como células únicas y aisladas. Por ejemplo, en los cocos hay disposiciones características de determinados géneros, lo que es útil para su identificación (Forsythe & Hayes, 2007).

Los alimentos de origen animal y vegetal presentan una microbiota particular en función de su origen (endógena), es decir, no son alimentos libres de microorganismos a no ser que se sometan a un proceso con tal objetivo. Concretamente, la leche y el queso, al ser alimentos de origen animal, presentan una microbiota endógena determinada por la flora propia del animal del que procedan, cabras, ovejas o vacas. En el caso del queso, también influye el proceso de fermentación y de maduración, si lo hubiera. Los productos alimentarios constituyen un ambiente excelente para el crecimiento de microorganismos, incluyendo los patógenos, de forma que se pueden provocar enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) (Fonberg-Broczek et al., 2005). Por tanto, se deben enfriar rápidamente, para así evitar el crecimiento de los microorganismos presentes (Forsythe & Hayes, 2007).

Así, la presencia de microorganismos puede ser deseable en el caso de aquellos microorganismos que llevan a cabo los procesos de fermentación (que dan lugar a una gran cantidad de alimentos) y los probióticos. También puede no ser deseable al ser indicadores de contaminación, siendo inseguros para el consumo, o pueden producir alteración en el producto final (Karimi, Mortazavian y Amiri-Rigi, 2012; Van de Castele et al., 2006; Yousef & Carlstrom, 2006).

2.1. LECHE

La leche se define como una secreción natural de la glándula mamaria de los animales mamíferos obtenida a partir del ordeño de animales domésticos (cabra, oveja y vaca), aunque la de consumo habitual es la proveniente de las vacas (Pascual & Calderón, 2000). Se entiende por **leche natural** el producto íntegro (sin alterar, adulterar y sin calostros) del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y bien alimentadas (Decreto 2478/1966, de 6 de octubre; B.O.E. 7-10-66). La leche natural es aquella que no se ha sometido a ningún proceso que elimine parte de la microbiota presente. Aquí se incluyen los posibles microorganismos patógenos, los que intervendrán en el proceso de fermentación e incluso los probióticos. Debido a lo enunciado anteriormente, no se recomienda el consumo directo de leche natural, o cruda, porque supone un riesgo para la salud. Si se utiliza la leche natural para la elaboración de queso es diferente, porque durante la fermentación y maduración (si la hubiera) tienen lugar cambios en la microbiota y en las características del alimento (Moreno & Alarcón, 2010). El tratamiento térmico de la leche destinada a la elaboración de queso es una garantía de higiene pero hay quienes piensan que en el calentamiento se elimina determinada microflora láctea responsable de características finales del queso (sabor y textura especiales) y que no se podrían elaborar algunas variedades (Pascual & Calderón, 2000).

La microbiota presente en los alimentos varía en función de las propiedades del propio alimento y el procesado al que se le someta. En su caso, el procesado disminuye la cantidad de microorganismos presente en el alimento. Por su parte, la fermentación aumenta la cantidad por la adición de microorganismos necesarios para que se produzca la reacción de fermentación (Yousef & Carlstrom, 2006).

La leche para consumo habitualmente es sometida a un proceso de pasteurización, en el cual se produce la disminución de los microorganismos presentes a través del calor. La **pasteurización**, como proceso destructor de bacterias alterantes (salvo aquellas termorresistentes) aumenta la capacidad de conservación de la leche (Forsythe & Hayes, 2007). El procesamiento habitual que recibe la leche es el térmico, que varía en función de la temperatura y el tiempo de aplicación. La pasteurización puede ser: **alta** (aplicación de 72°C durante 15 segundos), **baja** (aplicación de 62°C durante 30 minutos) o de temperatura ultra alta (**UHT**) (sometiéndose la leche a 132°C en un segundo y consiguiendo la eliminación de todos los microorganismos presentes en ella, es decir, esta leche es aséptica (Pascual & Calderón, 2000). Por lo tanto, se entiende por **leche pasteurizada** toda leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida a un proceso tecnológico adecuado que asegure la destrucción de los gérmenes patógenos y la casi totalidad de la flora banal, sin modificación sensible de su naturaleza físico-química, características biológicas y cualidades nutritivas. Se entiende por **leche UHT**, toda leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida a un proceso de calentamiento en condiciones determinadas de temperatura y tiempo que aseguran la destrucción de los microorganismos y la inactividad de sus formas de resistencia, siendo envasada posteriormente en condiciones asépticas. Se entiende por **leche esterilizada** toda leche natural, entera, desnatada o semidesnatada, sometida (tras su envasado) a un proceso de calentamiento en unas condiciones determinadas de temperatura y tiempo que aseguran la destrucción de los microorganismos y la inactividad de sus formas de resistencia (Orden de 11 de febrero de 1987; B.O.E. 20-2-87).

La alta presión es una alternativa al procesamiento térmico, ya que la resistencia que los microorganismos presentan a esta depende de la presión aplicada, la temperatura, el tiempo de aplicación y la propia naturaleza de los microorganismos presentes (Fonberg-Broczek et al., 1999).

2.2. QUESO

Se entiende por queso el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, **obtenido** por la separación del suero tras la coagulación de la **leche** natural, de la desnatada (total o parcialmente), de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de

algunos o de todos estos productos por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa. Obtenido mediante técnicas de elaboración que comprendan la coagulación de la leche y/o de materias obtenidas de ella, que presenten un producto final con las mismas características del producto definido siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche (Orden de 29 de noviembre de 1987; B.O.E. 6-12-85).

Hace siglos que se practica la **fermentación** de alimentos con el objetivo de hacer lo más perecedero. Tradicionalmente, la fermentación se ha llevado a cabo añadiendo al alimento a fermentar cierta cantidad de un alimento producido anteriormente, es decir, ya fermentado. A este proceso se le denomina reinoculación o "back slopping" (Bamforth, 2005). El alimento ya fermentado contiene determinadas bacterias capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación. En el sudeste europeo aún hay producción tradicional del queso, se realiza a pequeña escala a través del proceso de reinoculación (Wouters et al., 2002).

Sin embargo, a día de hoy, la elaboración de un gran porcentaje de alimentos fermentados está industrializada. El proceso de reinoculación no es viable por la necesidad de un dilatado periodo de tiempo para su ejecución. De esta forma se han establecido unas ciertas cepas bacterianas para llevar a cabo las distintas etapas de la fermentación. Ya no es necesaria la adición de alimento fermentado, sino que existen cultivos continuos de las bacterias necesarias, añadidas posteriormente según la etapa de elaboración del producto. Es desde 1980 que se tiene acceso a cultivos aislados de **bacterias ácido lácticas** (en adelante, BAL) (Bamforth, 2005). Las industrias lácteas utilizan como **cultivos iniciadores** estas bacterias, las cuales llevan a cabo una **acidificación** rápida de la leche (Wouters et al., 2002). Las BAL son responsables, y esenciales, de la fermentación para la elaboración de productos lácteos, embutidos y encurtidos. (Dridr & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). En la industria láctea, las bacterias iniciadoras se dividen en dos grupos: iniciadores definidos y no definidos. De forma que los cultivos iniciadores están constituidos por una mezcla compleja de cepas bacterianas dando lugar a una población equilibrada que aportará las propiedades deseadas en la producción del queso; la composición del queso variará en función de las condiciones de cultivo durante su elaboración (Wouters et al., 2002).

Las **BAL** constituyen un conjunto heterogéneo de bacterias porque comparten ciertas características fenotípicas: son bacterias grampositivas, no forman esporas,

carecen de citocromos y otros compuestos de tipo hemo, son catalasa negativa, microaerófilas o anaerobias aerotolerantes, metabolizan carbohidratos por diferentes rutas fermentativas, la mayoría son ácido tolerantes y algunas toleran la sal en el medio de crecimiento. Son bacterias que para su desarrollo requieren de medios ricos en nutrientes. Presentan diferentes morfologías y la mayoría son mesófilas. Estas bacterias producen ácido láctico en la fermentación lo que provoca una reducción del pH, acidificando el medio; este se volverá más hostil para el crecimiento de otros microorganismos, patógenos y alterantes. Además, controlan el crecimiento de ciertos patógenos por la liberación de determinados péptidos antimicrobianos (las bacteriocinas) y por la competición con la microbiota contaminante por el medio: las BAL **aumentan la seguridad del alimento** (Yousef & Carlstrom, 2006). Al menos diez géneros de bacterias grampositivas se consideran BAL pero los **principales géneros** son: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus* (Bamforth, 2005; Drider & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006).

Normalmente es la leche de vaca la utilizada para la elaboración de queso aunque a partir de cualquier leche se puede elaborar el queso. Sin embargo, en función de el queso deseado se procesará la leche de una determinada manera porque cada tipo de queso posee particularidades en su elaboración y en la utilización de determinadas bacterias (Bamforth, 2005). Es decir, a partir de una misma leche se pueden obtener diferentes variedades de queso variando los microorganismos, enzimas y sal adicionados y cambiando la temperatura en los procesos de elaboración y maduración (Forsythe & Hayes, 2007). Dependiendo del queso deseado, la leche se puede tratar de un modo u otro, atendiendo a los tratamientos de calentamiento (pasteurización), reducción de grasas, concentración, clarificación y/u homogeneización. La función que cumple la clarificación es la de optimizar la aparición de los "ojos" del queso, importante en el queso Gouda o los veteados en el queso azul. También se puede adicionar cloruro cálcico, enzimas o microorganismos, en esta última opción planteada encontramos varios ejemplos como el del queso azul, al que se le adiciona *Penicillium roqueforti* (Bamforth, 2005). Actualmente se emplea, de manera general, leche pasteurizada, como consecuencia de ello la maduración del queso ocurre más lentamente porque la flora natural ha sido destruida en gran medida durante la pasteurización. Es por ello que deben adicionarse a la leche cultivos bacterianos (Forsythe & Hayes, 2007).

La elaboración del queso incluye, en líneas generales, diferentes etapas: pasteurización de la leche, cultivo de la leche con BAL, coagulación de la leche, eliminación del suero, tratamiento de la cuajada, producción del queso procesado y la maduración del queso (Bamforth, 2005). Se entiende por **queso fresco** aquel dispuesto para el consumo tras la finalización del proceso de fabricación. Sin embargo el **queso curado** o madurado es el que, tras el proceso de elaboración, necesita mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en condiciones tales que se produzcan los cambios físicos y/o químicos necesarios y característicos del mismo. (Orden de 29 de noviembre de 1985; B.O.E. 6-12-85)

Partiendo de que en este estudio la importancia de todo el proceso reside en la presencia de bacterias, hay que destacar que tras la pasteurización (debido a la eliminación de microbiota láctea) se produce la adición de bacterias que lleven a cabo el proceso de acidificación. Estas son denominadas **cultivos iniciadores** e incluyen a las BAL; son seleccionadas aquellas cepas que tienen habilidad para generar ácido láctico a diferentes temperaturas, capacidad de producir dióxido de carbono y diacetilo, los cuales son importantes para la apariencia y sabor del queso. Además, el diacetilo actúa como agente microbiano junto con otros compuestos generados por las bacterias lácticas, igual que las bacteriocinas mencionadas con anterioridad. La cantidad de BAL adicionadas en el proceso de elaboración debe ser regulada para asegurar la eficiencia del propio proceso y la consistencia del producto. Después de la eliminación del suero se produce la adición de más microorganismos al proceso además de los cultivos iniciadores, reciben el nombre de **bacterias lácticas no iniciadoras**. En esta flora adicionada se incluyen bacterias esenciales para producir los sabores característicos de los quesos tradicionales, junto con otros microorganismos (Bamforth, 2005; Wouters et al., 2002). Como es de esperar, durante las primeras etapas de la fabricación del queso la concentración de microorganismos presentes es elevada, pudiendo alcanzar 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de queso; sin embargo, durante la maduración la concentración disminuye por debajo de 10^7 UFC/g porque el ambiente no es tan propicio para su crecimiento (Shakeel-Ur-Rehman et al., 2000).

