



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos lácteos

Alumno: Ana Belén Gallego Bellón

Junio, 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis Microbiológico de productos lácteos

Alumno: Ana Belén Gallego Bellón

Junio, 2016

ÍNDICE

1	RESUMEN	5
2	ABSTRACT	5
3	INTRODUCCION	6
3.1	Tipo de productos lácteos	7
3.2	Microorganismos en productos lácteos	9
3.2.1	Bacilos Gram positivos	9
3.2.2	Cocos Gram positivos	10
3.2.3	Bacilos Gram negativos	11
3.2.4	Levaduras y mohos.....	13
3.3	Posibles vías y causas de contaminación de los productos.....	14
3.4	Mecanismos para la eliminación de los microorganismos.....	16
3.5	Controles.....	17
3.6	Brotos epidémicos.....	18
4	OBJETIVOS	20
5	MATERIAL Y METODOS	21
5.1	Material utilizado	21
5.2	Recogida de muestras	21
5.3	Preparación del material	22
5.3.1	Medios de cultivo	22
5.3.1.1	Medio General	22
5.3.1.2	Medios selectivos.....	23
5.3.2	Solución salina.....	26
5.4	Procesamiento de las muestras	26
5.4.1	Diluciones en solución salina.....	26
5.4.2	Siembra en las placas.....	27

5.5	Recuento de las placas	28
5.6	Tinción de Gram y prueba de la catalasa.....	29
5.7	Análisis estadístico.....	30
6	RESULTADOS	31
6.1	Recuento microbiano de las colonias.....	31
6.2	Características macroscópicas	32
6.3	Tinción de Gram.....	36
6.4	Prueba de la catalasa.....	39
6.5	Estudios comparados.....	40
7	DISCUSION	42
8	CONCLUSIONES.....	44
9	BIBLIOGRAFIA	45

1 RESUMEN

Los productos lácteos, esenciales en la dieta humana, constituyen un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de microorganismos y pueden causar intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. En este estudio, se han analizado diferentes tipos leches y quesos de empresas ganaderas de la provincia de Ciudad Real, y de leche fermentada por kéfir. Se ha llevado a cabo un control microbiológico, para analizar y comparar la carga microbiológica de los distintos productos y se ha realizado una identificación preliminar de los microorganismos que se encuentran en los alimentos. De acuerdo con nuestros resultados, las leches crudas presentan una carga microbiana significativamente superior a las pasteurizadas pero esta diferencia no se mantiene en los quesos obtenidos a partir de ambas. También se ha detectado un recuento significativamente superior en quesos que en leches, principalmente debido al desarrollo de bacterias lácticas en los productos fermentados.

2 ABSTRACT

Milk and dairy products can be a source of infectious microorganisms and toxins, and a considerable number of foodborne diseases have been associated with them. In this study milks and cheeses from cattle farming in the province of Ciudad Real have been analyzed, as well as fermented milk Kefir. This study was conducted to estimate the microbial content of different milks and dairy products as well as the influence of fermentation and pasteurization on the microbial content and diversity. Higher microbial counts were found in samples from raw milk than in pasteurized milk, although cheeses from both types of milk showed similar microbial content. Significantly higher counts were also found in samples from cheeses compared to milk, mainly due to the growth of lactic acid bacteria in the final product.

3 INTRODUCCION

Hoy en día, los avances industriales han logrado el desarrollo de la industria láctea y permiten que los productos derivados de la leche estén al alcance de toda la población. Los productos lácteos se han convertido en un alimento esencial para la dieta de los humanos.

El principal lácteo es la leche, es una secreción natural de la glándula mamaria de los animales mamíferos. Ésta se obtiene a partir del ordeño de estos animales (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

La composición nutricional media de la leche se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes de la leche. Tabla adaptada de los libros (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

Agua	87%
Proteínas	3,5% de los cuales 2,7% es caseína
Lípidos	3,5-4%
Glúcidos	5,1% de los cuales 4,9% es lactosa
Sales minerales	0,7% (Sodio, potasio, calcio, hierro, magnesio, fósforo, cloruros y ácido cítrico)
pH	6,5 - 6,7

La composición variará según la raza o incluso entre individuos de la misma raza. También va a influir la alimentación, edad, estación del año y de la fase de lactación en que se encuentre el animal (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

Gracias a esta composición nutricional la leche es un alimento completo para la dieta del ser humano, pero esta composición también hace que sea un medio excelente para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Además de contener una gran cantidad de agua y una variedad de nutrientes, el pH hace que el medio sea favorable al crecimiento de microorganismos, mohos y levaduras (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005; Montville y Matthews, 2005b).

La leche, al ser un alimento principal en la dieta de los humanos, es un excelente vehículo de transmisión de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. Ésta puede transportar una gran variedad de microorganismos, como *Brucella*, *Salmonella*, *Escherichia coli enteropatógena*, *Listeria monocytogenes*, entre otros muchos más

(Pascual y Calderón, 1999). Sin embargo, investigaciones de enfermedades transmitidas por alimentos han demostrado que hay otros productos animales más propensos a causar brotes epidémicos que los productos lácteos (Gráfico 1). Una investigación en Estados Unidos entre 1990 y 2001 constató que de 1589 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos sólo 65 fueron causados por productos lácteos (De Buyser *et al*, 2001). La mayor causa de estos brotes fue por el consumo de leche cruda (ICMSF, 2005).

3.1 Tipo de productos lácteos

Hoy en día, hay una gran diversidad de productos lácteos, desde los más simples, como puede ser la leche cruda del ordeño, a quesos maduros, los cuales necesitan un procedimiento más complejo para su elaboración.

La leche se define como el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de animales sanos y bien alimentados (Decreto 2478/1966, 6 de octubre, B.O.E. 7-10-66; Pascual y Calderón, 1999). A partir de esta leche se elabora el resto de los productos derivados.

✓ La leche cruda es la leche natural que no ha sido sometida a tratamientos térmicos superiores a 40°C, ni a ningún tratamiento con efecto equivalente (Real Decreto 1679/1994, 22 de julio, B.O.E. 24-9-94; ICMSF, 2005).

✓ La leche pasteurizada es la leche natural, sometida a un proceso térmico adecuado que asegure la destrucción de los gérmenes patógenos y casi la totalidad de la flora banal, sin modificación sensible de su naturaleza físico-química, características biológicas y cualidades nutritivas (Orden de 11 de febrero de 1987, B.O.E. 20-2-87; Pascual y Calderón, 1999).

✓ El calostro es la secreción de los primeros días tras el parto. Es una leche rica en proteínas, y sobre todo de inmunoglobulinas destinadas a proteger al rumiante recién nacido, proporcionándole inmunidad pasiva, frente a las infecciones y a gérmenes patógenos (Bondi, 1988; ICMSF, 2005).

✓ El queso es el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, obtenido de la separación del suero después de la coagulación de la leche natural por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados (Orden de 29 de noviembre de 198, B.O.E. 6-12-85; Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005). Hay una amplia gama de tipos de quesos.

-Queso fresco. Es el queso sin madurar, que no ha sufrido ninguna transformación ni fermentación, excepto la láctica. Éste está dispuesto para el consumo del cliente al finalizar el proceso de fabricación (Orden de 29 de noviembre de 1985, B.O.E. 6-12-85; Pascual y Calderón, 1999). Estos quesos se pueden realizar con leche pasteurizada o con leche cruda.

- Queso maduro. Es el queso que además de fermentación láctica ha sufrido otras transformaciones y fermentaciones (Pascual, 1982). Tras el proceso de fabricación requiere mantenerse durante un tiempo a una temperatura y condiciones determinadas para que se produzcan los cambios físico-químicos y característicos del queso. Una variedad de estos quesos es aquel que es curado o madurado con mohos. Éste se elabora principalmente por la presencia de mohos en el interior o en la superficie del queso (Orden de 29 de noviembre de 1985, B.O.E. 6-12-85; Pascual y Calderón, 1999).

✓La fermentación. Según Luis Pasteur la fermentación es la vida en ausencia de oxígeno. Sin embargo, esta es una definición general, otra más específica es que la fermentación es el proceso que usa la bacteria para crear energía a partir de los hidratos de carbono en ausencia de oxígeno. La mayoría de los alimentos fermentados se obtienen por procesos biológicos donde los microorganismos generan energía cambiando las propiedades de los alimentos en ausencia de oxígeno. Hay excepciones donde la fermentación se produce en presencia de oxígeno, como es el caso de la fermentación del vinagre (Montville y Matthews, 2005a).

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche por bacterias ácido lácticas, por hongos o por ambos (ICMSF, 2005; Codex Alimentarius, 2011). Un ejemplo de leche fermentada por ambos es el kéfir.

El kéfir está constituido por unos granos de forma irregular, blancos o amarillentos, de consistencia elástica, con un diámetro muy variable (1mm - 3cm). Generalmente, su microflora está constituida por un 65-80% de *Lactobacillus* (*Lactobacillus kefir*) y el 20-35% restante por *Streptococcus*, *Lactococcus* y diferentes especies de levaduras oxidativas y fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces cerevisiae* y *Candida kefir*) (Early, 1998c; Codex Alimentarius, 2011). Estos microorganismos se encuentran bien organizados dentro de los granos de kéfir, en las capas periféricas están los *Lactobacillus*, mientras que a medida que se avanza hacia el centro va aumentando el número de levaduras (Ordoñez, 1998b).

3.2 Microorganismos en productos lácteos

En los productos lácteos podemos encontrar una gran diversidad de microorganismos, se van a clasificar según su morfología y tipo de pared celular (Gram positivos o negativos).

3.2.1 Bacilos Gram positivos

✓ Listeria monocytogenes. No esporulado y anaeróbico facultativo. Puede crecer a una temperatura de 30 a 37°C (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009). Esta bacteria es halotolerante, por lo que puede crecer a temperaturas de -1,5°C, aunque se considera termosensible y se destruye en la pasteurización (Early, 1998a).

Esta bacteria produce la enfermedad conocida como listeriosis. Los síntomas que puede causar son septicemia, meningitis, encefalitis y abortos espontáneos. La población con mayor riesgo de contraer la enfermedad son los individuos inmunodeprimidos, como mujeres embarazadas, pacientes de SIDA, pacientes con cáncer, niños y ancianos. En mujeres embarazadas *L. monocytogenes* puede atravesar la placenta y dar lugar a un aborto o infección en el feto, más frecuente si la infección ocurre en el tercer trimestre de gestación (Buncic, 2006b).

En los productos lácteos, es especialmente peligroso en quesos elaborados con leche cruda y en quesos madurados con mohos.

✓ Bacillus cereus. Esporulado y aeróbico. Crece a temperaturas de 4 a 37°C y a pH de 4,3-9,3 (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009). Las células vegetativas de esta bacteria son destruidas con la pasteurización, pero sus esporas son termorresistente y pueden sobrevivir a altas temperaturas (Early, 1998a).

Esta bacteria puede causar dos enfermedades importantes:

- Síndrome emético, es una intoxicación. Los síntomas que causa son: náuseas, vómitos, malestar general y puede aparecer diarrea. La toxina emética es muy resistente al calor y a las soluciones ácidas (Buncic, 2006b).

- Síndrome diarreico, es una toxiinfección. Puede causar náuseas, dolor abdominal y diarrea acuosa. Se necesita ingerir esporas o células vegetativas para contraer la enfermedad. La bacteria se multiplica en el intestino y produce la toxina (Buncic, 2006b).

✓ *Clostridium botulinum*. Esporulado y aeróbico estricto. Crece a una temperatura de entre 20 y 45°C y a pH de 4,6 - 5. Las células no son muy resistentes a la temperatura pero las esporas sí lo son (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

Este microorganismo es el causante de dos enfermedades:

- Botulismo, es una intoxicación. Los síntomas son náuseas y vómitos, continuados de mareos, dificultad para tragar y hablar, visión borrosa y dolor de cabeza. Finalmente, puede manifestarse debilidad muscular y parálisis respiratoria, con una tasa de mortalidad del 30-60% de los pacientes hospitalizados (Buncic, 2006b).

- Botulismo infantil, es una toxiinfección. Produce síntomas neuronales, estreñimiento, llanto débil, y problemas respiratorios. La enfermedad comienza con la ingestión del microorganismo, que se multiplica en el intestino y produce la toxina (Buncic, 2006b).

✓ *Lactobacillus*. Pertenece al orden *Lactobacillales* y son las denominada bacterias del ácido láctico (BAL). No esporulado, habitualmente anaeróbico facultativo o microaerófilo (requiere niveles bajos de oxígeno) (Forbes *et al.*, 2009). Crece a temperatura de 30-43°C y a pH 4,5 - 6,4 (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

Este tipo de microorganismo se usa para la elaboración de quesos (queso suizo o italiano), vegetales fermentados, yogurt y kéfir, ya que fermenta los azúcares y produce ácido láctico (Bamforth, 2005).

En general los *Lactobacilos* desarrollando tipos de fermentación: homofermentativa, solo producen ácido láctico (*L. lactis* en queso), y heterofermentativa, producen ácido láctico y además otros ácidos y gases (*L. brevis* en kéfir) (Ordoñez, 1998c).

3.2.2 Cocos Gram positivos

✓ *Staphylococcus aureus*. No esporulado, anaeróbico facultativo o aeróbico y catalasa +. Crece a temperaturas de 7-48,5°C y pH de 4,2-9,3. La bacteria es destruida con la pasteurización. Sin embargo, la toxina es muy resistente, sólo a 100°C durante 30 min es posible destruirla (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009). Generalmente, se necesita un gran número de *S. aureus*, para que se produzca esa toxina, por lo que, al no crecer bien la bacteria a bajas temperaturas, una buena higiene y un control correcto de la temperatura en los alimentos, reducen las posibilidades de contaminación (Early, 1998a).

Esta bacteria es el agente causal de la intoxicación estafilocócica de transmisión alimentaria. Los síntomas típicos son náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, sudoración, dolor de cabeza y en ocasiones descenso de la temperatura corporal. (Buncic, 2006b).

✓ Orden *Lactobacillales*. Son bacterias del ácido láctico. No esporuladas, anaeróbico facultativo y se disponen en cadenas. Producen una fermentación homofermentativa (Willey *et al*, 2009). En este orden destacan como cocos Gram positivos:

- *Streptococcus*. Crece a temperaturas de 35-37°C. Se utiliza en la producción de quesos, por ejemplo *S. thermophilus*. Aunque hay algunos que están relacionados con mastitis en el ganado.

- *Lactococcus*. Crece a temperaturas de 18-30°C. Un ejemplo es *L. lactis* empleado en la fabricación de quesos (Ordoñez, 1998c; Bamforth, 2005).

3.2.3 Bacilos Gram negativos

✓ *Enterobacteriaceae*. Grupo de bacterias no esporulados y facultativos anaeróbico. Se suelen encontrar en agua, tracto intestinal, excrementos de animales, asociados a procesos de mastitis y maquinaria de ordeño. Afecta sobre todo a bebés contaminados por el consumo de leche en polvo (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009). Dentro de esta familia se encuentran:

- *Salmonella spp.* Puede crecer a temperaturas entre 7 y 48°C y a pH de 3,8-9,5. Es bastante resistente al frío, a las bajas concentraciones de agua y puede sobrevivir durante varios años en los alimentos. Sin embargo, no es resistente al calor, con la pasteurización es destruida normalmente (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

Salmonella es uno de los microorganismos más frecuentes como causa de intoxicación alimentaria. A pesar de que se destruye en la pasteurización, *Salmonella* puede encontrarse en el entorno ambiental y llegar al producto con posterioridad al tratamiento térmico (Early, 1998a).

Salmonella puede producir dos tipos de enfermedades:

Salmonelosis. La bacteria se transmite al medio ambiente y a los alimentos a través de las heces. Los síntomas que causa son fiebre moderada, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, dolor en las extremidades, dolor abdominal y diarrea. Como complicaciones de la infección se pueden dar artritis reactiva, síndrome de

Reiter e infección sistémica. Puede ser grave en niños, ancianos y en personas inmunodeprimidas (Buncic, 2006b).

Fiebre tifoidea y paratifoidea Los síntomas característicos son fiebres, dolor de cabeza, sensibilidad abdominal, estreñimiento, sarpullido en el cuerpo, y también puede aparecer diarrea (Buncic, 2006b).

- *Yersinia enterocolitica*. Crece a temperaturas de entre -2 a 42°C y a pH menores de 4,6. Es bastante resistente al frío y puede vivir largos periodos de tiempo en los alimentos, pero es sensible al calor, por lo que con la pasteurización es destruida (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

Produce una infección denominada yersiniosis, que cursa con dolor abdominal, fiebre y diarreas. Como complicación puede causar artritis reactiva, síndrome de Reiter y septicemia. La población con mayor riesgo son los niños, ancianos y las personas inmunodeprimidas (Buncic, 2006b).

- *Escherichia coli*. Crece en temperaturas de 7- 45°C y a pH de 4,4 a 9. No es termorresistente, por lo que, se destruye durante con la pasteurización (Buncic, 2006b; Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

E. coli pertenece a un grupo denominado coliformes, son aquellas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que fermentan la lactosa y no son necesariamente enteropatógenas. Son indicadores de contaminación fecal (Pascual, 1982; Pascual y Calderón, 1999).

Esta bacteria causa toxiinfecciones, que da lugar a enfermedades entéricas y/o sistémicas. Los síntomas de la infección son diarrea acuosa, colitis hemorrágica, dolor abdominal agudo y, a veces, vómitos. Una complicación de la infección es el síndrome urémico hemolítico (SUH), con fallo renal, leucopenia y anemia. La población en riesgo son los niños pequeños, y los ancianos (Early, 1998a; Buncic, 2006b).

✓ *Brucella spp.* No esporulado y aeróbico. Crece a una temperatura de 37°C (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

Esta bacteria produce la enfermedad de la brucelosis y los síntomas son fiebre intermitente, sudoración, síntomas digestivos, lesiones osteolíticas o derrames articulares, síntomas respiratorios, manifestaciones cutáneas, neurológicas o cardiovasculares. Se conoce también como fiebre de Malta en las personas o enfermedad de Bang, en animales.

Varios ejemplos de este género son *Brucella abortus* (ganado vacuno) y *B. melitensis* (ovejas y cabras) (Buncic, 2006b).

✓ *Pseudomonas*. No esporulado, aerobio obligado y se disponen en parejas. Crece a temperaturas de 25- 30°C. Algunos miembros del género son psicrófilos, son capaces de crecer a temperaturas inferiores de 5°C (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009). Son destruidos con la pasteurización.

Cuando estas bacterias se desarrollan en gran número antes del tratamiento de la leche, secretan enzimas que originan defectos del sabor o problemas de estabilidad física durante la posterior conservación de los productos pasteurizados, aunque hayan sido destruidos en el tratamiento térmico (Early, 1998a).

✓ *Campylobacter jejuni*. Bacilo con forma de espiral, no esporulado y microaerófilo. Crece entre temperaturas de 30 y 45°C y a pH de 6,5 - 7,5. Son muy sensibles al calor, a temperaturas superiores a 48°C, por lo que se destruye con la pasteurización (Chandan *et al.*, 2008; Fernandes, 2009).

Esta bacteria produce una infección denominada campilobacteriosis. Los síntomas son fiebres, malestar, dolor abdominal, diarrea y dolor de cabeza. Las complicaciones de la infección pueden dar lugar a una artritis reactiva o síndrome de Guillain-Barré. La campilobacteriosis es común en niños e individuos jóvenes.

La bacteria se encuentra en el intestino del ganado y se transmite a través de las heces y de las aguas contaminadas con materia fecal, sino hay una buena higiene puede contaminarse la leche. Las personas pueden ser portadoras asintomáticas ocasionalmente (Buncic, 2006b).

3.2.4 Levaduras y mohos

Son organismos heterótrofos bastante sencillos. Los mohos pueden crecer cuando hay poca disponibilidad de agua y a valores bajos de pH. Sin embargo, las levaduras pueden crecer en ausencia de oxígeno. La mayoría de las levaduras no fermentan la lactosa de la leche, pero pueden utilizar otros carbohidratos fermentables.

La mayor parte de las levaduras y mohos se destruyen en los tratamientos de pasteurización en la industria láctea. Sin embargo, estos microorganismos pueden alterar estos productos antes del tratamiento térmico (Early, 1998a).

3.3 Posibles vías y causas de contaminación de los productos

La leche aunque proceda de animales sanos y se haya obtenido en las mejores condiciones higiénicas, es siempre susceptible de contaminación en mayor o menor grado (Pascual y Calderón, 1999). Esta contaminación puede deberse a muchas razones:

✓ La leche se retiene en el interior de la ubre hasta el ordeño del animal. Las primeras porciones extraídas son siempre las más contaminadas por su proximidad al pezón. Éste puede ser una puerta de entrada a los microorganismos, normalmente gérmenes saprofitos del pezón y de los canales galactóforos. Pueden desarrollarse en la leche en grandes cantidades y causar enfermedades o toxiinfecciones alimentarias a las personas (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

✓ Situaciones anormales debidas a infecciones o enfermedades del animal pueden aumentar el número de microorganismos en la leche. Una enfermedad importante en los animales es la mastitis, es una enfermedad inflamatoria del tejido mamario. Puede ocasionar la llegada de un elevado número de microorganismos y células somáticas a la leche. Los microorganismos más frecuentes en la mastitis son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. El número de microorganismos que llegan a la leche varía según el estadio de la mastitis en que se encuentre el animal (Early, 1998b; ICMSF, 2005).

✓ Los agentes zoonóticos pueden influir en la contaminación de la leche, ya que los insectos pueden infectar a los animales e introducirles algunos microorganismos como puede ser, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *L. monocytogenes* o *Salmonella spp.* (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

✓ Los piensos que los animales comen pueden estar contaminados y ser una fuente de transmisión importante de patógenos al animal. Un ejemplo es *Salmonella spp.* (Buncic, 2006b).

✓ Al extraer la leche de la ubre queda expuesta a las contaminaciones exteriores. La primera contaminación dependerá de la suciedad del pezón, si éstos están sucios de tierra, estiércol, material de las camas, etc., puede causar una gran contaminación en la leche. Pero si se han limpiado y secado correctamente antes del ordeño, la tasa de bacterias en la leche se reduce considerablemente (Ordoñez, 1998c).

✓El sistema de ordeño, es una de las principales vías de contaminación de la leche. Si este sistema no tiene una limpieza eficiente se pueden acumular nutrientes en la maquinaria que favorecen el crecimiento de microorganismos como: *Lactococcus*, coliformes y otros microorganismos Gram negativos como *Pseudomonas*. Por lo tanto, el número y el tipo de microorganismos que aparezcan en la leche cruda dependerán del grado de limpieza y desinfección de la maquinaria (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

✓Las aguas del suministro de la granja contienen, con frecuencia, coliformes y microorganismos psicrótrofos (*Pseudomonas*). Cuando el agua se utiliza para limpiar el equipo y lavar a los animales puede ser una fuente de contaminación de la leche (Ordoñez, 1998c; Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

✓La contaminación del aire, polvo, suelo y camas de los animales también puede influir. Los microorganismos que se encuentran normalmente en el aire son esporas de *Bacillus* y *Clostridium spp.* (ICMSF, 2005). También miembros del género *Bacillus* se pueden encontrar en el suelo y *Enterobacteriaceae* en el estiércol. Así como otros microorganismos que alcancen fácilmente la leche (Ordoñez, 1998c; Pascual y Calderón, 1999).