Los alimentos pueden sufrir alteraciones por mecanismos de descomposición natural, por contaminación de microorganismos (ajenos al proceso de fabricación de los alimentos) o por prácticas culinarias erróneas (Moreno y Alarcón, 2010). La higiene alimentaria se define como un conjunto de condiciones y medidas

necesarias para garantizar la inocuidad necesaria de los alimentos y el mantenimiento de las cualidades que son propias del alimento, especialmente el contenido nutricional. Estas condiciones deben estar presentes en todas las etapas de la elaboración de los alimentos: producción, almacenamiento, transformación, transporte, conservación y preparación de los alimentos (Moreno & Alarcón, 2010). Las bacterias que se encuentran involucradas en ETA generalmente se corresponden a las especies: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* o a los géneros *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella* (Vinderola & Reinheimer, (2003).

Debido a que el proceso de elaboración incluye equipamiento mecánico y personal humano, existe un riesgo de contaminación de los alimentos que va desde la propia recogida de la leche hasta el suministro en tienda. La calidad y la vida útil de los productos alimentarios dependen en gran medida de las propiedades de los microorganismos que contaminan los alimentos (Fonberg-Broczek et al., 2005). En la cadena de producción de los alimentos existen riesgos de infección por patógenos, por lo tanto, es necesario un control microbiológico estricto que impida que los alimentos contaminados lleguen a ser consumidos (Ruíz et al., 2017). Es por ello que en 1963 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO) establecieron una Comisión Internacional denominada **Codex Alimentarius**. El objetivo de la comisión es proteger a los consumidores, promover prácticas claras de comercio entre países y coordinar las normas alimentarias acordadas.

Existen diferentes programas que tienen como objetivo eliminar los peligros del consumo de alimentos y reducir así el número de brotes de toxiinfecciones, como es el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (*Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP*); asegurar la calidad de las materias primas y productos finales y de todo el proceso de elaboración, como es el caso de los Controles de Calidad y el Aseguramiento de la Calidad.

El presente estudio se centra en el análisis microbiológico de productos lácteos para determinar las bacterias presentes y, por lo tanto, determinar, en cuanto a la calidad se refiere, de la presencia de bacterias contaminantes o no, a través de una identificación presuntiva. Los alimentos fueron obtenidos en puntos de compra (a excepción de la leche de cabra), lo que implica que son alimentos listos para

consumo y no queda ningún procesado pendiente a realizar en él; son alimentos que no necesitan ser cocinados.

3. Objetivos

El objetivo de este estudio es analizar microbiológicamente diferentes productos lácteos, examinando alimentos con diferente grado de pasteurización y de maduración.

Para ello era necesario determinar las bacterias presentes en las muestras, por lo que se realizó un proceso de recuento en placa y una identificación, presuntiva, de las bacterias aisladas. Finalmente, se pretendía determinar si las muestras, listas para consumo, se encontraban contaminadas por bacterias que pudieran causar una enfermedad transmitida por los alimentos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se seleccionaron diez productos lácteos; tres de tipo líquido (leche) y siete de tipo sólido (queso). Los alimentos proceden de cabra, oveja y vaca; los alimentos líquidos utilizados tienen diferente grado de pasteurización y los sólidos, diferente maduración. Las tres muestras de leche analizadas son: leche de cabra natural (sin pasteurizar), leche de vaca fresca entera sometida a alta pasteurización y leche de cabra UHT. Por otro lado, de las muestras de quesos no se sabe el tratamiento que se le dio a la leche para su elaboración. Los diferentes quesos fueron: queso azul, queso de cabra, queso de oveja curado, queso de oveja semicurado, queso de vaca fresco, queso de vaca graso (alta curación) y queso de vaca semicurado. Se analizaron quesos procedentes de los tres animales domésticos posibles y con diferentes grados de maduración para observar las diferencias, si las hubiera.

Al ser los alimentos de diferente naturaleza, el procesamiento de las muestras (previo a la siembra en los medios de cultivo) es diferente en cada caso. Los alimentos sólidos deben ser sometidos a trituración y homogeneización previa a la siembra; para ello se tomó 5 g del alimento incluyendo la corteza del queso y se añadieron en 45 ml de solución salina al 0,9% estéril, el diluyente permite la obtención de una suspensión del alimento. Se homogeneizó en un triturador de paletas, el Stomacher^R 80

Biomaster, Seward Ltd., el movimiento de las paletas dilacera el alimento y pone en suspensión las bacterias contenidas en este (Pascual y Calderón, 2000). Sin embargo, en los alimentos de tipo líquido no es necesario el triturado, se tomó 5 ml del alimento y se añadieron en 45 ml de solución salina al 0,9% estéril. Este diluyente fue el utilizado durante todo el proceso.

Las soluciones, anteriormente explicadas, se denominaron soluciones madre y fue a partir de ellas de las que se obtuvieron diluciones decimales hasta la dilución -4. Todas ellas se utilizaron en el medio de cultivo general, debido a que la carga bacteriana a crecer es superior; en los medios de cultivo selectivos solo se utilizaron las diluciones 0 y -1. La preparación de diluciones decimales se realizó tomando una parte de la muestra de alimento con nueve partes del diluyente, solución salina al 0,9% estéril (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). Para realizar estas diluciones se tomó 0,1 ml de la solución madre y se añadían 0,9 ml de la solución salina al 0,9% y se mezclaba durante 30 segundos, consiguiendo así la dilución -1. El objetivo de estas diluciones decimales es disminuir la posible carga microbiana, de forma que sea viable el recuento en placa, debido a que la carga microbiana disminuye cuanto más diluida esté la muestra. En cada placa, indistintamente del medio de cultivo, se sembró 0,1 ml de las diluciones; para medio TSA había cuatro placas de Petri (-1, -2, -3 y -4) correspondientes a las diluciones utilizadas y en los otros medios, dos placas de Petri debido a que solo se utilizaron dos diluciones.

4.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos investigados y agentes que permiten la selección y diferenciación de determinados microorganismos. El medio que se utiliza en los análisis microbiológicos debe estar estéril para asegurar una correcta interpretación de los resultados (Yousef & Carlstrom, 2006). Para el aislamiento de microorganismos de los alimentos seleccionados se utilizaron cinco medios de cultivo procedentes de Scharlau y PanReac AppliChem. Los medios se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante y se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez los medios fueron esterilizados y atemperados a 50°C aproximadamente, se vertieron en placas de Petri, aproximadamente 15 ml de medio

en cada placa de Petri; estas se esterilizaron de nuevo en el autoclave, previo a su uso. En estos cinco medios había un medio general, el cual aseguraba el crecimiento bacteriano, y cuatro selectivos, que permitieron diferenciar el tipo de bacterias que encontraríamos.

En microbiología de los alimentos se utilizan normalmente diversas temperaturas de incubación. La mayoría de los métodos de detección y recuento establecen la temperatura de incubación mesófila de 35°C aunque las comprendidas en el intervalo 32-37°C pueden ofrecer resultados satisfactorios (Yousef & Carlstrom, 2006). La incubación se llevó a cabo a dos temperaturas, en dos estufas diferentes; los medios TSA, KAA, EMB y VJ se incubaron a 37°C y el medio MRS a 30°C, debido a que las bacterias ácido lácticas tienen su temperatura óptima de crecimiento en ese rango. Por lo tanto, las bacterias que se aislaron en el estudio son bacterias mesofílicas. La incubación fue de 24-48 horas. La incubación se llevó a cabo en condiciones aerobias, por lo que los resultados obtenidos en el estudio están condicionados a este factor, pues aquellas bacterias que anaerobias obligadas no crecerán ni se manifestarán.

4.1.1. Agar triptona de soja (TSA)

Se trata de un medio general que permite el cultivo y mantenimiento de una amplia variedad de microorganismos. Su composición es la siguiente:

Peptona de Soja	5 g/l
Peptona de caseína*	15 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,3 ± 0,2

Para la preparación de un litro de medio de cultivo se añaden 40 g a 1 litro de agua destilada. (*) Se trata de triptona, es un digerido de caseína con jugo pancreático (Yousef & Carlstrom, 2006).

4.1.2. Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS Agar)

En concreto, es el medio de cultivo selectivo de *Lactobacillus*. Debido a su contenido en Tween 80 y acetato de sodio es un medio particularmente selectivo para

Lactobacillus, aunque permite el crecimiento de prácticamente todas las bacterias ácido lácticas (Yousef & Carlstrom, 2006). Su composición es la siguiente:

Hidrogeno citrato de di-amonio	2 g/l
Extracto de carne	8 g/l
Extracto de levadura	4 g/l
D+ glucosa	20 g/l
Sulfato de magnesio	0,2 g/l
Sulfato de manganeso(II)	0,05 g/l
Peptona bacteriológica	10 g/l
Hidrogenofosfato de di-potasio	2 g/l
Acetato de sodio	5 g/l
Tween 80	1 g/l
Agar	10 g/l
pH	6,2 ± 0,2

Para la preparación de un litro de medio se añaden 62 g a 1 litro de agua destilada.

4.1.3. Agar ácido kanamicina esculina (KAA)

Se trata de un medio selectivo para *Streptococcus* y confirmativo para el aislamiento de los del grupo D de Lancefield (*Enterococcus*). También contiene esculina, el ennegrecimiento o no del medio aporta información acerca de la hidrólisis o no del compuesto (Pascual & Calderón, 2000). Su composición es la siguiente:

Tryptona	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l
Citrato de di-sodio	1 g/l
Esculina	1 g/l
Citrato de hierro y amonio	0,50 g/l
Azida de sodio	0,15 g/l
Sulfato de kanamicina	5 g/l
Agar	15 g/l
pH	7,0 ± 0,2

Para la preparación de un litro de medio de cultivo se añaden 43 g a 1 litro de agua destilada.

4.1.4. Agar eosina-azul de metileno (EMB)

Es un medio de cultivo para el aislamiento y diferenciación de *Enterococcus* o coliformes. Los colorantes que incluye el medio son agentes selectivos, aunque pueden crecer microorganismos grampositivos en colonias puntiformes; al contener lactosa en su composición permite la diferenciación de colonias fermentadoras o no de lactosa (Yousef & Carlstrom, 2006). Su composición es la siguiente:

Eosina amarillenta	0,4 g/l
Azul de metileno	0,065 g/l
Lactosa	5 g/l
Peptona bacteriológica	10 g/l
Hidrogenofosfato de di-potasio	2 g/l
Sacarosa	5 g/l
Agar	13,5 g/l
pH	7,2 ± 0,2

Para la preparación de un litro de medio se añaden 36 g a 1 litro de agua destilada.

4.1.5. Agar Vogel-Johnson (VJ)

Es un medio de alta selectividad para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus*. La presencia de glicina, cloruro de litio y telurito potásico inhiben el crecimiento de bacterias gramnegativas; la presencia en el medio de manitol y de rojo fenol, el indicador de pH, permiten que el viraje del medio o no también aporta información acerca de la fermentación de manitol (Yousef & Carlstrom, 2006). En su composición también se incluye el telurito potásico, por lo que su reducción o no también aportará información sobre la bacteria (Pascual & Calderón, 2000). Su composición es la siguiente:

Peptona caseína	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Manitol	10 g/l
Fosfato di-potasio	5 g/l
Cloruro de litio	5 g/l
Glicina	10 g/l
Rojo fenol	0,025 g/l

Agar	15 g/l
pH	7,2 ± 0,2

Para la preparación de un litro de medio se añaden 60 g a 1 litro de agua destilada. Es necesaria la adición al medio de telurito potásico al 1%, se añaden 20 ml.

4.2. RECIENTOS EN PLACA

La calidad microbiológica puede estimarse en términos generales mediante el análisis microbiológico de recuento total en placa (en adelante, RTP). Consiste en cuantificar la cantidad de unidades formadoras de colonias presentes en el medio de cultivo y extrapolar los datos a la muestra. El hecho de que el RTP sea elevado o bajo no determina la calidad del alimento obligatoriamente, sino que hay que atender a la naturaleza del alimento. Por ejemplo en algunos alimentos un RTP elevado indica una calidad pobre, en los alimentos fermentados hay de forma natural una carga microbiana elevada, por lo que el RTP no se utiliza como medio de evaluación de su calidad microbiológica general (Yousef & Carlstrom, 2006).

El recuento en placa muestra una estima de la flora total del alimento, pero sin especificar el tipo de bacteria. El RTP se obtiene de la siguiente forma: el número total de colonias contadas multiplicado por el factor de dilución de la placa elegida y dividido por el volumen sembrado da como resultado el recuento total de bacterias por gramo o mililitro, dependiendo del alimento utilizado (Pascual & Calderón, 2000). En el caso de los alimentos sólidos es necesaria una conversión, pues se toma una fracción del alimento y se diluye y, posteriormente, se realizó las diluciones, es decir, se tomó la dilución madre como punto de partida para realizar las diluciones.

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de la muestra}}$$

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de la muestra}} \times \text{factor de conversión}$$

El RTP se lleva a cabo en aquellas placas donde se pueden contar 30-300 colonias, debido a que aporta resultados más fiables que aquellas con un recuento inferior. El examen de morfología de las colonias y de las células es un paso preliminar esencial para la identificación de las colonias aisladas a partir de los alimentos (Yousef & Carlstrom, 2006). La siembra en superficie permite una mejor visualización de las colonias bacterianas formadas en el medio de cultivo, lo que permite un examen

visual más fácil y el RTP; para ello se añadió 0,1 ml de las diluciones, previamente preparadas, a los medios de cultivo y se extendieron con ayuda de un asa de Drigalsky aséptica, de esta forma la siembra en placa es uniforme.

Tanto el proceso de triturado y homogeneizado como el de siembra y aislamiento de las bacterias se llevó a cabo en condiciones asépticas bajo la llama del mechero Bunsen, para tener en cuenta solo aquellas bacterias presentes en las muestras de alimentos.

4.3. TINCIÓN DE GRAM

A partir de los cultivos realizados, se realizó el aislamiento de las colonias presentes a partir de un asa de siembra con torunda y se les realizó la técnica de tinción específica de Gram, de esta forma se obtiene información de gran importancia para la identificación de la bacteria. Esta técnica aporta información sobre la morfología bacteriana y las divide en función del colorante con el que se tiñan.

Se realiza la extensión de las bacterias en una gota de agua sobre un portaobjetos, se fijan por el calor suave, una vez fijadas se procede a la tinción. Se tiñe con cristal violeta (colorante básico), a continuación se trata la extensión con solución de yodo (lugol) que facilita la entrada del colorante básico en la bacteria y, posteriormente, después se decolora con alcohol para eliminar el sobrante de colorante que no ha penetrado en las bacterias. Las bacterias grampositivas retienen el cristal violeta, mientras que las gramnegativas se decoloran. Después, se tiñe con colorante de contraste (se utilizó safranina) a la extensión. Con la utilización de este colorante de contraste se distinguen fácilmente las bacterias violetas, grampositivas, de las gramnegativas, rojas. Aunque esta técnica de tinción se diseñó en 1884 su fundamento químico no está suficientemente entendido, pero la división de las bacterias en estos dos grupos se corresponde sorprendentemente bien con muchas otras características bacterianas (Forsythe & Hayes, 2007). El proceso se llevó a cabo en condiciones asépticas.

4.4. PRUEBA DE LA CATALASA

A partir de los cultivos realizados, se aislaron de las colonias presentes con ayuda de un asa con torunda y se les realizó la prueba de la catalasa, de esta forma se

obtiene información adicional que contribuye a la identificación de la bacteria. La enzima catalasa se encuentra presente en animales y plantas, y también en algunas bacterias por lo que es un factor adicional en la identificación de las bacterias; interviene en la degradación del peróxido de hidrógeno en oxígeno en agua.

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente (unos 25°C) y las colonias presentes en los medios de cultivo utilizados; con el asa de siembra con torunda se tomó una muestra de cada colonia identificada y se colocó en una superficie estéril, sobre las bacterias se depositó una gota de peróxido de hidrógeno. Si la prueba es positiva, se produce gran cantidad de burbujas por parte de la bacteria, debido a la descomposición en agua y oxígeno; si el resultado es negativo, hay ausencia de burbujas o se producen en escasa cantidad (Forbes, Sahm, Weissfeld & Trevino, 2007; Williams & Wilkins, 2000).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en tres tablas adjuntas para una visualización más cómoda y que permita una comparativa sencilla. Los resultados obtenidos de los medios de cultivo, la tinción de Gram y la prueba de la catalasa se agruparon en un mismo tipo de tabla, habiendo una para alimentos líquidos (tabla 1) y otra para los sólidos (tabla 2). En cuanto al recuento total en placa, también se recopiló la información y se muestra en la tabla 3.

En la parte inferior de cada tabla se muestra la leyenda correspondiente, para entender las anotaciones realizadas en la misma.

Debido a las pruebas realizadas, la identificación de las bacterias es presuntiva y se determinará a nivel de género. En algunos casos la información obtenida permite identificar a nivel de especie, por la presencia características determinantes.

Medio de cultivo	Morfología colonial						Tinción de Gram			Catalasa +/-	
	Tamaño	Color	Halo	Forma colonial	Brillo	Viraje y color	Forma	Agrupación	Tinción +/-		
Leche de cabra natural (sin pasteurizar) (LCN)											
TSA	1	grande	centro amarillento	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	inespecífica	G+	+
	2	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	inespecífica	G-	+
MRS	1	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa; opaca	sí	no	cocos; gran tamaño bacilos	p y c	G+	-
	2								c cortas	G+	-
KAA		grande	transparente	no	circular; convexa	sí	no	cocos	c largas y p	G+	-
VJ		pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	si	sí; rosa	cocos	c o inesp.	G-	+
EMB	1	grande	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; planas	sí; vm	no	bacilos	inespecífica	G-	-
	2	pequeño	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa; mucóide	sí	no	bacilos	inespecífica	G-	+
	3	intermedio	blanquecino	no	circular; convexa	sí	sí; rosado	cocos	r	G-	+
Leche de vaca fresca entera de alta pasteurización (LVFE-AP)											
TSA	1	grandes; unidas	amarillentas	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	bacilos	c largas	G-	+ ?
	2							cocobacilos	c o inesp.	G-	+ ?
MRS *		intermedio	centro blanco	sí; transparente	circular; convexa; opaca	sí	no	bacilos	c largas	G+	-
KAA	1	grande	centro amarillento	sí (parece); transparente	circular; convexa	si	no	cocobacilos	inespecífica	G-	+
	2	intermedio	blanquecino	no	circular;	sí	no	bacilos	c	G+/-	-

KAA		muy pequeño	blanquecino		convexa		sí	no	Cocobacilos	r ?		
VJ	3			no	circular; convexa		sí	no	Cocobacilos		G-	-
	1	grande	centro amarillo	sí; translúcido- transparente	circular; convexa		sí	no	cocos	inespecífica	G-	+
	2	pequeño	transparente	no	circular; convexa		sí	no	cocos	p o inespecífica	G-	-
EMB	3	intermedio	blanquecino	sí; transparente	circular; convexa		sí	sí; rosa	cocos	inespecífica	G-	+
	1	grande	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa; mucoide		sí	no	cocobacilos	p	G-	-
	2	grande	blanquecino- transparente	no	circular; convexa		sí	no	cocobacilos	c cortas y p	G-	-
Leche de vaca semidesnatada UHT (LVS-UHT)												
No hubo crecimiento bacteriano en los medios de cultivo utilizados.												
i: individuales; p: parejas; t: tétradas; r: racimos; c: cadenas; G+: Grampositiva; +: positiva; -: negativa; vm: verde metálico. MRS* : se dejó 72h incubando, en lugar de 24-48h como el resto.												

Tabla 1. Resultados del estudio en alimentos líquidos.

Medio de cultivo	Morfología colonial						Tinción de Gram			Catalasa +/-	
	Tamaño	Color	Halo	Forma colonial	Brillo	Viraje y color	Forma	Agrupación	Tinción +/-		
Queso Azul (QA)											
TSA	1	grande	blanco	no	circular; convexa	no; mate	no	cocos; gran tamaño	p y t	G+	+
	2	intermedio	blanquecino	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	r; alguna c	G+	-
TSA	3	pequeño	transparente	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p	G+	-
MRS		grande	blanquecino-	no	circular;	sí	no	cocos; gran	p y c	G+	-

MRS		transparente	sí; transparente	convexa			tamaño				
KAA	1	intermedio	blanquecino	circular; convexa	sí	no	cocos	p	G+	-	
	2	intermedio	amarillo; centro más amarillo	circular; convexa	sí	no	cocos	inespecífica	G-	+	
VJ	No hubo crecimiento bacteriano										
EMB	No hubo crecimiento bacteriano										
Queso de cabra (QC)											
TSA	1	pequeño; 1 colonia	amarillo	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p y t	G+	+
	2	intermedio	blanquecino	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G+	+
	3	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p y t	G+	-
MRS	1	grande	blanco	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G+	-
	2	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos; gran tamaño	p	G+	-
KAA	1	grande	blanquecino; borde grisáceo	no	circular; convexa	sí	sí; negro	cocos	c	G+	-
	2	pequeño	blanquecino- transparente; borde grisáceo	no	circular; convexa	sí	sí: negro	cocos	p; unidas en ~r	G+	-
VJ	1	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	sí; amarillo	cocos	p	G-	+
	2	grande	amarillento; más color en centro	no	circular; convexa	sí	sí; amarillo	cocos	r	G+	+
	3	muy	blanquecino	no	circular;	sí	sí;	bacilos	c largas	G-	-

VJ	pequeño	amarillo		convexa		amarillo			
4	intermedio	amarillo	no	circular; convexa	sí	sí; amarillo	cocos	p	G+
1	pequeño; abundante	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; plana	sí; vm	no	cocos	p	G+
2	grande; escasa	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa; mucoide	sí	no	bacilos	inespecífica	G-
3	grande	centro grande oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa	Sí, mucho	no	cocos	p, c; r	G-
Queso de oveja curado (QOC)									
TSA	1	grande	amarillento	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r
	2	pequeño	blanquecino	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	r
	3	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	bacilos o cocobacilos	p o c
MRS	1	intermedio	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	Inespecífica
	2	pequeño	blanquecino: mucha pigmentación	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c largas
	3	pequeño	blanquecino: poca pigmentación	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c cortas
KAA	1	grande	Blanquecino con borde oscuro	no	circular; convexa	sí	sí; negro	cocos	c
	2	grande	centro negro	sí; grisáceo	circular; convexa	sí	sí; negro	cocos	Inespecífica
	3	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	bacilos o cocobacilos	c largas