✓Un factor importante es la temperatura. Cuando la leche abandona la ubre tiene una temperatura idónea para el crecimiento microbiano, por lo que es necesario el enfriamiento rápido de la leche para inhibir el crecimiento de los microorganismos. La temperatura ideal para mantener la leche es de valores inferiores a 5°C y mantenerla así hasta el momento de su recogida. Con ello, se reduce eficazmente el desarrollo de las bacterias lácticas y de otras bacterias de crecimiento rápido como los coliformes. Esto no elimina a los microorganismos pero sí reduce el número de bacterias y evita el crecimiento de nuevas (Ordoñez, 1998c; Pascual y Calderón, 1999). El transporte de la leche tiene que hacerse a la misma temperatura.

✓Una pasteurización realizada incorrectamente puede ser la responsable de la alteración de la leche al no destruir los microorganismos que había en el producto crudo. Pero en ocasiones, aunque se realice una buena pasteurización algunos microorganismos pueden sobrevivir, como son los microorganismos esporulados y termorresistentes, *Pseudomonas*, *Bacillus* y coliformes (ICMSF, 2005).

3.4 Mecanismos para la eliminación de los microorganismos

El tratamiento más importante para la eliminación de los microorganismos es la pasteurización. Su objetivo principal es reducir los riesgos que supone para la salud del consumidor la presencia de microorganismos patógenos en los productos crudos. Este tratamiento térmico elimina los microorganismos sin producir cambios químicos, físicos y organolépticos en el producto lácteo (Early, 1998b; Buncic, 2006a). Se puede utilizar dos tipos de tratamiento térmico, una pasteurización baja, 62°C durante 30 minutos, o una pasteurización alta, 72°C durante 15 segundos (Ordoñez, 1998a). Estos tratamientos son válidos para disminuir las poblaciones de bacterias patógenas, aunque hay un grupo de microorganismos que son termorresistentes que pueden sobrevivir a estos tratamientos. A continuación, se enfría a temperaturas menores de 5°C para ampliar la vida útil de la leche (Pascual y Calderón, 1999; ICMSF, 2005).

Hay países donde la leche se vende cruda o se realizan quesos con esta leche. Esta leche, al no someterse a ningún proceso térmico, no se ve reducida la concentración de microorganismos, por lo que puede ser un peligro para la salud de los consumidores. Lo único que se puede hacer con esta leche es disminuir el número de microorganismos. Esto se puede conseguir:

- ✓Manteniendo a la leche entre temperaturas de 0-5°C, esto hace que los microorganismos no crezcan o crezcan de manera más lenta, aunque no los elimina.

- ✓Otras manera de disminuirlos es limpiando la cola, ubre y pezones de los animales y las superficies que estén en contacto antes del ordeño. Aunque hoy en día hay programas de mejora de la higiene de la leche, uno de ellos es el sistema automático de limpieza de la maquinaria (CIP) (Early, 1998b). Con estas mejoras se ha conseguido disminuir el número de los microorganismos presentes en la leche cruda. El uso de este sistema fue revisado por la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1979). En algunos países el recuento inicial de algunas empresas ganaderas antes de la instalación de CIP era mayor de 10^6 UFC/ml, y al instalarlo se ha disminuido a menos de 2×10^4 . En Alemania una investigación en 1977 obtuvo un recuento de 5×10^5 UFC/ml y en 2002 disminuyó a 2×10^4 (Suhren and Reichmunth, 2003; ICMSF, 2005).

3.5 Controles

Para mantener a los productos lácteos libres de patógenos se realiza una serie de controles durante su proceso, para evitar contaminaciones:

✓ Con respecto a la venta de leche cruda se necesitan unas medidas de control muy exigentes. Se les realiza a los animales revisiones periódicas para mantenerlos sanos, y además deben ser alimentados con piensos libre de patógenos (ICMSF, 2005).

✓ En el control de la mastitis se requiere una inspección regular de la leche procedente de la ubre del animal y, si fuese necesario, se daría tratamiento terapéutico con antibióticos al animal enfermo (ICMSF, 2005).

✓ Al ganado hay que vacunarlo contra patógenos, como por ejemplo frente *Campylobacter* y *E. coli*. Si es necesario se le aplicaría al animal una terapia con bacteriófagos basada en virus que atacan a bacterias patógenas específicas.

✓ Existe una Norma Microbiológica para los quesos, por Orden de 29 de noviembre de 1985, B.O.E. 6-12-85. Como norma general, se tomarán 5 unidades del mismo lote, recogidas con utensilios y recipientes estériles. Excepcionalmente, si no fuese posible tomar 5 muestras, por falta de cantidad en el lote, se tomará una unidad como muestra (Pascual y Calderón, 1999). Con esto se consigue evitar las intoxicaciones por el consumo de quesos, sobre todo de *L. monocytogenes* en quesos elaborados con leche cruda.

✓ La limpieza debe comprobarse mediante una inspección realizada por un personal técnico que valore los niveles generales de higiene en la industria. Los controles, para el análisis microbiológico, deben incluir una toma de muestras del entorno, con el objetivo de conocer los posibles riesgos de contaminación cruzada con microorganismos patógenos. Las muestras ambientales, según el tipo de unidad que se va a inspeccionar, pueden ser muestras de suciedad, polvo o agua. Para el análisis de la contaminación del aire se requiere un sistema adecuado para la toma de muestras gaseosas, este control es especialmente importante en las áreas clasificadas con alto riesgo para la detección de la posible presencia de bacterias patógenas. Para comprobar la limpieza de las superficies que están en contacto con los alimentos se realiza un control similar. Generalmente, en la industria láctea los análisis que se realizan son el recuento total de microorganismos viables y de coliformes, pero en algunos casos resulta muy útil conocer los niveles de mohos y levaduras que quedan en las superficies después de la limpieza. También en este

caso, el grado de higiene alcanzado debe evaluarse en función de los riesgos identificados (Early, 1998b).

✓ Los operarios deben realizar prácticas de producción higiénica de la leche y en el manejo apropiado del equipo (ICMSF, 2005).

3.6 Brotes epidémicos

A comienzos del siglo XX, la leche y los productos lácteos fueron la fuente de miles de casos de enfermedades, como brucelosis, fiebre paratifoidea, así como de intoxicaciones alimentarias. Estos casos disminuyeron a partir de 1920, gracias a la aplicación de tratamientos de pasteurización eficaces. Globalmente, los productos lácteos son responsables del 21% de los brotes de enfermedades intestinales infecciosas en que se ha identificado un vehículo alimentario; un 8% se atribuye a la leche y productos lácteos y el 13% a pasteles y helados (Gráfico 1) (Buncic, 2006a).

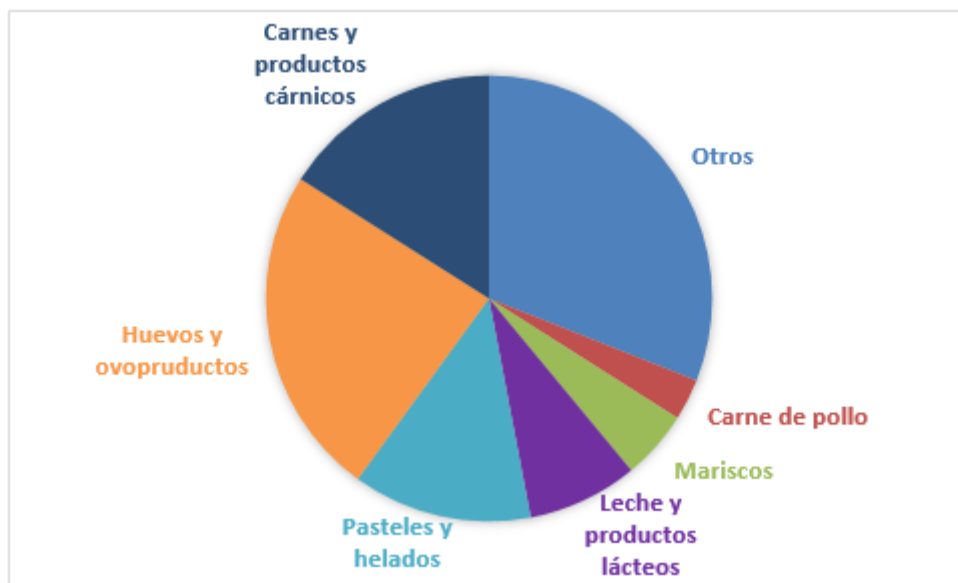


Gráfico 1. Porcentajes de brotes epidémicos en alimentos. Gráfico adaptado de Buncic, 2006a.

Listeria monocytogenes es el microorganismo más frecuente asociado con enfermedades de origen alimentario por consumo de quesos, particularmente de queso elaborado con leche cruda. *L. monocytogenes* es un microorganismo que tiene su origen en el suelo y puede persistir en el ambiente de las industrias lácteas, creando una fuente de contaminación post-pasteurización (Buncic, 2006).

Un ejemplo de brote de listeriosis fue en noviembre de 2000 y enero de 2001, en Carolina del Norte, asociado al consumo de queso casero, elaborado con leche cruda en una lechería local. Hubo 12 casos identificados, 11 eran mujeres con una edad media de 21 años y un hombre de 70 años inmunocomprometido. Diez de las mujeres estaban embarazadas y la infección con *L. monocytogenes* dio lugar a 5 fetos muertos, 3 prematuros y 2 recién nacidos infectados. Un análisis en la lechería donde se elaboró el queso dedujo que pudo haberse originado por contaminación del aire de la sala de elaboración (Rossi *et al.*, 2008).

Escherichia coli también ha sido responsable de brotes epidémicos provocados por consumo de productos lácteos. En 2008 en Connecticut (EE.UU.) se produjo un brote de *E. coli* por consumo de leche cruda, con 14 casos identificados. Y en 2006 en Civitanova Marche (Italia) hubo 15 personas intoxicadas por el consumo de queso hecho con leche cruda de oveja en un restaurante local (Vila y Zboromyrska, 2012).

4 OBJETIVOS

1. Evaluar la carga microbiana en leche de distintos orígenes y productos lácteos derivados.
2. Realizar una identificación preliminar de los microorganismos aislados.
3. Evaluar la influencia del proceso de fermentación de la leche en la cantidad y diversidad de microorganismos.
4. Evaluar la influencia del proceso de pasteurización de la leche en la cantidad y diversidad de microorganismos aislados tanto en el producto fresco como en sus derivados fermentados.

5 MATERIAL Y METODOS

5.1 Material utilizado

✓Recogida del material: tubos esterilizados.

✓Preparación de los medios de cultivo: medios de cultivo (Agar Triptona y Soja, Agar Man, Rogosa y Sharpe, Agar Kanamicina Esculina Azida, Agar Eosina Azul de Metileno y Vogel-Johnson), agua destilada, matraces aforados, probeta, algodón, papel de aluminio, balanza, autoclave, baño termostático, placas de Petri, mechero Bunsen.

✓Preparación de la solución salina: cloruro de sodio, agua destilada, matraz aforado, balanza, eppendorf de 1 ml y gradilla.

✓Procesamiento de las muestras: cámara refrigerada, balanza, homogeneizador, bolsas herméticas.

✓Siembra de las muestras: mechero Bunsen, placas de Petri, asa de siembra, asa de Drigalski, micropipetas, puntas para micropipetas, estufa de cultivo (37°C y 30°C).