VJ	grande	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p; c; r	G+	+
EMB	intermedio	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; plana	sí	no	cocos	p y c	G-	-
Queso de oveja semicurado (QOS)										
TSA	1 grande	amarillo	no	circular; convexa; opaca	no; mate	no	cocos	p y t	G+	+
	2 grande	blanquecino; centro amarillento	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G-	-
	3 pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c	G-	-
MRS	1 intermedio	blanquecino	no	circular; convexa; opaca	sí	no	cocos	c largas y p	G+	-
	2 pequeño	transparente- translúcido	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c largas	G-	-
KAA	1 Intermedio	blanquecino	sí; grisáceo	circular; convexa	sí	sí; negro	cocos	r	G+	-
	2 pequeño	transparente	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c cortas	G+	-
VJ	1 intermedio	centro amarillento	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G+	+
	2 pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p	G-	-
EMB	1 pequeño	transparente	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c largas	G-	-
	2 pequeño	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	p o c	G+	-
Queso de vaca fresco (QVF)										
TSA	1 grande	centro	sí;	circular;	sí	no	cocos	r	G-	+

			amarillento	transparente	convexa							
TSA	2	intermedio	amarillento	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p o t	G+		+
	3	pequeño	Transparente-translúcido	no	circular; convexa	sí	no	cocos	inespecífica	G-		-
MRS	1	grande	blanco	no	circular; convexa; opaca	no; mate	no	cocos	r; alguna c	G+		-
	2	muy pequeño	transparente	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r, alguna c	G-		-
KAA	1	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	c largas	G+		+
	2	intermedio	amarillento	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	inespecífica	G-		+
VJ	1	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	sí; rosa	cocos	p c; r	G+		+
	2	grande	Blanquecino-translúcido	sí; transparente	circular; convexa	sí	sí; rosa	cocos	c y p	G-		-
EMB	1	grande	centro oscuro; negro	sí; transparente	circular; convexa; mucoide	sí	no	bacilos o cocobacilos	inespecífica	G-		-
	2	pequeño; abundante	centro violeta oscuro	sí; transparente	circular; convexa	sí; vm	no	bacilos	inespecífica	G-		-
Queso de vaca graso (QVG)												
TSA	1	grande	centro amarillo	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p y c	G-		+
	2	Intermedio	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G-		+
MRS		intermedio	Blanquecino-transparente	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	inespecífica	G-		-
KAA	1	intermedio	centro negro	sí; grisáceo	circular; convexa	sí	sí; negro	cocos	c largas y p	G+		-

KAA	2	intermedio	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p ?	G+	-
VJ	1	Intermedio	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	p	G-	+
	2	intermedio	amarillento	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G-	+
EMB	1	grande	entro oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	i; p; c; r	G-	-
	2	pequeño	blanquecino- transparente	No	circular; convexa	sí	no	bacilos	inespecífica	G-	+
Queso de vaca semicurado (QVS)											
TSA	1	grande	centro amarillento	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G-	+
	2	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G-	+
MRS	1	pequeño	blanquecino	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	inespecífica	G+	-
	2							cocos; gran tamaño	p y t	G+	-
KAA	1	Intermedio	centro negro	sí; grisáceo	circular; convexa	sí	sí; negro	cocos	r	G+	-
	2	pequeño	transparente	no	circular; convexa	sí	no	bacilos	c cortas	G+	-
VJ		intermedio	transparente	no	circular; convexa	sí	sí; amarillo	cocos	r	G-	+
EMB	1	grande	centro oscuro/negro	sí; transparente	circular; convexa	sí	no	cocos	p y t	G-	-
	2	pequeño	transparente	no	circular; convexa	sí	no	cocos	r	G+	-

i: individuales; p: parejas; t: tétradas; r: racimos; c: cadenas; G+: Grampositiva; +: positiva; -: negativa; vm: verde metálico; -: agrupación seleccionada.

Tabla 2. Resultados del estudio en alimentos sólidos.

Alimento	Medio de cultivo	Número de colonias	Dilución utilizada	Recuento total en placa
ALIMENTOS LÍQUIDOS				
LCN	TSA	>300	-4	>3x10 ⁷ UFC/ml
	MRS	33	0	3,3x10 ² UFC/ml
	KAA	25	0	2,5x10 ² UFC/ml
	VJ	>300	-1	>3x10 ⁴ UFC/ml
	EMB	>300	-1	>3x10 ⁴ UFC/ml
LVFE-AP	TSA	48	-1	4,8x10 ³ UFC/ml
	MRS*	7	-1	7x10 ² UFC/ml
	KAA	133	-1	1,33x10 ⁴ UFC/ml
	VJ	165	0	1,65x10 ³ UFC/ml
	EMB	46	0	4,6x10 ² UFC/ml
LVS-UHT	-	-	-	-
ALIMENTOS SÓLIDOS				
QA	TSA	260	-1	2,6x10 ⁵ UFC/g
	MRS	87	0	8,7x10 ³ UFC/g
	KAA	217	-1	2,17x10 ⁵ UFC/g
	VJ	-	-	-
	EMB	-	-	-
QC	TSA	212	-3	2,12x10 ⁷ UFC/g
	MRS	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	KAA	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	VJ	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	EMB	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
QOC	TSA	242	-1	2,42x10 ⁵ UFC/g
	MRS	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	KAA	210	0	2,1x10 ⁴ UFC/g
	VJ	40	0	4x10 ³ UFC/g
	EMB	>300	0	>3x10 ⁴ UFC/g
QOS	TSA	>300	-2	>3x10 ⁶ UFC/g
	MRS	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g

QOS	KAA	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	VJ	226	0	2,26x10 ⁴ UFC/g
	EMB	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g.
	TSA	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
QVF	MRS	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	KAA	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	VJ	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	EMB	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
QVG	TSA	138	-1	1,38x10 ⁵ UFC/g
	MRS	190	-1	1,9x10 ⁵ UFC/g
	KAA	230	-1	2,3x10 ⁵ UFC/g
	VJ	168	0	1,68x10 ⁴ UFC/g
QVS	EMB	176	0	1,76x10 ⁴ UFC/g
	TSA	83	-4	8,3x10 ⁷ UFC/g
	MRS	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	KAA	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	VJ	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g
	EMB	>300	-1	>3x10 ⁵ UFC/g

MRS*: No hubo crecimiento en el medio con la dilución 0.

Tabla 3. Recuentos totales en placa de las muestras analizadas.

Como se puede observar en las tablas 1 y 2, en algunos medios aparentemente solo hay un tipo de colonia presente, pero al observar la tinción de Gram aparecían dos bacterias diferentes. Esto se debe a que ambas bacterias presentan características coloniales muy similares. El problema en estos casos reside en la prueba de la catalasa, ya que se realiza una misma prueba para ambas bacterias. Los resultados obtenidos pueden dar lugar a 3 situaciones:

- **Catalasa negativa:** ambas bacterias no presentan el enzima catalasa.
- **Catalasa positiva:** ambas bacterias presentan el enzima catalasa.
- **Catalasa positiva con falso positivo:** se debe a que una bacteria es catalasa positiva y la otra no. la consecuencia es que se da un falso positivo (bacteria que no presenta el enzima).

No se puede demostrar con certeza qué ocurre, por lo tanto, se comparan los resultados de las bacterias que presentan esta situación con aquellas con descripción similar, permitiendo así determinar si hay algún falso positivo.

Los cambios físicos, observables, en los medios aportan información referente a reacciones químicas. De forma que, en el medio KAA el ennegrecimiento del medio quiere decir que la bacteria hidroliza la esculina (componente del medio). El medio VJ puede presentar 3 posibles cambios referentes al viraje, si el medio no cambia de color quiere decir que las bacterias no fermentan el manitol; si el medio vira a rosa, las bacterias no fermentan el manitol y, además, liberan metabolitos básicos al medio; y si el medio vira a amarillo, las bacterias fermentan el manitol y liberan metabolitos ácidos al medio. En el medio EMB según el color de la colonia se obtiene información sobre si fermenta la lactosa o no, colonias con el centro de la colonia oscuro y son de color rosa pálido o transparente, respectivamente.

El crecimiento de las **BAL en MRS** es observable debido a que forma colonias, blanquecinas-grisáceas, mucosas-brillantes circulares con los bordes lisos, convexas, opacas y de un tamaño que puede variar de puntiforme (colonias muy pequeñas) a 2-3 mm de diámetro (Drider & Rivera, 2016).

5.1. ALIMENTOS LÍQUIDOS

➤ LCN

En ISA, (1) los resultados descritos tienen similitudes con la bacteria presente en el medio KAA, pero al no apreciarse una agrupación concreta de la bacteria no se

puede confirmar. El resultado es diferente en la prueba de la catalasa, pero si al realizar la prueba de la catalasa se invirtió el orden establecido, primero la bacteria aislada y sobre ella se deposita la gota de peróxido de hidrógeno, se pudo obtener un falso positivo (Williams & Wilkins, 2000). Sería necesaria la realización de pruebas bioquímicas para determinar si son la misma bacteria o no. En (2) los resultados coinciden con los obtenidos en EMB (1) (*ver resultados en el medio*).

En MRS, (1) la bacteria presente presuntamente es *Lactococcus* pues se trata de una bacteria con morfología esférica, grampositiva que se puede presentar individualmente, en parejas o cadenas; además pertenece a las BAL (Dridier & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). También podría ser *Leuconostoc* pues ambas pertenecen a las BAL y se cumplen las características descritas. A menudo estas bacterias son co-cultivadas para la fermentación de diferentes quesos, aunque *Leuconostoc* tiene una mayor importancia en la fermentación de vegetales (Dridier & Rivera, 2016). *Leuconostoc* al tener una mayor importancia en vegetales, es más probable que (1) sea *Lactococcus*. En (2) presuntamente es *Lactobacillus* debido a que son bacilos grampositivos que forman cadenas largas, son catalasa negativa y es una BAL y la descripción de la colonia coincide con la de las BAL. (Dridier & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006); debido a que el medio es especialmente selectivo, por su composición, para el género *Lactobacillus* por lo que es muy probable.

En KAA, la bacteria es presuntamente *Streptococcus* porque son cocos grampositivos, catalasa negativa y forman cadenas, por lo general, largas (Dridier & Rivera, 2016; Forbes et al., 2007; Yousef & Carlstrom, 2006). No hidroliza la esculina, por lo que no pertenece a los estreptococos fecales.

En VJ, la bacteria que debería crecer es del género *Staphylococcus*, sus características son: cocos grampositivos que forman racimos y son catalasa positiva (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Williams & Wilkins, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006; Zendejas-Manzo et al., 2014). Sin embargo, en el medio crece una bacteria que no cumple estas características, sino que es gramnegativa con una distribución no muy clara, no reduce el telurito y no fermenta el manitol aeróbicamente y libera metabolitos básicos. Los problemas en la tinción y la distribución observada se podría deber a la acción humana durante el proceso de fijación y tinción.

En EMB, (1) presuntamente es *Escherichia coli* porque en los resultados obtenidos se observan características propias de esta especie. Se trata de una bacteria bacilar gramnegativa, catalasa negativa, fermentadora de lactosa y que al reflejar la luz sobre la superficie del medio se observa un brillo verde metálico (Forsythe & Hayes, 2007; Winn et al., 2006; Yousef & Carlstrom, 2006). (2) es presuntamente *Enterobacter* porque se trata de una bacteria coliforme (bacilos, gramnegativos y fermentadores de lactosa) y, además, la colonia tiene aspecto mucoide, propia de este género (Forbes et al., 2007). En cuanto a la catalasa, podría deberse a una inversión en el orden de los factores, dando un falso positivo. (3) probablemente se trate de una bacteria inespecífica porque en los resultados se observa viraje en el medio y en la familia *Enterobacteriaceae* (la que debe crecer) no se espera dicho cambio. Además, no reúne las características de las bacterias pertenecientes a dicha familia no fermentadoras de lactosa, puesto que no presentan la colonia oscura, (colonias transparentes, bacilos gramnegativos y catalasa negativa) (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006).