✓Tinción de Gram: porta objetos, colorantes (safranina, lugol y cristal violeta), alcohol 96°, agua destilada, microscopio óptico y aceite de inmersión.

✓Prueba de la catalasa: porta objetos y agua oxigenada.

5.2 Recogida de muestras

Este estudio se realizó con 11 tipos diferentes de productos lácteos, todos ellos obtenidos en empresas de la provincia de Ciudad Real.

Leche	Queso
Oveja Manchega	Maduro de cabra
Oveja Lacaune	Mezcla de leche pasteurizado de ambas ovejas
Mezcla de ambas ovejas	Crudo de oveja Manchega
Mezcla de ambas ovejas pasteurizada	Kéfir
Cabra Florida	
Calostros de cabra Florida	
Vaca	

Las leches se recogieron directamente de los tanques de almacenamiento de las empresas ganaderas y se vertieron en frascos estériles para su transporte al laboratorio. Los quesos se obtuvieron en las queserías donde esas empresas ganaderas llevan la leche.

Una vez recogidas las muestras, éstas se conservan en cámara fría hasta su procesamiento.

La mayoría de leches son leches crudas. La leche mezcla es la leche obtenida de la mezcla de la leche cruda de oveja Manchega y de oveja Lacaune. Esta misma leche se ha pasteurizado dando la leche mezcla de ovejas pasteurizada, y de esta leche pasteurizada se elaboró el queso mezcla de oveja. El queso crudo se elaboró con la leche cruda de Oveja Manchega. Y el queso maduro de cabra se realizó con leche cruda de cabra, pero de distinta leche de cabra a la que analizaremos.

También se recogió leche fermentada por kéfir.

5.3 Preparación del material

5.3.1 Medios de cultivo

Antes de comenzar con el procesado de las muestras hay que preparar los medios de cultivo. Se utilizará un medio de cultivo general: Agar Triptona y Soja (TSA) y 4 selectivos: Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRSA), Agar Kanamicina Esculina Azida (KAA), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y Vogel-Johnson (V-J). Todos ellos de la empresa Scharlab (Barcelona) y se prepararán según las instrucciones del fabricante. La preparación del material se realiza siempre al comienzo de la semana.

5.3.1.1 Medio General

El medio general es aquel que favorece el crecimiento de todo tipo de microorganismos sin inhibir a ningún tipo.

Agar Triptona y Soja (TSA)

En TSA van a crecer todos los microorganismos que se encuentren en nuestro alimento. Su contenido es:

- ✓ Digerido Papaínico de Soja.....5,0 g/l
- ✓ Digerido Pancreático de Caseína.....15,0 g/l
- ✓ Cloruro sódico.....5,0 g/l
- ✓ Agar.....15,0 g/l
- ✓ pH: 7,3 ± 0,2

Preparación: según el fabricante el medio TSA se prepara pesando 40 gramos para un litro de solución. Al necesitar 800 ml de medio se pesan 32 gramos de TSA, y a continuación, se enrasa hasta 800 ml de agua destilada.

5.3.1.2 Medios selectivos

Un medio selectivo es aquel que favorece el crecimiento de ciertos microorganismos, mientras que suprime el crecimiento de otros a través de unos inhibidores (Ingraham, 1998; Forbes *et al.*, 2009).

Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRSA)

Se emplea para el crecimiento de bacterias lácticas, bacterias con morfología de bacilo o coco Gram +. Su contenido es:

- ✓ di-Amonio Hidrógeno Citrato.....2,0 g/l
- ✓ Extracto de Carne.....8,0 g/l
- ✓ Extracto de Levadura.....4,0 g/l
- ✓ D(+)-Glucosa.....20,0 g/l
- ✓ Magnesio Sulfato.....0,2 g/l
- ✓ Manganeso(II) Sulfato.....0,05 g/l
- ✓ Peptona Bacteriológica.....10,0 g/l
- ✓ di-Potasio Hidrógeno Fosfato.....2,0 g/l
- ✓ Sodio Acetato.....5,0 g/l
- ✓ Tween 80.....1,0 g/l
- ✓ Agar.....10,0 g/l
- ✓ pH: 6,2±0,2

Se debe almacenar entre 2-8°C, en un lugar seco y sin darle la luz directa.

Preparación: según el fabricante el MRSA se prepara pesando 62 g de MRSA /1l. Al preparar diluciones de 800 ml, se pesan 49,6 gr de MRSA y se enrasa hasta 800 ml de agua destilada.

Agar Kanamicina Esculina Azida (KAA)

Se emplea para la detección de enterococos, con una morfología de cocos Gram +.

Su contenido es:

- ✓ Triptona.....20,0 g/l
- ✓ Extracto de Levadura.....5,0 g/l
- ✓ Sodio Cloruro.....5,0 g/l
- ✓ di-Sodio Citrato.....1,0 g/l
- ✓ Esculina.....1,0 g/l
- ✓ Amonio Hierro(III) Citrato.....0,5 g/l
- ✓ Azida Sódica.....0,15 g/l
- ✓ Kanamicina Sulfato.....0,02 g/l
- ✓ Agar.....10,0 g/l
- ✓ pH final: 7,0 ± 0,2

Se mantiene a temperatura ambiente, 25°C.

Preparación: según el fabricante el medio KAA se prepara con 43 g/l. Por lo tanto, para 800 ml se pesan 34,4 g y se enrasa hasta 800 ml con agua destilada.

Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Se emplea para el aislamiento y detección de enterobacterias, bacterias relacionadas con bacterias del intestino, presentan una morfología bacilar o cocobacilar Gram - (el crecimiento de colonias con brillo metálico en este medio indica la presencia de la especie *Escherichia coli*). Su contenido es:

- ✓ Eosina Amarillenta.....0,4 g/l
- ✓ Azul de Metileno.....0,065 g/l
- ✓ Lactosa.....5,0 g/l
- ✓ Peptona Bacteriológica.....10,0 g/l
- ✓ di-Potasio Hidrógeno Fosfato.....2,0 g/l
- ✓ Sacarosa.....5,0 g/l
- ✓ Agar.....13,5 g/l
- ✓ pH: 7,2±0,2

Se debe almacenar en un lugar seco y fresco.

Preparación: según el fabricante el medio EMB se prepara con 36 g/l. Para 800 ml se pesan 28,8g/ 800 ml.

Vogel-Johnson (V-J)

Se emplea para la detección de estafilococos, con morfología cocos Gram +. Su composición es:

- ✓ Triptona.....10,0 g/l
- ✓ Extracto de Levadura.....5,0 g/l
- ✓ D(-)-Manita.....10,0 g/l
- ✓ di-Potasio Hidrógeno Fosfato.....5,0 g/l
- ✓ Litio Cloruro.....5,0 g/l
- ✓ Glicina.....10,0 g/l
- ✓ Rojo de Fenol.....0,025 g/l
- ✓ Agar.....15,0 g/l
- ✓ pH: 7,2±0,2

Preparación: según el fabricante el medio V-J se prepara 60 g/l. Para 800 ml se pesan 48 g/800 ml.

Después de enrasar hasta 800 ml los matraces de los medios de cultivo (Fig. 1A) se esterilizan en autoclave. Al terminar el ciclo de esterilización se atemperan los matraces a 50°C en el baño y se vierten los medios en las placas de Petri a razón de 15 ml cada placa (Fig. 1B). Cuando los medios están solidificados se guardan en la cámara fría hasta su empleo posterior (Forbes *et al.*, 2009).

Por cada alimento se necesitan 4 placas de TSA y 2 de cada medio selectivo.

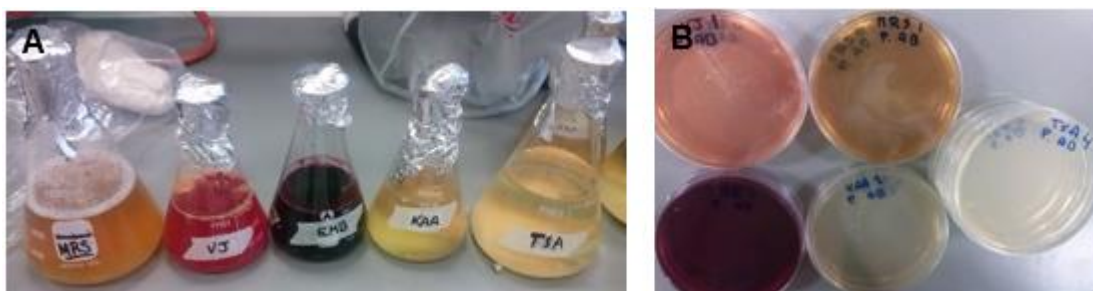


Fig. 1. Preparación de los medios de cultivo. A, preparación de los medios antes de su esterilización. B, medios de cultivos solidificados en las placas de Petri.

5.3.2 Solución salina

Se necesita preparar dos matraces de solución salina, uno de 300 ml y otro de 40 ml. Para esto se necesita cloruro de sodio y agua destilada. En el de 300 ml se vierten 2,7 g de cloruro de sodio y se enrasa hasta 300 ml con agua, y en el de 40 ml se pesan 0,36 g de cloruro y se enrasa hasta 40 ml de agua. A continuación, del matraz de 40 ml se reparte a razón de 0,9 ml en tubos eppendorf para realizar las diluciones seriadas de las muestras (Fig. 2).

El matraz de 300 ml de solución salina y los tubos con 0,9 ml se esterilizan en la autoclave, junto con los medios de cultivo y las puntas de micropipetas. Una vez esterilizado se guarda en la cámara fría hasta su empleo.

Para los alimentos sólidos se necesitan 45 ml de solución salina y 4 tubos estériles con 0,9 ml de solución salina para realizar diluciones seriadas, y para los alimentos líquidos se necesitan sólo los 4 tubos de 0,9 ml para las diluciones.



Fig. 2. Tubos eppendorf con 0,9 ml de solución salina.

5.4 Procesamiento de las muestras

A las 24 horas de la preparación de las placas de los medios de cultivo se comienza con el procesamiento de las muestras, todo se realiza en condiciones de esterilidad.

5.4.1 Diluciones en solución salina

Para el procesamiento de una muestra sólida se pesan 5 gramos de la muestra y se introducen en una bolsita de plástico donde se vierte 45 ml de solución salina estéril al 0,9%. A continuación, se introduce en un homogeneizador (Stomacher® 80 Biomaster, SewardLtd) (Fig. 3A y 3B). Para el procesamiento de muestras líquidas no se utiliza el homogeneizador sino que se toma la muestra directamente del frasco donde se ha recogido.

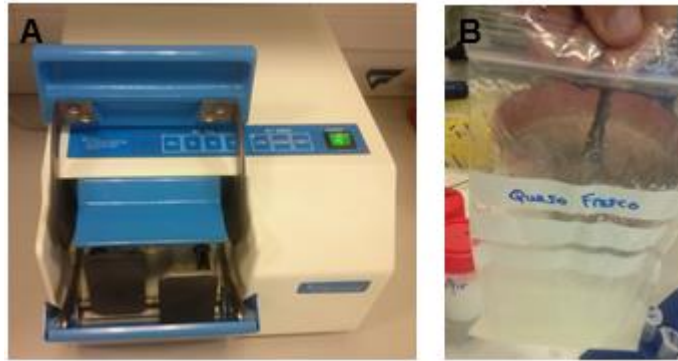


Fig. 3. Procesamiento de alimentos sólidos. A, homogeneizador, Stomacher®. B, alimento solido homogenizado.