➤ **LVFE-AP**

En el medio TSA solo se diferencia un tipo de colonia pero en tinción se observan dos colonias; al realizar la prueba de la catalasa se vuelve a picar la misma colonia, por lo que la respuesta es la obtenida para las dos. Al ser positiva puede darse dos casos: ambas son positivas o que solo una de ellas sea catalasa positiva, dando así un falso positivo para la otra bacteria. De acuerdo con los resultados obtenidos en todos los cultivos parece confirmarse la segunda opción porque TSA (1) coincide con la descripción de la bacteria del medio MRS (*ver resultado en dicho medio*). Los bacilos dan algunos problemas en lo que a teñirse se refiere, es decir, aunque aparentemente la tinción obtenida es diferente podrían ser ambas bacterias grampositivas. En TSA (2) coincide con la descripción de KAA (1) (*ver resultado en dicho medio*). Por tanto, TSA (1) sería catalasa negativa, sería el falso positivo, y TSA (2) sería catalasa positiva.

En MRS la bacteria presente presuntamente es *Lactobacillus*, se trata de una bacteria con morfología bacilar, grampositiva que se puede presentar individualmente, en parejas o cadenas; además pertenece a las BAL (Dridier & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Además, probablemente se trate de *Lactobacillus* de crecimiento lento pues se dejó incubando 72h hasta que se desarrolló el crecimiento de las colonias.

En KAA, (1) se desarrollaron bacterias cuya colonia está pigmentada en color amarillento y presentan halo, no hidrolizan la esculina, son cocobacilos gramnegativos, sin distribución específica y catalasa positivos. (3) Se trata de colonias puntiformes, por tanto indican poco crecimiento, son cocobacilos gramnegativos en una disposición aparentemente de racimos. Estas características no se corresponden con las del género *Streptococcus*, para el cual es selectivo el medio. Las cuatro características generales de *Streptococcus* son la morfología esférica, grampositivos, forman cadenas y son catalasa negativos (Dridier & Rivera, 2016; Forbes et al., 2007; Yousef & Carlstrom, 2006). Por lo tanto, no se puede identificar con los resultados obtenidos. En el caso de (3) podría deberse al crecimiento de una bacteria que se haya desarrollado pese a los componentes inhibidores del medio. Por lo tanto para (1) y (3) no hay información suficiente para determinar el género de dichas bacterias. (2) Son bacilos con una tinción confusa, en cadenas, catalasa negativa y su descripción colonial corresponde más bien a las BAL; la descripción se corresponde más a la de *Lactobacillus* que a la de *Streptococcus*, que es la más probable de crecer.

En VJ, se espera aislar bacterias del género *Staphylococcus* debido a que es un medio selectivo para dicho género. Este género se caracteriza por ser cocos grampositivos dispuestos en racimo, anaerobios facultativos y catalasa positiva; existen especies, como *S. aureus*, que pueden fermentar el manitol anaeróticamente o reducir el telurito (Forbes et al., 2007; Yousef & Carlstrom, 2006; Williams & Wilkins, 2000). Pero como se observa en la tabla 1., las bacterias presentes son gramnegativas, (1) y (3) presentan catalasa positiva mientras que (2) es negativa. Dentro del género *Staphylococcus* hay dos especies catalasa negativa pero solo crecen en anaerobiosis (Forbes et al., 2007). Los resultados obtenidos no se corresponden con los esperados, la causa de ello puede ser algún error durante el proceso de tinción y la prueba de la catalasa; la distribución podría haberse alterado en la extensión del aislado y la prueba por inversión del orden (mencionado anteriormente). Deberían haberse aislado bacterias del género *Staphylococcus* y la única información útil obtenida es que ninguna de las bacterias presentes reduce el telurito y que (1) y (2) no fermentan el manitol de forma aerobia; (3) tampoco y además libera metabolitos básicos al medio.

En EMB, (1) se obtuvieron bacterias gramnegativas, con la morfología de cocobacilar, catalasa negativa, mucoides y fermentadoras de lactosa; de acuerdo

con los resultados, se trata de una bacteria coliforme porque estas se caracterizan por ser bacterias bacilares gramnegativas fermentadoras de lactosa (Yousef & Carlstrom, 2006); como ya se mencionó en la introducción, los cocobacilos entran dentro del grupo bacilar. Según Pascual & Calderón (2000), debido a la ausencia del brillo verde metálico de *Escherichia*, las opciones son *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Presuntamente es *Enterobacter* porque es una bacteria bacilar, gramnegativa, fermentadora de lactosa y mucóide, además de ser capaz de crecer en los medios MacConkey y EMB (Forbes et al., 2007). (2) Se trata de una bacteria cocobacilar, gramnegativa, forma cadenas cortas y parejas y no fermenta la lactosa. Podrían ser las bacterias *Salmonella* y *Shigella*, pues pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, de la que se espera crecimiento en el medio de cultivo, y reúnen las características de ser bacterias que no fermentan la lactosa, bacilares, gramnegativas y con colonias transparentes (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). Al tener las mismas características, respecto a las pruebas realizadas, no se podría determinar presuntamente una de ellas, sino las dos.

➤ LVS-UHT

En este medio no hubo crecimiento bacteriano debido a que es un alimento aséptico debido a su tratamiento térmico (132°C, 15 segundos). Como mencionan Pascual & Calderón (2000), cabe la posibilidad de una pequeña presencia bacteriana, pero en la muestra analizada no hubo crecimiento alguno.

5.2. ALIMENTOS SÓLIDOS

➤ QA

En TSA, (1) al presentar cocos de gran tamaño al igual que la bacteria en MRS se podría pensar que corresponden a la misma bacteria pero al presentar brillo mate esta bacteria no se corresponde con las BAL, las cuales crecen en el medio MRS. Habría que realizar pruebas bioquímicas para confirmarlo. (2) Al ser cocos grampositivos en racimo, con alguna cadena presente, el género que se corresponde con estas características es *Staphylococcus*, a excepción de la catalasa negativa (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Yousef & Carlstrom, 2006). Pero al no haber crecimiento en el medio VJ no es posible, ya que habría habido crecimiento. (3) la descripción colonial es similar a la de BAL, concretamente con *Lactococcus* y *Leuconostoc* porque son cocos grampositivos en parejas y

catalasa negativa, además de por la morfología colonial (Dridner & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Sin embargo, los resultados al compararlos coinciden más bien con KAA (1) y el problema en MRS reside en que los cocos son de gran tamaño y en TSA, no. El medio TSA al ser un medio general no aporta información suficiente como para realizar una identificación presuntiva y menos aún cuando no hay coincidencias con los medios selectivos utilizados. Los resultados pueden estar alterados por la acción humana durante la preparación de las muestras o ser bacterias diferentes y no haber sido aislada en los medios utilizados, esta última opción es poco probable.

En MRS, la bacteria cumple los requisitos descritos para las BAL en cuanto a morfología colonial. Presuntamente es *Leuconostoc* o *Lactococcus*. Ambas bacterias son cocos grampositivos que se pueden presentar dispuestas en pares y son catalasa negativas (Dridner & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Ambas posibilidades serían válidas, pero de elegir una sería *Leuconostoc* debido a que es una bacteria típicamente presente en este tipo de queso (Dridner & Rivera, 2016).

En KAA, (1) la bacteria presente pertenece presuntamente al género *Streptococcus* porque sus características coinciden con los resultados obtenidos, son cocos grampositivos dispuestos en parejas, la descripción colonial coincide con la de las BAL, grupo al que pertenece y, además, es catalasa positiva (Dridner & Rivera, 2016; Williams & Wilkins, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). La disposición se puede haber visto afectada por la extensión de la bacteria en la preparación realizada. El medio KAA es selectivo para el aislamiento de *Streptococcus*, por lo que la identificación se vería reforzada. La bacteria presente en el medio no hidroliza la esculina ni la colonia presenta un borde negro, por tanto no se trataría de un estreptococo fecal. (2) Presenta unas características que podrían corresponder con la especie *Staphylococcus aureus*, son cocos, catalasa positivos y las colonias presentan una pigmentación amarilla; la distribución es inespecífica y para corresponderse con *S. aureus* debería ser en racimos y ser grampositivos (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006; Zendejas-Manzo et al., 2014). Pero el medio es selectivo para el crecimiento de *Streptococcus*, *Staphylococcus* debería haber crecido en el medio VJ, donde no hay crecimiento bacteriano. Por tanto, se debe de haber producido algún error durante la preparación de la muestra para la tinción y para la catalasa, ya que el género

Streptococcus se caracteriza por la catalasa negativa, cocos grampositivos y en cadenas (Drider & Rivera, 2016; Forbes et al., 2007; Yousef & Carlstrom, 2006).

En los medio VJ y EMB no hubo crecimiento bacteriano, por lo que no hay presencia de *Staphylococcus* ni coliformes en esta muestra.

➤ QC

En TSA, (1) los resultados obtenidos coinciden presuntamente con la bacteria (4) del medio VJ y, por lo tanto, pertenecería al género *Staphylococcus* (ver resultado en dicho medio).(2) Presuntamente es *Staphylococcus* por las características que presenta: cocos grampositivos en racimos y catalasa positiva, la descripción colonial no aporta información suficiente (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006); al haber crecimiento en VJ se confirma que hay presencia de *Staphylococcus* en el alimento. (3) Los resultados obtenidos coinciden con la bacteria presente en MRS (1) (ver resultado en MRS (1)). En MRS, (1) reúne las características de las BAL, colonias blancas, convexas, circulares y con brillo, grampositivas y catalasa negativas (Drider & Rivera, 2016). La agrupación de los cocos presentes en la bacteria aislada es propia de *Staphylococcus*, pero este género no crece en el medio MRS, y debería ser catalasa positiva. Probablemente se deba a un error cometido en el procesamiento de la muestra. (2) Sí se corresponde con las BAL, podría ser *Lactococcus*, *Leuconostoc* o *Pediococcus* porque todos los géneros son cocos grampositivos que pueden formar parejas y son catalasa negativa (Drider & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Presuntamente es *Lactococcus* debido a que habitualmente se encuentra en la leche cruda predominando en la flora láctea (Wouters et al., 2002); *Leuconostoc* es una bacteria es una bacteria de gran importancia en los vegetales y *Pediococcus* es más habitual para la fermentación de carne, pescado, vegetales y salsa de soja, por lo que la presencia de estos dos últimos es menos probable (Bamforth, 2005).

En KAA, tanto (1) como (2) son presuntamente *Streptococcus* porque son cocos grampositivos, dispuestos en cadenas (1) y parejas (2), catalasa negativa, al pertenecer a las BAL presenta su colonias características (ya descritas) (Forbes et al., 2007; Drider & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Además, las bacterias presentes hidrolizan la esculina, y presentan el borde de la colonia grisáceo lo que confirma la presencia de estreptococos fecales, concretamente *Streptococcus* pertenecientes al grupo D de Lancefield o género *Enterococcus* (Bamforth, 2005;

Dridger & Rivera, 2000; Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000).