Una vez que se tengan preparadas las muestras hay que realizar las diluciones seriadas a partir de la dilución 0. En las muestras líquidas la dilución 0 es el propio frasco de la muestra (Fig. 4A), mientras que en las muestras sólidas es la solución tras su homogeneización (Fig. 4B). La dilución 1 se obtiene tomando 100 μ l de la dilución 0 y depositándolos en el primer tubo con 900 μ l de solución salina, se debe de agitar bien. La dilución 2 se obtiene tomando 100 μ l de la dilución 1 y añadiéndolos sobre otro tubo con 900 μ l de solución salina. Y de igual forma, sucesivamente, se obtienen las diluciones 3 y 4.



Fig. 4. Diluciones seriadas, de la dilución 0 a la dilución 4. A, diluciones de los alimentos líquidos, dilución 0 el frasco de toma de la muestra. B, diluciones de los alimentos sólidos, dilución 0 el alimento homogenizado.

5.4.2 Siembra en las placas

Posterior a las diluciones seriadas, se comienza con la siembra de las muestras en los medios de cultivo. Se toman 100 μ l de cada una de las diluciones (de la 1 a la 4) y se depositan, respectivamente, en una placa con medio TSA, extendiéndose a continuación por la superficie con un asa de Digrafsky (Fig. 5A). De esta forma se

obtienen 4 placas de medio TSA cada una correspondiente a una dilución de la muestra (Fig. 5B).

Con respecto a los medios selectivos se necesitan 2 placas de cada uno de los medios y se depositan 100 µl de las diluciones 0 y 1, respectivamente (Fig. 5C).

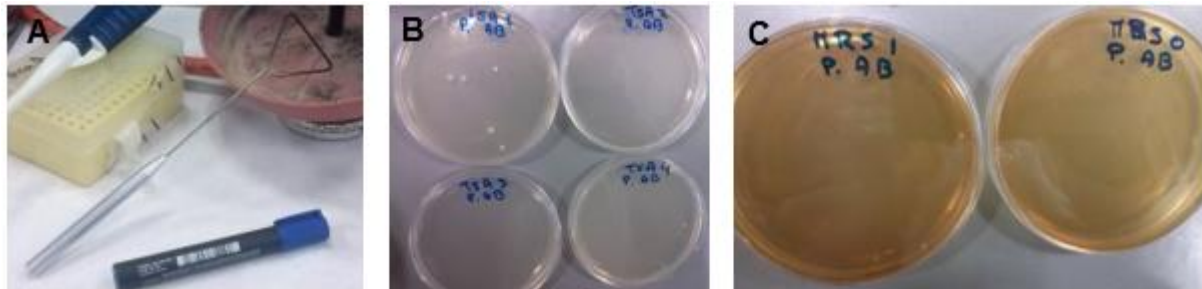


Fig. 5. Siembra de las muestras. A, asa de Digralsky. B, placas de TSA de la dilución 1 a la 4. C, placas de MRSA de las diluciones 0 y 1.

Una vez sembradas las placas se incuban en la estufa de 37°C durante 48 horas, excepto las placas de MRSA que se incuban a 30°C, temperatura óptima de crecimiento para bacterias lácticas (Forbes *et al.*, 2009). Las placas se colocan boca abajo.

5.5 Recuento de las placas

Tras 48 horas de incubación se sacan las placas de la estufa. A continuación, se observa una a una el tipo de colonias que aparecen en cada una de ellas, su aspecto (morfología y color) y se realiza un recuento bacteriano en cada tipo de medio.

El recuento consiste en la enumeración de las UFC (unidades formadoras de colonias) presentes en una unidad de peso, en un gramo si es un alimento sólido o en un mililitro si es un alimento líquido (Yousef y Carlstrom, 2003). Para esto se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{g \text{ o } ml} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen}}$$

El recuento se realiza en la placa correspondiente a la dilución que permita el crecimiento de entre 30 y 300 colonias (Fig. 6). El factor de dilución es la dilución de la placa donde se haya realizado dicho recuento (Yousef y Carlstrom, 2003). Por ejemplo: si el recuento se ha realizado en la placa de la dilución 4 el factor de dilución es 10^4 , si ha sido en la placa de la dilución 1 el factor es 10^1 y si ha sido en la 0 el factor es 10^0 , es decir, 1.

El volumen es siempre 0,1 ya que se depositan 100 μl (0,1 ml) de cada dilución en las placas para hacer los recuentos.

De igual forma hay que tener en consideración la dilución previa que se hace en las muestras sólidas (5g del alimento en 45 ml de solución salina) lo que hace que estos alimentos tengan ya realizada previamente una dilución de 10. Con respecto a los alimentos líquidos, al no tener que diluirlos en solución salina, no hay que tener en cuenta ninguna dilución adicional.

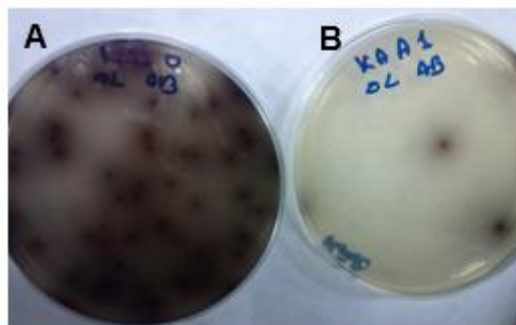


Fig. 6. Recuento de las placas de KAA de oveja Lacaune. A. Placa de dilución 0 donde se observa un crecimiento de microorganismos de entre 30-300. B. Placa de dilución 1 donde hay un crecimiento de menos de 30 microorganismos.

5.6 Tinción de Gram y prueba de la catalasa

Después de hacer los correspondientes recuentos se seleccionan las colonias que presenten un aspecto diferente en cada medio de cultivo y se realiza una tinción de Gram a cada una de ellas. El objetivo de esta tinción es clasificar las bacterias en uno de los dos grandes grupos bacterianos (Gram + o Gram -), así como evaluar su morfología (coco o bacilo) y tipo de agrupación (parejas, cadenas, racimos). Para esto se utilizan tres colorantes, cristal violeta, lugol y safranina, con estos colorantes conseguiremos que las bacterias Gram + se tiñan de color azul/ morado, mientras que las bacterias Gram - se tiñen de color rosa (Fig. 7B y 7C). Una vez realizada la

tinción, se observan las colonias teñidas al microscopio óptico con el objetivo de 100x y con ayuda del aceite de inmersión (Ingraham, 1998; Forbes *et al.*, 2009).

Las colonias que presenten morfología coco Gram + en el medio V-J se les realiza la prueba de la catalasa. Con esta prueba se detecta la actividad de la enzima catalasa en la colonia. Consiste en poner en un porta una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a continuación, se pica la colonia que hemos observado que es coco Gram + y se deposita en la gota. Si se encuentra presente la enzima catalasa comenzará a degradar al H_2O_2 en oxígeno y agua (Fig. 7A), este oxígeno se liberará formando burbujas, por lo que si observamos burbujas al depositar la colonia podemos confirmar que dicha colonia es catalasa + y por tanto, pertenece al género *Staphylococcus* (Fig. 7D). Si no hay actividad enzimática no se degradará el H_2O_2 y no habrá burbujas, por lo que diremos que es catalasa - y por tanto no pertenece a dicho género (MacFaddin, 2003; Forbes *et al.*, 2009).

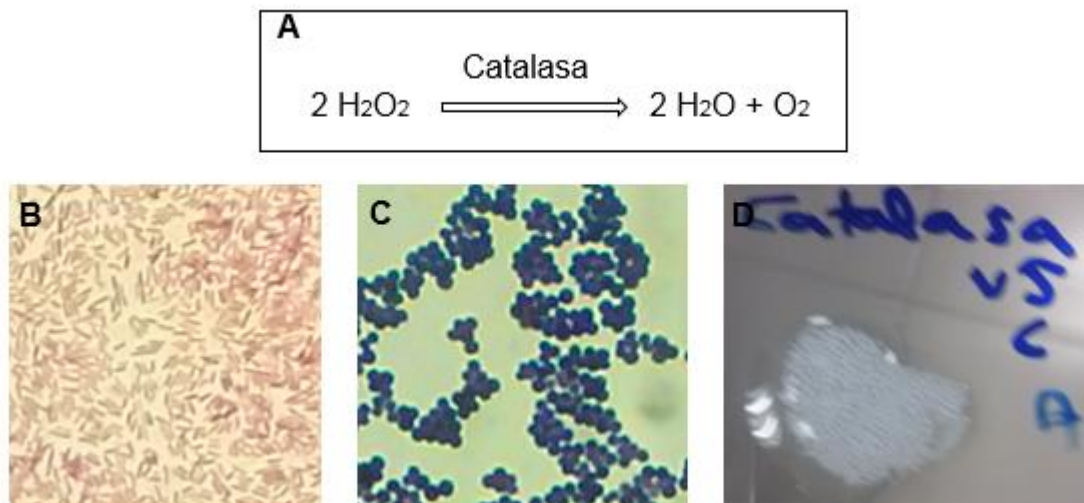


Fig. 7. A, reacción de la prueba de la catalasa. B, tinción de Gram donde se observan bacilos Gram -. C, tinción de Gram donde se observan cocos Gram +. D, prueba de la catalasa positiva.

5.7 Análisis estadístico

Para evaluar si las diferencias entre los grupos de muestras analizadas eran significativas, se calculó el valor de “p” con un intervalo de confianza del 95%. Este análisis se realizó con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Versión 16.1.15).

6 RESULTADOS

6.1 Recuento microbiano de las colonias

La tabla 2 recoge los resultados de los recuentos expresados en unidades formadoras de colonias/ gramo (UFC/) para los distintos alimentos analizados y en todos los medios de cultivo empleados.

Tabla 2. UFC/g de cada alimento en los correspondientes medio de cultivo.

	TSA	MRSA	KAA	EMB	VJ
Leche de cabra Florida	6,70x10 ⁶	2,22x10 ⁵	3,20x10 ⁴	3,19x10 ⁵	3,00x10 ⁵
Calostros de cabra Florida	6,40x10 ⁷	1,86x10 ⁵	3,00x10 ⁵	1,37x10 ⁵	3,00x10 ⁵
Leche de oveja Manchega	2,25x10 ⁶	2,70x10 ⁵	9,20x10 ⁴	4,30x10 ⁴	3,00x10 ⁵
Leche de oveja Lacaune	2,17x10 ⁵	3,00x10 ⁵	6,40x10 ³	6,70x10 ⁴	3,20x10 ⁴
Leche cruda de mezcla	4,10x10 ⁶	6,49x10 ⁵	1,24x10 ⁴	7,00x10 ⁴	1,73x10 ⁵
Leche pasteurizada de mezcla	8,00x10 ³	0	0	0	0
Leche de vaca	1,98x10 ⁶	0	0	2,60x10 ³	4,10x10 ³
Kéfir	3,00x10 ⁸	3,00x10 ⁵	0	4,90x10 ³	6,20x10 ⁴
Queso mezcla pasteurizada	5,89x10 ⁹	3,00x10 ⁶	0	2,00x10 ³	1,70x10 ⁴
Queso de oveja Manchega	1,44x10 ⁹	3,00x10 ⁶	3,00x10 ⁶	3,00x10 ⁶	3,00x10 ⁶
Queso de cabra	3,46x10 ⁹	3,00x10 ⁶	4,50x10 ⁵	3,00x10 ⁶	1,58x10 ⁶

En el medio TSA, se observa que las leches crudas tienen un recuento entre 8,00x10³ en leche pasteurizada, hasta 6,40x10⁷ UFC/ml en los calostros de cabra. En kéfir se encuentra 3,00x10⁸ UFC/ml. Y en los tres quesos el recuento es de 10⁹ UFC/g.

En el medio MRSA, se observa un recuento de 10⁵ UFC/ml en kéfir y en la mayoría de las leches, exceptuando, la leche de vaca y la leche pasteurizada que no ha crecido ningún microorganismo. En los quesos encontramos un recuento de 3,00x10⁶ UFC/g.