En VJ, (2) presuntamente es *Staphylococcus* porque se trata de una bacteria con morfología esférica, grampositiva, dispuesta en racimos, catalasa positiva y la colonia presenta pigmentación amarillenta (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Williams & Wilkins, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). (4) también es, presuntamente, *Staphylococcus*; el único inconveniente reside en la disposición de las bacterias porque aparece en parejas y *Staphylococcus* se caracteriza por agruparse en racimo pero podría deberse a la preparación de la muestra para la tinción. Ambas fermentan el manitol aeróbicamente y no reduce el telurito, pero esta información no es suficiente para determinar a nivel de especie. Sin embargo, (1) y (3) son bacterias cuya descripción no se corresponde con la esperada en este medio. La descripción de colonial es típica de BAL, de hecho (3) podría ser *Lactobacillus* al ser bacilos en cadenas largas y catalasa positiva, el problema está en la tinción que se podría justificar por los problemas que estos presentan para absorber los colorantes. Pero de ser así no fermentarían el manitol y habría crecido en el medio en el medio MRS. Probablemente (1) y (3) presenten estos resultados como consecuencia de prácticas erróneas en el laboratorio.

En EMB, (1) se trata de bacterias catalasa negativa, fermentadoras de lactosa y brillo metálico por la precipitación de los colorantes del medio; estas características indican la presencia de *Escherichia coli* puesto que el brillo metálico es muy característico de esta especie (Forsythe & Hayes, 2006; Yousef & Carlstrom, 2006, Winn et al., 2006). Pero al ser cocos grampositivos en parejas no se corresponde porque *E. coli* son bacilos gramnegativos. Es más, en este medio de cultivo no debería de haber crecimiento de bacterias grampositivas porque se encuentran inhibidas por la composición química. Por tanto, lo más probable es unas prácticas erróneas en el aislamiento de la bacteria. (2) Presuntamente es *Enterobacter*, una bacteria perteneciente al grupo de coliformes. Se trata de una bacteria fermentadora de lactosa, colonia con apariencia mucoide, con morfología bacilar, gramnegativa y catalasa negativa (Forbes et al., 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). (3) son bacterias fermentadoras de lactosa, cocos gramnegativos, se observan algunas parejas y cadenas, pero la disposición es en racimo, son catalasa positiva. Las bacterias presentes en el medio EMB fermentadoras de lactosa son las pertenecientes al grupo de coliformes, estas se caracterizan por ser

bacilos, gramnegativos y catalasa negativa (Yousef & Carlstrom, 2006). Una explicación posible para la presencia de (3) en el medio es unas malas prácticas en el laboratorio.

➤ QOC

En TSA, (1) presuntamente es *Staphylococcus* porque son cocos grampositivos, en racimo, catalasa positiva y la colonia presenta pigmentación amarilla (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006; Zendejas-Manzo et al., 2014); además, los resultados coinciden con la bacteria presente en VJ, lo que demuestra que hay presencia de dicho género. (2) presenta características similares a las obtenidas en KAA (1), a excepción de la agrupación. La muestra presentaba demasiada cantidad de bacterias

En MRS, todas las bacterias presentes son, presuntamente, del género *Lactobacillus*. Este género, perteneciente a las BAL, se caracteriza por tener morfología bacilar, ser grampositivo, formar cadenas generalmente largas y tener actividad catalasa negativa (Dridr & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Además, al tratarse de una BAL las colonias son blanquecinas, brillantes, circulares y convexas (Dridr & Rivera, 2016). En el caso de (3) los bacilos aparecen como gramnegativos, pero debido a la ambigüedad de estos al teñirse, se asume que son grampositivos ya que las bacterias gramnegativas se encuentran inhibidas en MRS.

En KAA, (1) presuntamente es *Enterococcus* porque se trata de cocos grampositivos, formando cadenas y catalasa negativa que son características del género *Streptococcus* (Forbes et al., 2007; Dridr & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Además presenta borde de la colonia negro e hidroliza la esculina, lo que confirma que se trata de *Streptococcus* del grupo D de Lancefield, es decir, del género *Enterococcus* (Bamforth, 2005; Dridr & Rivera, 2000; Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000). (2) presuntamente es *Enterococcus*, pero difiere en las características propias de este género porque en la tinción el resultado es gramnegativo y no aparece una disposición concreta. Pero con los datos de borde de la colonia negro e hidroliza de esculina, además de ser cocos y no tener actividad catalasa, se confirma la identificación (Dridr & Rivera, 2000; Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000). Probablemente se deba a errores en la preparación de la muestra para teñir. (3) no presenta las características esperadas en este medio, son bacilos o cocobacilos grampositivos, formando cadenas largas y sin actividad catalasa. Probablemente se

deba a errores cometidos en la fase experimental porque este medio es selectivo para *Streptococcus*.

En VJ, la bacteria presente presuntamente es *Staphylococcus* porque la bacteria reúne las características propias del género: cocos grampositivos, dispuestos en racimos y catalasa positiva (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006; Williams & Wilkins, 2000; Zendejas-Manzo et al., 2014). En la tabla 2 aparece que en la agrupación bacteriana están presentes varias (parejas, cadenas y racimos), la explicación sería que fuese racimos y que al realizar la extensión sobre el portaobjetos se separaran.

En EMB, al ser una bacteria fermentadora de lactosa, y debido al medio, se trata de bacterias coliformes; reúne también las características de colonias planas y catalasa negativa. Las bacterias de este grupo son *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*, pero todas tienen morfología bacilar (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). Por lo que se cometió algún error al realizar el aislamiento.

➤ QOS

En TSA, (1) sus resultados parece coincidir con MRS (1), pero si se tratara de una bacteria láctica no presentaría brillo mate. Debido a que el medio TSA es un medio general y que los resultados no coinciden con los géneros esperados en los medios selectivos, no hay información suficiente para determinar qué bacteria es. (2) presenta unos resultados que se corresponden con los obtenidos en el medio VJ, de forma que se trataría de una bacteria del género *Staphylococcus* (ver resultado en el medio). (3) coincide con las bacterias KAA (2), a excepción de la tinción de la bacteria pero los bacilos presentan problemas en la absorción del colorante; también coincide con EMB (1). Las diferencias coloniales se deben a que la composición química de los medios es diferente, por lo que las colonias reaccionan de un modo u otro. Presuntamente se correspondería con EMB (1) porque todos los resultados coinciden (ver resultado en medio EMB).

En MRS, (1) presuntamente es *Lactococcus* porque coincide con sus características, cocos grampositivos, formando cadenas largas, catalasa positiva y las colonias típicas de las BAL (Dridier & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). (2) presuntamente es *Lactobacillus*, son bacterias bacilares, grampositivas formando cadenas largas, no tiene actividad catalasa y colonias típicas de BAL (Dridier & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). Los bacilos presentes en la tabla 2 aparecen como gramnegativos; debido a los problemas que presentan para teñirse y

que el medio MRS solo permite el crecimiento de grampositivos, se asumen como grampositivos.

En KAA, (1) presuntamente es *Enterococcus*, se trata de cocos grampositivos, presentan un halo grisáceo, hidrolizan la esculina y son catalasa negativa. Estas características son propias del género (Bamforth, 2005; Drider & Rivera, 2000; Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000). La distribución típica del género es formando cadenas y en el aislado están aparentemente en racimos, podría deberse a algún fallo en la extensión de la colonia. (2) no se corresponde con lo esperado por la morfología resultante, bacilar. Este medio es selectivo para *Streptococcus* por lo que el fallo reside en el aislamiento de la colonia.

En VJ, (1) la bacteria presuntamente es *Staphylococcus* porque se trata de cocos grampositivos, dispuestos en racimos y catalasa positiva (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006; Williams & Wilkins, 2000; Zendejas-Manzo et al., 2014). (2) no cumple las características típicas del género *Staphylococcus*, son gramnegativas y no tienen actividad catalasa. Podría ser una especie, la cual es catalasa negativa y crece en aerobiosis, *S. saccharolytica*, y que la tinción fuese un error debido al factor humano (Williams & Wilkins).

En EMB, (1) presuntamente es *Salmonella* o *Shigella*, ambos géneros se caracterizan por tener morfología bacilar, ser gramnegativos, no fermentar la lactosa (sus colonias son transparentes) y ser catalasa negativa (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). (2) presuntamente pertenece al grupo de bacterias coliformes porque se trata de una bacteria fermentadora de lactosa, crece en medio EMB y catalasa negativa (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). Pero según los resultados se trata de cocos grampositivos, no incluidos en este grupo. Presuntamente pertenecería al género *Streptococcus* por las características que presenta, pero no se espera su crecimiento en este medio.

➤ QVF

En ISA, (1) y (2) muestran unos resultados que coinciden con los obtenidos en VJ (1) (ver resultado en dicho medio). (1) aparece como gramnegativo pero podría deberse a errores en la tinción. Los resultados de (3) son similares a los observados en MRS (2) y VJ (2); para poder determinar a cual se corresponde habría que realizar más pruebas bioquímicas (a todas).

En MRS, (1) no presenta las características de brillo mate y la disposición en racimo que no son propias de las BAL. No se podría identificar la bacteria sin realizar pruebas bioquímicas. En (2) se trata de bacterias puntiformes, con la descripción de BAL pero que al observar en tinción no se observa una agrupación característica para determinar un género bacteriano. Para identificarla habría que repetir el proceso o realizar pruebas bioquímicas. Aparece como gramnegativo y debería ser grampositivo probablemente a consecuencia de errores en los tiempos de tinción.

En KAA, (1) la bacteria presenta la descripción colonial de las BAL, son cocos grampositivos dispuestos en cadenas largas; presuntamente es *Streptococcus* (Dridger & Rivera, 2016; Forbes et al., 2007; Williams & Wilkins, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). La actividad catalasa se podría deber a una inversión del orden al realizar la prueba. (2) debería pertenecer al género *Streptococcus* debido a que el medio es selectivo para él pero en los resultados no aparece la distribución característica en cadenas, es gramnegativos, con actividad catalasa y hay pigmentación amarillenta en la colonia. Estos errores se pueden deber a errores cometidos en la fase experimental.

En VJ, (1) presuntamente es *Staphylococcus* porque la bacteria aislada tiene morfología esférica, es grampositiva, la agrupación es en racimos (se puede haber disgregado la agrupación al realizar la extensión en el portaobjetos) y es catalasa positiva (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Williams & Wilkins, 2006; Yousef & Carlstrom, 2006). Para la identificación a nivel de especie, es una bacteria que no fermenta el manitol aeróbicamente y libera metabolitos básicos al medio y que no reduce el telurito. Sin embargo, (2) podría ser *Staphylococcus* pero aparece como una bacteria gramnegativa y con la actividad catalasa negativa, lo cual no encaja con el género y podría deberse a errores en la fase experimental.

En EMB, (1) presuntamente se trata de *Enterobacter* porque la bacteria presenta morfología bacilar, es gramnegativa, no presenta actividad catalasa, se trata de una bacteria fermentadora de lactosa y entre sus características coloniales se encuentra la mucosidad (Forbes et al., 2007). Con estas características se trata de bacterias coliformes, y este género es el que se corresponde con los resultados. (2) es presuntamente *Escherichia coli* pues las características típicas de esta especie se reflejan en los resultados: bacilos gramnegativos, catalasa negativa, bacterias fermentadoras de lactosa, brillo verde metálico y colonias planas (Forsythe & Hayes, 2007; Winn et al., 2006; Yousef & Carlstrom, 2006).

➤ QVG

En TSA, las bacterias presentes muestran unos resultados muy similares a los obtenidos en el medio VJ. Por lo tanto, se podría decir que pertenecen al género *Staphylococcus*, siendo TSA (1) la bacteria VJ (2), y TSA (2) la bacteria VJ (1) (*ver resultados en el medio VJ*).

En MRS, la bacteria aislada presuntamente es *Lactobacillus* porque las características de este género se encuentran presentes: descripción de la colonia típica de BAL, bacilos y catalasa negativa (Dridner & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). La disposición de los bacilos puede deberse a una extensión excesiva de la colonia; y respecto a la tinción, los bacilos no absorben con facilidad los colorantes.