En el medio KAA, se encuentran varios recuentos: 6,40x10³ UFC/ml en leche de oveja Lacaune, 10⁴ UFC/ml en leche de cabra, oveja Manchega y mezcla de oveja, y 3,00x10⁵ UFC/ml en los calostros de cabra Florida. En la leche pasteurizada, vaca y en kéfir no se ha observado ningún crecimiento microbiano. Con respecto los quesos

se observa diferentes recuentos: $3,00 \times 10^6$ UFC/g en el de oveja Manchega, $4,50 \times 10^5$ UFC/g en el de cabra, y en el queso mezcla de leche pasteurizada no ha crecido ningún microorganismo.

En el medio EMB, se observa una variación en el crecimiento microbiano en leches, un recuento de 10^5 UFC/ml en leche y calostros de cabra. 10^4 UFC/ml en leche de oveja Manchega, Lacaune y en la leche mezcla de ovejas. 10^3 UFC/ml en leche de vaca y en kéfir. Y en la leche pasteurizada no ha crecido ningún microorganismo. En los quesos se observa un crecimiento de $2,00 \times 10^3$ UFC/g en el queso mezcla pasteurizada, y un crecimiento de $3,00 \times 10^6$ en oveja Manchega y en cabra.

Y por último, en el medio V-J, se observa en leche un recuento de 10^5 UFC/ml en leche y calostros de cabra, leche de oveja Manchega y mezcla de oveja. 10^4 UFC/ml en oveja Lacaune y en kéfir. $4,10 \times 10^3$ UFC/ml en vaca. Y en leche pasteurizada no se encuentra ningún crecimiento microbiano. En los quesos se observa un recuento de $1,70 \times 10^4$ UFC/g en queso mezcla pasteurizada, y un recuento de 10^6 UFC/g en queso de oveja Manchega y en cabra.

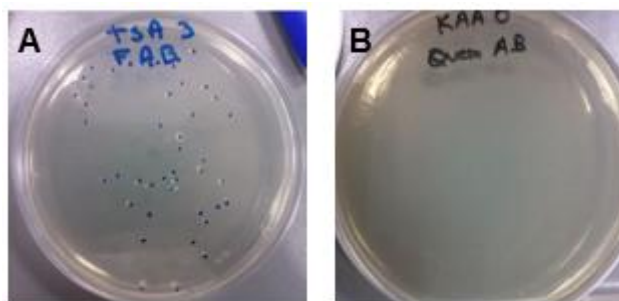


Fig. 8. A, crecimiento microbiano en la placa de dilución 3 de TSA en leche cruda mezcla de oveja. B, no hay crecimiento en la placa de dilución 0 de KAA en queso de leche pasteurizada.

6.2 Características macroscópicas

La tabla 3 recoge las características macroscópicas de los distintos alimentos analizados y en los medios de cultivo MRSA, EMB y V-J.

Antes de realizar la tinción de Gram, realizamos un análisis macroscópico de cada alimento analizado y de cada medio de cultivo.

Tabla 3. Características macroscópicas de los alimentos.

	MRSA		EMB		V-J		
Leche de cabra florida	Blancas	Diferente tamaño	Transparentes	Centro negro	Fondo rosa	Blancas	Pequeñas
Calostros de cabra Florida	Blancas	Pequeñas	Transparentes	Centro negro	Fondo rosa	Blancas	Diferente tamaño
			Blancas			Amarillas	
Leche de oveja Manchega	Blancas	Pequeñas	Negras	Brillo metálico	Fondo rosa	Blancas	Pequeñas
			Transparentes	Centro negro		Amarillas	
Leche de oveja Lacaune	Blancas	Pequeñas	Negras	Brillo metálico	Fondo rosa	Blancas	Diferente tamaño
			Transparentes	Centro negro		Amarillas	
Leche cruda mezcla	Blancas	Pequeñas	Transparentes	Centro negro	Fondo rosa	Blancas	Diferente tamaño
						Amarillas	
	Transparentes						
	Hongos				Fondo naranja	Blancas	Grandes
						Transparentes	
Leche pasteurizada mezcla							
Leche de vaca			Transparentes	Centro negro	Fondo naranja	Blancas	Grandes
			Blancas				
Kéfir	Blancas	Diferente tamaño	Transparentes	Centro negro	Fondo rosa	Blancas	Diferente tamaño
			Transparentes	Pequeñas	Fondo naranja	Blancas	Grandes
Queso mezcla de oveja	Blancas	Diferente tamaño			Fondo naranja	Blancas	Grandes
Queso de oveja Manchega	Blancas	Pequeñas	Negras	Brillo metálico	Fondo rosa	Blancas	Pequeñas
	Hongos		Transparentes	Centro negro			
Queso de cabra	Blancas	Pequeñas	Negras	Brillo metálico	Fondo rosa	Blancas	Diferente tamaño
	Hongos		Blancas		Fondo naranja	Blancas	Grandes

En TSA encontramos colonias blancas, amarillas y transparentes de varios tamaños (Fig. 9A).

En MRSA se encuentran colonias blancas, y en algunos alimentos además se encuentran hongos, como es en el queso de cabra, de oveja Manchega y en la leche cruda de mezcla (Fig. 9B). En leche pasteurizada no se observa crecimiento microbiano.

Las colonias que se encuentran en KAA son colonias blancas pequeñas y blancas con el centro negro. Ambas con un halo negro (Fig. 9C y 9D).

En EMB se observan tres tipos de colonias: transparentes, negras, y otras negras con un brillo metálico (Fig. 9E y 9F). Estas últimas nos indican la posible presencia de *E. coli* en el alimento y se encuentran en queso de cabra, de oveja Manchega, en leche de oveja Lacaune y de oveja Manchega.

Y en V-J encontramos colonias blancas de varios tamaños y amarillas (Fig. 9G). En algunos alimentos el color del medio no varía, sigue siendo naranja, como es en el queso de mezcla, leche de vaca y leche pasteurizada, esta última porque no hay crecimiento de microorganismo. En el resto de los alimentos el medio cambia de color naranja a rosa. En el queso de cabra, leche cruda de mezcla y en kéfir solo cambia el color en la placa con dilución 0 (Fig. 9H). Macroscópicamente se observa que en las placas que hay un cambio de color hay colonias blancas pequeñas, y en las placas que no hay cambio de color no se encuentran estas. El cambio de color se puede deber al cambio del indicador de pH producido por la acumulación de productos ácidos, obtenidos en la fermentación del manitol.

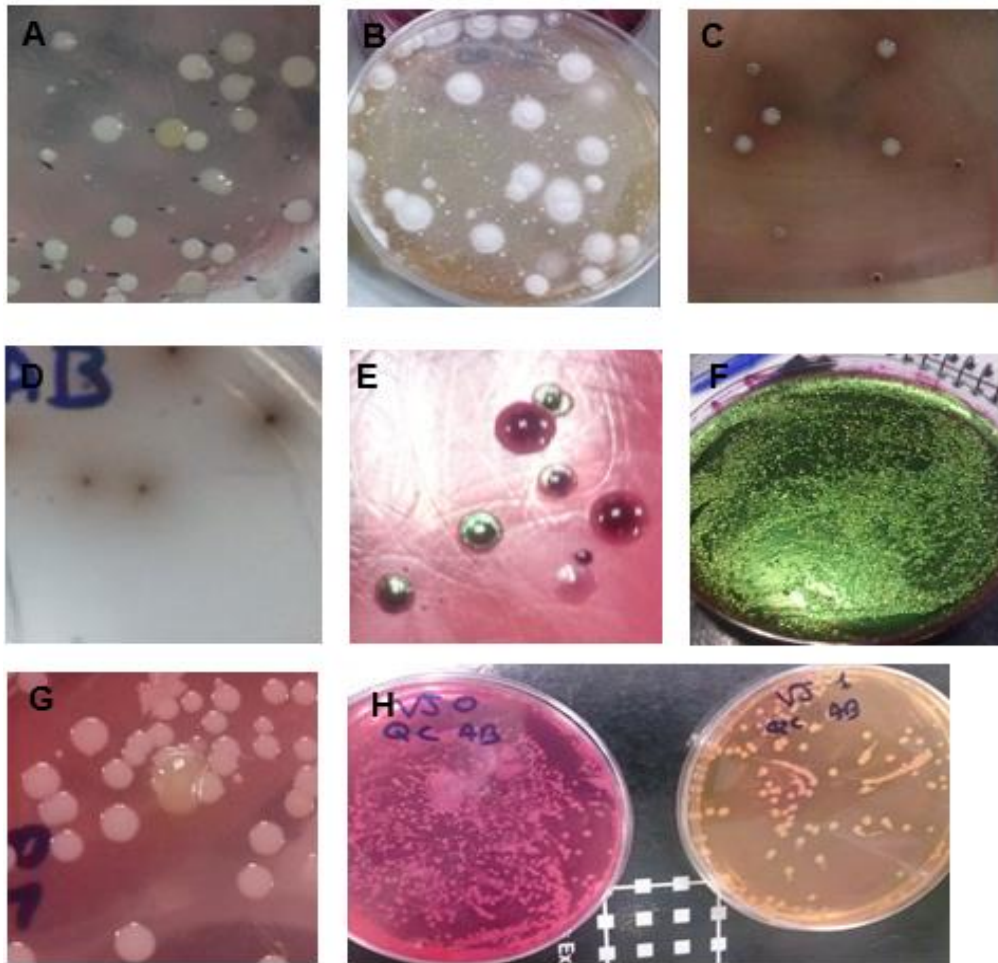


Fig. 9. Características macroscópicas. A, medio TSA se observan las colonias blancas, amarilla y transparentes. B, medio MRSA se observan los hongos y las colonias blancas. C, medio KAA se observan colonias blancas y otras con el centro negro y con halo negro. D, medio KAA se observa el halo de las colonias. E, medio EMB colonias negras y otras con brillo metálico. F, medio EMB repleto de colonias con brillo metálico. G, medio V-J colonias blancas y transparentes. H, medio V-J donde se observa en la placa 0 un color rosa de fondo y en la placa 1 un color naranja.

6.3 Tinción de Gram

La tabla 4 recoge los resultados de las observaciones de las tinciones de Gram para los distintos alimentos analizados y en todos los medios de cultivo empleados.

Tabla 4. Morfología y Gram de cada alimento en cada medio de cultivo.

	TSA		MRSA		KAA		EMB		V-J			
Leche de cabra Florida	Bacilos	+	Bacilos	+	Cocos	+	Bacilos	-	Bacilos	-		
	Bacilos	-							Cocos	+		
Calostros de cabra Florida	Bacilos	-	Bacilos	+	Cocos	+	Bacilos	-	Bacilos	-		
	Cocos	+							Cocos	+		
Leche de oveja Manchega	Bacilos	-	Bacilos	+	Cocos	+	Bacilos	-	Bacilos	-		
	Cocos	+										
Leche de oveja Lacaune	Bacilos	-	Bacilos	+	Cocos	+	Bacilos	-	Bacilos	-		
	Cocos	+							Cocos	+	Cocos	+
	Cocos	+	Cocos	+					Cocos	-		
Leche cruda mezcla de oveja	Bacilos	+	Bacilos	+	Cocos	+	Cocos-Bacilos	-	Bacilos	+		
	Cocos	+							Cocos	+	Cocos-Bacilos	-
Leche pasteurizada mezcla de oveja	Cocos	+										
Leche de vaca	Bacilos	+					Bacilos	-	Bacilos	-		
	Cocos	+					Cocos-Bacilos	-				
	Cocos	-					Cocos	+				
Kéfir	Bacilos	-	Bacilos	+			Bacilos	+	Bacilos	-		
	Cocos	+									Cocos	+
	Cocos	+	Cocos	+							Cocos	+
Queso mezcla de oveja	Bacilos	+	Bacilos	+			Bacilos	+	Bacilos	-		
	Bacilos	-							Cocos	+		
	Cocos	+										
Queso de oveja Manchega	Bacilos	-	Bacilos	+	Cocos	+	Bacilos	-	Bacilos	-		
	Cocos	+									Cocos	+
Queso maduro de cabra	Bacilos	-	Bacilos	+	Cocos	+	Bacilos	-	Bacilos	-		
	Cocos	+									Cocos	+

En el medio TSA se observa que hay crecimiento de todo tipo de microorganismos. Crecen bacilos Gram – y cocos Gram + en la mayoría de los alimentos, exceptuando en leche pasteurizada donde se encuentra crecimiento de cocos Gram +, en queso mezcla de oveja donde crece bacilos Gram +, Gram -, y cocos Gram +, y en leche de vaca encontramos bacilos Gram + y cocos Gram + y Gram –.

En el medio MRSA se observa que todas las colonias son Gram +. Hay crecimiento de bacilos que presentan una morfología de levaduras en leche de cabra, leche de oveja Manchega y queso de oveja Manchega. En los calostros de cabra los bacilos que crecen no tienen dicha morfología. También se encuentra un crecimiento de bacilos y cocos, en queso de cabra y de oveja Manchega, leche de oveja Lacaune, cruda de mezcla y en kéfir. Los cocos que crecen se disponen en parejas o tétradas. En leche pasteurizada y vaca no hay crecimiento.

En el medio KAA se encuentra un crecimiento de cocos Gram + en todos los alimentos, exceptuando en leche pasteurizada, vaca, kéfir y queso de mezcla que no se observa crecimiento.

En el medio EMB se observa en la mayoría de los alimentos un crecimiento de bacilos Gram –, aunque hay otros crecimientos. En leche cruda de mezcla se observa coco-bacilos Gram -, en leche de vaca bacilos Gram -, coco-bacilos Gram – y cocos Gram +, en kéfir bacilos Gram -, Gram + y cocos Gram +, y en queso de mezcla bacilos Gram +. Los bacilos de kéfir y queso de mezcla con morfología de levaduras. En leche pasteurizada no se observa crecimiento. También se ha observado que las colonias con brillo metálico de algunos alimentos (queso de cabra, oveja Manchega, leche de oveja Lacaune, y oveja Manchega) presentan una morfología de bacilos Gram -.

En el medio V-J se observan diferentes crecimientos. Crecimiento de bacilos Gram – en queso de cabra, oveja Manchega, leche de oveja Manchega, vaca y en kéfir. Crecimiento de bacilos Gram – y cocos Gram + en leche y calostros de cabra y en queso de mezcla. Crecimiento de bacilos Gram + y coco-bacilos Gram – en leche cruda de mezcla. Y crecimiento de cocos Gram + y cocos Gram – en leche de oveja Lacaune. Las presuntas colonias blancas y pequeñas que están implicadas al

cambio de color del medio son bacilos Gram -. En leche pasteurizada no se observa crecimiento. Las colonias se observan cocos Gram + se les realiza la prueba de la catalasa.

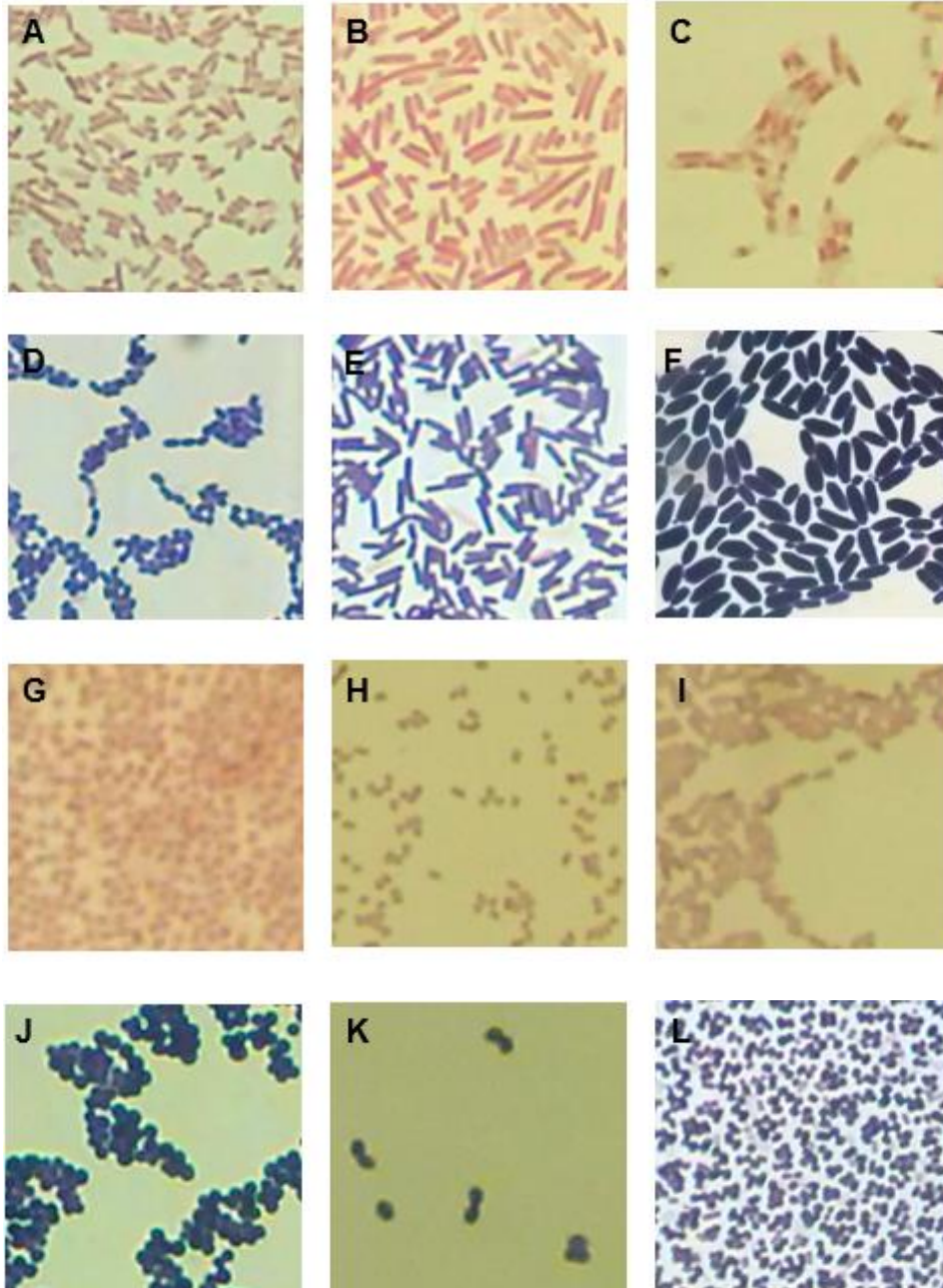


Fig. 10. Diferentes tipos de colonias que encontramos en los alimentos después de la tinción de Gram. A, B, C, bacilos Gram -. D, E, bacilos Gram +. F, bacilos Gram + con morfología de levadura. G, H, cocos Gram -. I, coco-bacilos Gram -. J, cocos Gram + del medio KAA. K, cocos Gram + del medio MRSA. L, cocos Gram +.

6.4 Prueba de la catalasa

La tabla 5 recoge los resultados de las pruebas de la catalasa para los distintos alimentos analizados en el medio de cultivo V-J.

Tabla 5. Prueba de la catalasa.

Medio V-J	Tinción de Gram		Prueba de la catalasa
Leche de cabra Florida	Cocos	+	+
Calostros de cabra Florida	Cocos	+	+
Leche de oveja Lacaune	Cocos	+	-
Queso mezcla de oveja	Cocos	+	-

Gracias a la prueba de la catalasa se puede saber si en el alimento presuntamente se encuentra el género *Staphylococcus*. Para esto se picó las colonias cocos Gram + del medio V-J (leche y calostros de cabra Florida, leche de oveja Lacaune y en queso mezcla de oveja).

Al realizar la prueba se observa un burbujeo en las colonias de la leche y calostros de cabra Florida, esto significa que son catalasa +, por lo que presuntamente se encuentra *Staphylococcus* en estos alimentos (Fig. 11 A y 11B). Mientras que en la leche de oveja Lacaune y en el queso mezcla de oveja se observa catalasa -, por lo que presuntamente no está presente este género (Fig. 11C y 11D).

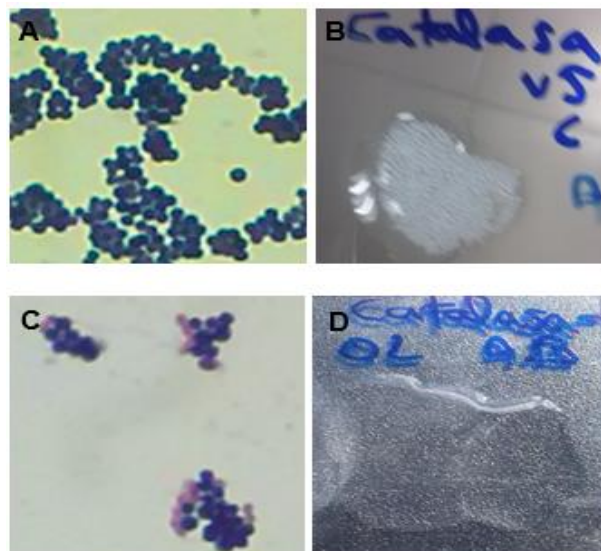


Fig. 11. Prueba de la catalasa. A, cocos Gram + del medio V-J de leche de cabra Florida. B, prueba de la catalasa + de oveja Florida. C, cocos Gram + del medio V-J de oveja Lacaune. D, prueba de la catalasa - de oveja Lacaune.

6.5 Estudios comparados

Se han realizado tres comparativas con los resultados obtenidos, a partir de las medias de los datos de las UFC/g obtenidas tanto en medios generales como selectivos.

✓ Con el objetivo de evaluar la influencia del proceso de fermentación de la leche en los recuentos microbianos del producto acabado, se ha comparado la media de los recuentos obtenidos en los distintos tipos de leche respecto a la media de los obtenidos tanto en quesos como en kéfir, ambos productos sometidos a un proceso de fermentación. Como se observa el gráfico 2, la media de los recuentos que encontramos en el queso y kéfir es mayor que la obtenida en leches. Dicha diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,5$), y probablemente obedezca al lógico desarrollo de bacterias lácticas en los productos fermentados, como cabía esperar.

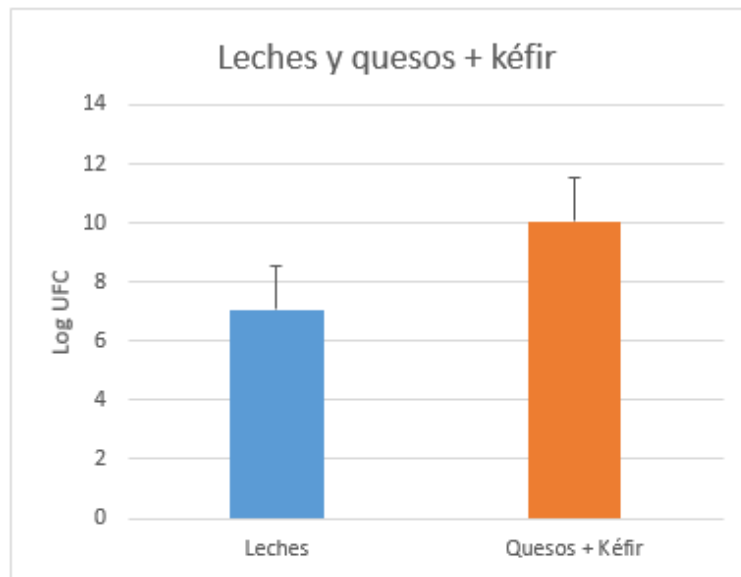


Gráfico 2. Comparativa entre los recuentos bacterianos obtenidos en leche y en queso junto con el kéfir. Los resultados se expresan en UFC/ml en leches y UFC/g en quesos y kéfir.