En KAA, ambas bacterias son presuntamente *Streptococcus*, y claramente dos bacterias diferentes, por la diferencia en la hidrólisis de la esculina. Se trata de bacterias con morfología esférica, grampositivas y catalasa negativa; (2) se dispone en parejas (se podría deber a la extensión de la colonia en la preparación) (Dridner & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). (1) forma cadenas largas, las colonias presentan un halo grisáceo alrededor e hidroliza la esculina, lo que confirma que se trata de *Enterococcus* Bamforth, 2005; Dridner & Rivera, 2000; Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000).

En VJ, (1) presuntamente es *Staphylococcus* por crecer en este medio y coincidir en la morfología bacteriana y la actividad catalasa. La coloración de la colonia podría deberse a que alguna especie en concreto no pigmente; además, durante la preparación de la muestra en el portaobjetos se habría dejado más tiempo del debido con los colorantes y disgregado la agrupación, rompiendo así los racimos. Para poder asegurar esto habría que realizar pruebas bioquímicas. (2) también es presuntamente *Staphylococcus* porque se trata de una bacteria con morfología cocal, dispuesta en racimos, catalasa positiva y cuya colonia presenta pigmentación amarillenta (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). El problema reside en la tinción, que se podría deber al dejar más tiempo del debido con los colorantes.

En EMB, (1) se trata de bacterias fermentadoras de lactosa, con morfología cocal, gramnegativas, dispuestas en racimos y catalasa negativa. Estos resultados no se corresponden con los esperados; en el medio EMB y bacterias fermentadoras de lactosa pertenecen al grupo de coliformes. Los géneros incluidos en este grupo

(*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*) no se coinciden con lo obtenido. (2) presuntamente es *Salmonella* o *Shigella* porque son bacilos, gramnegativos, bacterias catalasa negativa y no fermentadoras de lactosa (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006).

➤ QVS

En TSA, las bacterias presentes en el medio muestran unos resultados que coinciden con la bacteria presente en VJ. (1) es una bacteria catalasa positiva, con morfología esférica, dispuesta en racimos y cuya colonia presenta pigmentación amarillenta; estas características coinciden con *Staphylococcus* (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2006; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). (2) no presenta la pigmentación amarillenta, pero podría tratarse de alguna especie concreta que no pigmente. Ambas aparecen como gramnegativas y el género es grampositivo; podría deberse a algún fallo durante la tinción.

En MRS, (1) presuntamente es el género *Lactobacillus* porque se trata de bacilos grampositivos, sin actividad catalasa y presenta la descripción colonial típica de las BAL (Dridr & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). (2) presuntamente es *Pediococcus* porque muestra las características típicas de este género: cocos grampositivos, formando parejas o tétradas, catalasa negativa y la descripción típica de las colonias de BAL (Dridr & Rivera, 2016; Williams & Wilkins, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006).

En KAA, no se puede identificar la bacteria (2) debido a que en este medio se inhibe el crecimiento de aquellas bacterias que no pertenezcan al género *Streptococcus*. Las bacterias presentes deberían pertenecer a dicho género; deberían ser cocos grampositivos, agrupados en cadenas y sin actividad catalasa, pudiendo además reaccionar a la esculina (Forbes et al., 2007; Dridr & Rivera, 2016; Yousef & Carlstrom, 2006). (1) cumple sigue estas características pero se dispone en racimos, esto podría deberse a cómo se realizó la extensión; presenta un halo grisáceo alrededor de la colonia e hidroliza la esculina, lo que confirma que se trata de *Enterococcus* (Bamforth, 2005; Dridr & Rivera, 2000; Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000). Sin embargo, (2) aparece con morfología bacilar.

En VJ, la bacteria presuntamente es *Staphylococcus* por las características obtenidas: cocos en racimo, catalasa positiva y crece en el medio VJ (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2007; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom,

2006). Aparece como gramnegativa y el género es grampositivo, podría deberse a algún fallo durante la tinción; y en la pigmentación ocurriría como en TSA (1), podría ser alguna especie concreta que no pigmenta de amarillo la colonia. Además, el medio muestra que la bacteria presente fermenta el manitol aeróbicamente y hay especies dentro del género que fermentan el manitol.

En EMB, (1) al ser una bacteria fermentadora de lactosa, pertenece al grupo de bacterias coliformes. En este grupo se encuentran los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*, y la bacteria no coincide con las características de este género (bacilos gramnegativos con colonias negras debido a la precipitación de los colorantes presentes en el medio), por lo que no es posible su identificación (Forbes et al., 2007; Forsythe & Hayes, 2006; Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). En (2) la situación es similar porque la bacteria no fermenta la lactosa y de las posibles bacterias que crecen en EMB serían *Salmonella* y *Shigella*, las cuales son bacilos gramnegativos, de colonias transparentes y sin actividad catalasa (Pascual & Calderón, 2000; Yousef & Carlstrom, 2006). La bacteria aislada al ser cocos en racimos no hay explicación posible salvo un mal aislamiento.

De las bacterias aisladas (presuntamente), se consideran bacterias contaminantes los géneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Enterobacter* como bacterias coliformes y *Salmonella-Shigella* como enterobacterias. La presencia de estas bacterias denota una mala higiene de los alimentos porque son bacterias que pueden desencadenar enfermedades transmitidas por los alimentos (toxiinfecciones). Pero no todos los *Enterococcus* son contaminantes, existen especies utilizadas para aportar ciertas características a los quesos, sobre todo en los artesanales (Castro Aranda et al., 2004; Teuber et al., 1996). Se trata de bacterias que se encuentran frecuentemente en la leche cruda y en los productos lácteos (Giraffa et al., 1997) y que son importantes en la maduración (Ordóñez et al., 1978; Coppola et al., 1988; Litopoulou-Tzanetaki, 1990), cuando se encuentran en altos niveles se asume una mala higiene durante la elaboración del queso (Thomson y Marth, 1986; Litopoulou-Tzanetaki, 1990; López-Díaz et al., 1995).

5.3. RECUEENTOS TOTALES EN PLACA

Como se puede observar en la tabla 3, se muestran los RTP de cada medio y alimento y la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por cada mililitro o gramo. Debido a que los alimentos analizados son de diferente naturaleza, se comentarán y compararán de forma independiente.

➤ Leche

En los diferentes tipos de leche el grado de pasteurización se ve reflejado en los resultados, siendo mayor la presencia bacteriana en la leche natural que en la leche de alta pasteurización y siendo 0 en la leche UHT. Destacar que la presencia de BAL es similar en leche natural y en la de alta pasteurización (el doble); sin embargo, difieren en cuanto a la cantidad de *Streptococcus* (los presentes no son fecales, presuntamente), *Staphylococcus* y bacterias indicadoras fecales.

La **leche natural** presenta un elevadísimo crecimiento bacteriano (más de 3×10^7 UFC/ml) en el medio TSA debido a que en este medio crecen todo tipo de bacterias. Igualmente presenta valores elevados en todos los cultivos siendo menor el valor de las bacterias lácticas o *Streptococcus* (KAA) que el de las bacterias contaminantes como *Staphylococcus* o la familia *Enterobacteriaceae*. Las BAL se encuentran en un número menor frente a las bacterias contaminantes porque existe una competición entre bacterias en las que las contaminantes se ven favorecidas frente al desarrollo de las BAL. Si se tratara de leche cruda de vaca para consumo el límite establecido para la presencia de gérmenes es de 5×10^4 por mililitro (a 30°C) (Pascual & Calderón, 2000). Aunque no procedan del mismo animal, los umbrales de tolerancia son similares. Si la muestra analizada estuviera como producto listo para consumo, no pasaría los controles de calidad porque supera de forma exagerada los límites establecidos y presenta bacterias contaminantes como son *Staphylococcus* y las indicadoras fecales.

Según Pascual & Calderón (2000), la **leche pasteurizada** (independientemente de si es alta o baja pasteurización) tiene como límite máximo de bacterias presentes $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ por ml; cumpliéndose que hay ausencia de coliformes y de bacterias patógenas. De acuerdo con los resultados, hay una flora bacteriana de $4,8 \times 10^3$ UFC/ml, es decir, por debajo del umbral, pero sí hay presencia de coliformes. Por tanto, no cumple con los requisitos establecidos y no sería apta para su consumo. Si en este alimento se demostrara la presencia de *Salmonella* (como se menciona en la

discusión), independientemente de otras bacterias contaminantes, el alimento ya no sería apto. La dosis efectiva para producir la enfermedad se asume que es elevada, pero basta la presencia de 1-10 células de dicha bacteria para que se pueda desencadenar la infección; la presencia de *Salmonella* en los alimentos es inaceptable (Yousef & Carlstrom, 2006).

La **leche UHT** confirma que durante su procesado se eliminaron los microorganismos presentes. Según Pascual & Calderón (2000), sería posible que no se eliminara la microbiota en su totalidad, admitiendo el límite máximo en 100 bacterias/ml en un cultivo de 15 días a 30°C.

➤ Queso

Al no conocer cómo se ha elaborado, no se sabe si proceden de leche cruda o pasteurizada; pero se asume esta última debido a que es la utilizada habitualmente (Bamforth, 2005).

En todos los alimentos sólidos analizados, las BAL se encuentran en una concentración similar, a excepción del queso azul que presenta una cantidad inferior. Aparentemente no se observan diferencias significativas en lo que a grado de maduración se refiere. No ocurre lo mismo al analizar los resultados para los microorganismos contaminantes. Los quesos QC, QOS, y QVS son los que mayor cantidad de bacterias presentan (2×10^7 UFC/g; $> 3 \times 10^6$ UFC/g y $8,3 \times 10^7$ UFC/g, respectivamente).

El **queso azul** es el único que no presenta contaminación por enterobacterias ni *Staphylococcus*. Tampoco hay presencia de *Streptococcus* fecales (o *Enterococcus*). Esto quiere decir que aparentemente no hay contaminación en el producto. Hay que destacar que para su maduración del queso se adicionan microorganismos no bacterianos, por ejemplo se adiciona *Penicillium roqueforti* (Bamforth, 2005). Al no ser un microorganismo bacteriano no se aísla en el cultivo.

Según Pascual & Calderón (2000) y de acuerdo con la Orden de 29 de noviembre de 1985 (B.O.E. 6-12-85), en el queso fresco y blancos pasteurizados se establecen los siguientes umbrales de tolerancia, cuando solo hay una unidad de análisis: para *Enterobacteriaceae* totales es de 1×10^4 UFC/g; para *E. coli*, 1×10^3 UFC/g; ausencia de *Salmonella-Shigella* y para *S. aureus* enterotoxigénico, 1×10^3 UFC/g.

En los resultados obtenidos en **queso fresco**, se supera este límite ya que se obtiene más de 3×10^5 UFC/g y presenta coliformes en una cantidad superior a 3×10^5

UFC/g. Al realizar el RTP en general para todo el medio, no se puede determinar la cantidad que correspondería a *E. coli* y a *Enterobacter* (según la identificación presuntiva). Pero suponiendo que aparecieran al 50% cada bacteria ya se superaría el límite establecido; debería suponer un 1% de las bacterias crecidas, lo cual es poco probable. De todas formas al superar los límites establecidos no sería un alimento apto para el consumo.

En el **queso de cabra** se supera el límite máximo de *Enterobacteriaceae* totales porque se obtiene más de 3×10^5 UFC/g y además, todas ellas son bacterias coliformes. El RTP se realiza para todas las bacterias del medio, por lo que no hay un valor determinado para *E. coli*. Pero suponiendo que aparecieran al 50% cada bacteria ya se superaría el límite establecido; debería suponer un 1% de las bacterias crecidas, lo cual es poco probable. De todas formas al superar los límites establecidos no sería un alimento apto para el consumo.

En el **queso de oveja curado** se obtiene un resultado para los *Enterobacteriaceae* totales de más de 3×10^4 UFC/g por lo que se superaría el límite establecido. No hay presencia de *E. coli* pero sí de bacterias coliformes. En el queso de oveja semicurado también se supera el umbral establecido para *Enterobacteriaceae* totales porque se obtiene más de 3×10^5 UFC/g y hay presunta presencia de *Salmonella* o *Shigella*. La mera presencia de *Salmonella* ya es inaceptable en un alimento puesto que con la presencia de 1-10 bacterias ya se puede desencadenar la infección (Yousef & Carlstrom, 2006).

El **queso de vaca graso** muestra un valor de $1,76 \times 10^4$ UFC/g para las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, por lo que se supera el límite máximo permitido. Presuntamente no hay presencia de *E. coli*; pero sí de *Salmonella-Shigella*, por lo tanto se incumple los requisitos establecidos por Pascual & Calderón (2000) y la Orden de 29 de noviembre de 1985 (B.O.E. 6-12-85). Además de que la presencia de *Salmonella* es inaceptable por el riesgo a que se desarrolle la infección en el consumidor.

El **queso de vaca semicurado** supera el límite de *Enterobacteriaceae* totales porque se cuantificaron más de 3×10^5 UFC/g y el límite se estableció en 1×10^4 UFC/g. Presuntamente no hay aislamiento de *E. coli* pero sí de otra coliforme. Sí hay presencia de *Salmonella-Shigella*, por lo tanto se incumple los requisitos establecidos por Pascual & Calderón (2000) y de acuerdo con la Orden de 29 de noviembre de 1985 (B.O.E. 6-12-85). Además de que la presencia de *Salmonella* es

inaceptable por el riesgo a que se desarrolle la infección en el consumidor con la mera presencia de 1-10 bacterias (Yousef & Carlstrom, 2006).

Los quesos de oveja presentan diferente grado de maduración (curado y semicurado) y, por lo tanto, se espera diferencias en cuanto a la flora bacteriana que presentan. Así lo muestran los resultados, la diferencia entre los quesos es de un crecimiento diez veces mayor en el queso semicurado que en el curado. Para evaluar si estas diferencias son significativas habría que realizar más réplicas de los cultivos para tener valores a comparar.

En el caso de los quesos de vaca también hay diferentes grados de maduración (fresco, semicurado y muy curado), es por ello que se esperan diferencias en la cantidad de bacterias presentes en ellos. Atendiendo a los resultados, no se observan grandes diferencias; sí se obtiene que en el queso más curado (graso) el crecimiento es menor pero no tan evidente como la mencionada en el queso de oveja.

6. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los alimentos analizados (su naturaleza y procesado) y como ya se ha comentado, era de esperar la presencia de una determinada cantidad de bacterias, las BAL y aquellos microorganismos adicionados en el proceso de elaboración del queso. La presencia de bacterias ajenas al proceso de elaboración y maduración denotan contaminación en los alimentos, bien durante el proceso industrial, bien en el punto de venta al consumidor. En líneas generales se puede concluir:

1. Para una mayor representación de los datos, y si el objetivo hubiera sido una evaluación de calidad, se deberían haber realizado más réplicas y añadir controles. De esta forma se podrían realizar análisis estadísticos.
2. La leche presenta menor cantidad de bacterias ácido lácticas que los quesos, esto se debe a la adición de cultivos iniciadores y no iniciadores en los quesos y a la pasteurización en la leche.
3. La contaminación en los quesos es mayor que en las leches porque son manipulados por el personal del punto de venta. En cambio, la leche solo es

procesada para su pasteurización y luego envasada en condiciones asépticas.

4. En muchos casos hay problemas de identificación debido a que las bacterias aisladas muestran unos resultados que no son los esperados, de forma que aparecen gramnegativos o grampositivos donde su crecimiento está inhibido. La causa más probable es errores en el procesado de las muestras o unas malas prácticas en el laboratorio, dado que el crecimiento o no en los medios es una cuestión química que depende de la naturaleza de la bacteria únicamente

De los resultados obtenidos y discutidos al analizar los diferentes tipos de leches, se puede concluir:

1. El proceso de pasteurización reduce en gran medida la carga microbiana del alimento, siendo total en la pasteurización UHT.
2. La leche natural analizada no es apta para consumo por la contaminación presente y porque no fue sometida a ningún tipo de tratamiento de refrigeración que ralentizara el crecimiento. El objetivo de analizarla era mostrar la diferencia entre el producto natural y los aptos para consumo.
3. La leche de alta pasteurización es una leche que se puede adquirir en los puntos de venta, pero al haber presencia de bacterias contaminantes que sobrepasan los límites de tolerancia debería someterse de nuevo a controles de calidad. Aunque al ser un análisis presuntivo, en primer lugar se debería confirmar las bacterias presentes para confirmar la contaminación.
4. La leche UHT confirma que su procesado elimina la carga bacteriana y por tanto es el alimento más seguro de consumo (en comparación con las otras leches analizadas).
5. Se confirma que para una mayor higiene alimentaria y menor riesgo de infección, la pasteurización es necesaria.
6. La contaminación presente en la leche de alta pasteurización, se debe a una mala ejecución en la línea de procesado. Debido a que una vez envasada la leche no puede ser contaminada hasta ser abierta por el consumidor. El envase está diseñado para que no altere las condiciones del producto.

En el queso, las conclusiones extraídas en base a los resultados obtenidos son:

1. Puesto que se realizan controles alimentarios durante la elaboración y curación y que los quesos examinados son obtenidos en puntos de venta al corte, se asume que la contaminación encontrada se debe a la ocurrida en el punto de venta. Aunque también podría deberse a la contaminación endógena del alimento.
2. La contaminación de los productos se debe a la manipulación en puntos de venta, bien por el personal humano, bien por las condiciones de almacenamiento.
3. No se observa diferencias muy significativas en cuanto a la diferencia de maduración de los productos. Por lo que, *a priori*, la maduración no influye en la cantidad y presencia de bacterias lácticas.
4. Existe un elevado grado de contaminación en los quesos en general, pero destaca el queso azul por ser el único sin contaminar (en las condiciones estudiadas).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bamforth, C. W. (2005). *Alimentación, fermentación y microorganismos* (1ª ed.). Zaragoza, España: ACRIBIA, S. A.
2. Bueno, E., García, P., Martínez, B. y Rodríguez, A. (2012). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 23-27.
3. Castro Aranda, A., Ben Omar, N., Lucas López, R., Abriouel Abriouel, H., García Gutiérrez, M. T., Martínez-Cañamero, M., Pérez Pulido, R., Grandes Burgos, M. J. y Gálvez del Postigo, A. (2004). *El género Enterococcus en Microbiología de los Alimentos*. Jaén: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Jaén.
4. Coppola, S., Parente, E., Dumoner, S. y La Peccerella, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait*, 68, 295-310.
5. Drider, D. y Rivera, V. M. (2016). *Bacterias ácido lácticas. Fundamentos y aplicaciones* (1ª ed.). México, México: Alfaomega, S. A.

6. Fonberg-Broczek, M., Arabas, J., Kostrzewa, E., Reps, A., Szczanwiński, J., Szczepek, J., Windyga, B. y Porowski, S. (1999). High pressure treatment of fruit, meat, and cheese products: equipment, methods and results. *Processing Foods. Quality Optimisation and Process Assessment* Oliveira FAR, Oliveira JC, eds, pp 281-300. CRC Press LLC.
7. Fonberg-Broczek, M., Windyga, B., Szczanwiński, J., Szczanwińska, M., Pietrzak, D. y Prestamo, G. (2005). High pressure processing for food safety. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 721-724.
8. Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. y Trevino, E. A. (2007). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico* (12ª ed.). Madrid, España: Médica Panamericana
9. Forsythe, S. J. y Hayes, P. R. (2007). *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP* (2ª ed.). Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, S. A.
10. Giraffa, G., Carinati, D. y Neviani, E. (1997). *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60, 732-738.
11. Karimi, R., Mortazavian, A. M. y Amiri-Rigi, A. (2012). Selective enumeration of probiotic organisms in cheese. *Food Microbiology*, 29, 1-9.
12. Litopoulou-Tzanetaki, E. (1990). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri Cheese. *Journal of Food Science*, 55, 111-113
13. López-Díaz, T. M., Santos, J. A., González, C. J., Moreno, B. y García, M. L. (1995). Bacteriological quality of traditional Spanish blue cheese. *Milchwiss*, 50, 503-505.
14. Moreno, M. y Alarcón, A. (2010). Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. *Revista Médica Clínica Condes*, 21(5), 749-755.
15. Ordóñez, J. A., Barneto, R. y Ramos, M. (1978). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwiss*, 33, 609-612.
16. Pascual Anderson, M. R. y Calderón y Pascual, V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas* (2ª ed.). Madrid, España: Díaz de Santos, S.A.
17. Ruíz, M. J., Colello, R., Padola, N. L. y Etchevarría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus spp.* Sobre bacterias implicadas en enfermedades

- transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174-177.
18. Shakeel-Ur-Rehman, Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2000). Methods used to study non-starter microorganisms in cheese: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 53, 113-119.
 19. Teuber, M., Perretenm, V. y Wirsching F. (1996). Antibiotikum-resistente Bakterien: Eine neue Dimension in der Lebensmittel-mikrobiologie. *Lebensmitteltechnologie*, 29, 182-199
 20. Thompson, T. L. y Marth, E. H. (1986). Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora – coliforms, *enterococci*, anaerobes, propionibacteria and *staphylococci*. *Milchwiss*, 41, 201-204.
 21. Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J. y Huys, G. (2006). *International Dairy Journal*, 16, 1470-1476.
 22. Vinderola C, G. y Reinheimer, J. A. (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36,895-904.
 23. Williams, L. y Wilkins, Inc. (2000). *MacFaddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (3ª ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.
 24. Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C. y Woods, G. L. (2006). *Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color* (6ª ed.). recuperado de <https://books.google.es/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
 25. Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. y Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.
 26. Yousef, A. E. y Carlstrom, C. (2006). *Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, S. A.
 27. Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, M. y Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

➤ **Documentos obtenidos online**

<http://boe.es/boe/dias/1966/10/07/pdfs/A12690-12699.pdf>

<http://boe.es/boe/dias/1985/12/06/pdfs/A38613-38613.pdf>

<http://boe.es/boe/dias/1987/02/20/pdfs/A05108-05109.pdf>

<http://boe.es/boe/dias/1987/02/20/pdfs/A05113-05115.pdf>

<http://boe.es/boe/dias/1987/02/20/pdfs/A05115-05116.pdf>

<https://boe.es/boe/dias/1967/10/17/pdfs/A14180-14187.pdf>

<https://www.boe.es/buscar/pdf/2006/BOE-A-2006-17436-consolidado.pdf>

Norma General para el uso de términos lecheros. *Codex Standard* 206-1999. En:

[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B206-1999%252FCXS_206s.pdf)

[proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B206-](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B206-1999%252FCXS_206s.pdf)

[1999%252FCXS_206s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B206-1999%252FCXS_206s.pdf)

Norma general para el queso. *Codex Standard* 283-1978. En: [http://www.fao.org/fao-](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf)

[who-codexalimentarius/sh-](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf)

[proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B283-](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf)

[1978%252FCXS_283s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B283-1978%252FCXS_283s.pdf)

Reglamento Sanitario de los Alimentos DTO. N° 977/96(D.OF. 13.05.97). En

www.minsal.cl