✓ El gráfico 3 muestra la media de los recuentos bacterianos en leches crudas respecto a leches pasteurizadas. Se observa una diferencia significativa, con recuentos bacterianos superiores en leche cruda respecto al producto sometido a pasteurización. Además, de acuerdo con los recuentos obtenidos en medios selectivos (tabla 2), no se detectó crecimiento bacteriano en leche pasteurizada, lo

que confirma la eliminación de bacterias potencialmente patógenas tras el proceso al que se somete el producto.

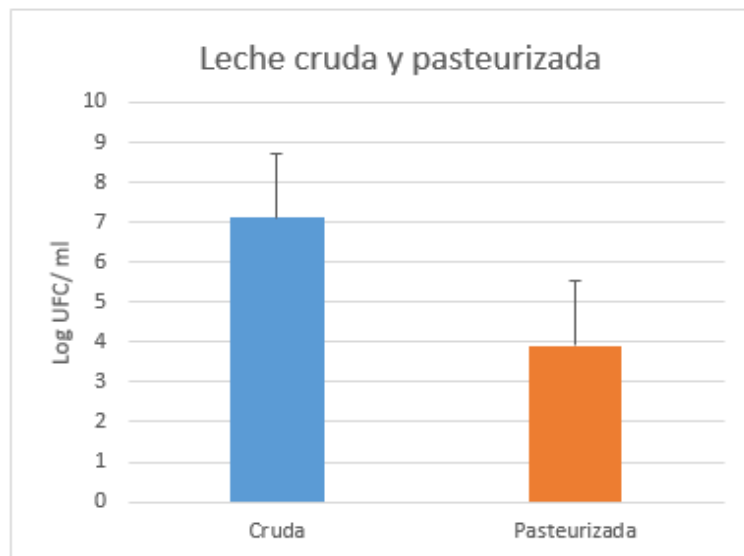


Gráfico 3. Comparativa de recuentos bacterianos en leche cruda y leche pasteurizada.

✓ Por último, se ha comparado el queso que se ha elaborado con leche pasteurizada (queso mezcla de oveja) y los quesos que se han realizado con leche cruda (queso de cabra y el de oveja Manchega). En el medio TSA, se observa que los recuentos bacterianos totales son muy similares en quesos obtenidos a partir de leche cruda y de leche pasteurizada (Gráfico 4A). Por el contrario, los recuentos realizados en medios selectivos (gráfico 4B) muestran una reducción significativa en los recuentos de enterobacterias en medio EMB y de estafilococos en medio V-J. Además los recuentos de enterococos (medio KAA) se vieron reducidos por debajo del umbral de detección en el queso obtenido a partir de leche pasteurizada.

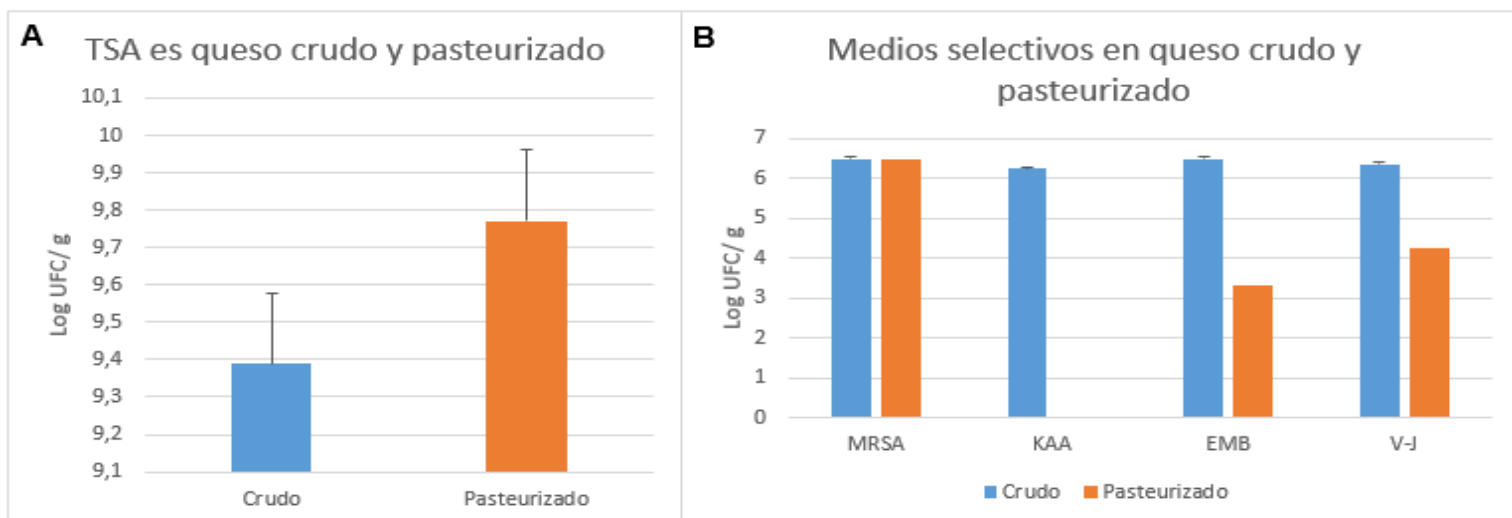


Gráfico 4. Comparativa entre queso obtenido a partir de leche pasteurizada y a partir de leche cruda. A, comparación en el medio TSA. B, comparación en los medios específicos.

7 DISCUSION

La presencia de patógenos que pueden ser transmitidos a través de leche cruda o de queso elaborado con leche cruda constituye un riesgo evidente para la salud, sobre todo en niños pequeños o personas inmunodeprimidas (Johler *et al.*, 2015). De hecho, estos productos son causa de frecuentes casos de intoxicaciones alimentarias en la actualidad.

Estudios previos sobre leche cruda han descrito la presencia de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* (Mc Auley *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2016). Cuando los recuentos del género *Staphylococcus* se encuentran en productos lácteos por encima de 10^5 UFC/ml se puede acumular en el producto una enterotoxina resistente a la pasteurización y responsable de posibles brotes de transmisión alimentaria (Ryser, 2001; Delbes *et al.*, 2006; CDC, 2010a). Nuestros resultados muestran también la presencia de presuntos coliformes y bacterias del género *Staphylococcus*, en leche cruda, mientras que en leche pasteurizada no encontramos estos microorganismos. Los recuentos bacterianos en medios tanto generales como selectivos para bacterias patógenas de posible transmisión a través de la cadena alimentaria son superiores en leche cruda respecto a leche pasteurizada. En la leche cruda y los calostros de cabra Florida encontramos presuntos *Staphylococcus* a unas concentraciones de 3×10^5 UFC/ml, por lo que este patógeno podría haber producido y acumulado la enterotoxina causante de patologías humanas en la leche.

La elaboración de quesos a partir de leche cruda contaminada con patógenos, hace que el producto final quede contaminado, y podría ser el causante de intoxicaciones alimentarias (Johler *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016). Si además de elaborarse con leche cruda los quesos tienen un contenido alto de humedad, como son los quesos blandos, tienen un mayor riesgo de transmitir patógenos que los quesos con menor humedad, como son los quesos curados o semi-curados (Choi *et al.*, 2016). En una reciente revisión se han relacionado las enfermedades transmitidas por alimentos con el consumo de queso en distintos países. Contaminación de los quesos por *Salmonella* (CDC, 2014), infecciones de *S. aureus*, por el uso de la leche cruda o por contaminación por un manejo inapropiado de los manipuladores, y también se ha relacionado a *E. coli* con la contaminación de queso Gouda elaborado con leche cruda en Canadá (Honish *et al.*, 2005; CDC, 2010b).

Nuestros resultados concuerdan con estos estudios, ya que se observa una mayor carga microbiana en los quesos elaborados con leche cruda que en los quesos elaborados con leche pasteurizada. Además se observa en los quesos crudos crecimiento en medio KAA, selectivo para enterococos, mientras que en los quesos pasteurizados no se detecta crecimiento alguno.

Un estudio en Castilla y León, observó que la leche cruda de sus empresas ganaderas estaba de acuerdo con los estándares de la Unión Europea, pero la presencia de *E. coli* en la leche cruda podría suponer un riesgo para la salud pública (Alvarez *et al.*, 2015). Comparando nuestros resultados con los suyos observamos que nuestros resultados se encuentran dentro de los estándares aunque en algunos casos nos encontremos con la presunta presencia de ciertos patógenos. Según otros estudios, se muestra claramente cómo el comportamiento de los consumidores podría afectar al número de casos de intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias, ya que si la leche cruda se hierva antes del consumo o de la elaboración de los quesos puede proteger al consumidor del riesgo de contraer una intoxicación por consumo de estos productos (Giacometti *et al.*, 2015).

El proceso de fabricación del queso y el proceso de distribución y almacenamiento de las leches y quesos podría ser controlado de una manera eficiente para prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos crudos. La evaluación de riesgos microbiológicos incluye un modelo predictivo para la evaluación de la exposición microbiana, y para la garantía de la seguridad microbiológica (Choi *et al.*, 2016).

8 CONCLUSIONES

1. Se han obtenido recuentos bacterianos significativos en las muestras de todos los productos lácteos analizados, excepto en leche pasteurizada de mezcla para todos los medios selectivos empleados, leche de vaca en los medios MRSA para bacterias lácticas y KAA para enterococos, así como en las muestras de kéfir y queso de mezcla pasteurizada en medio KAA.
2. La identificación preliminar de los microorganismos aislados mediante tinción de Gram y prueba de la catalasa coincide con las características esperadas de acuerdo con los medios selectivos empleados (bacterias lácticas en medio MRS, enterococos en medio KAA, enterobacterias en medio EMB, y estafilococos en medio VJ).
3. La carga microbiana total obtenida en derivados lácteos fermentados es significativamente superior a la obtenida en leches sin fermentar. Dicha diferencia obedece principalmente al lógico desarrollo de bacterias lácticas en los productos fermentados.
4. La carga microbiana total detectada en leches crudas es significativamente superior a la obtenida en leches pasteurizadas, si bien dicha diferencia desaparece en los productos fermentados obtenidos a partir de ambas.
5. En medios selectivos para microorganismos potencialmente patógenos no se detectó crecimiento bacteriano alguno en muestras procedentes de leche pasteurizada, lo que confirma la eliminación de estas bacterias tras el proceso de pasteurización. Sí se recuperan posibles enterobacterias y estafilococos en quesos obtenidos a partir de leche pasteurizada, pero en cantidades significativamente menores que si la leche empleada para la obtención del queso es cruda.

9 BIBLIOGRAFIA

Alvarez S., M.E., Ortero., A., Gracia L., M.L., Santos, J.A. 2015. Microbiological examination of bulk tank goat's milk in the Castilla y León region in northern Spain. *Journal of Food Protection*. Vol. 78, No.12, 2227-2232.

Bamforth, C.W. 2005. La ciencia que sostiene las fermentaciones de alimentos. En: *Alimentos, fermentación y microorganismos*. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 30-35.

Bondi, A.A. 1988. Necesidades nutritivas para el crecimiento. En: *Nutrición animal*. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 398-404.

Buncic, S. 2006a. Higiene en la producción y el procesado de otros alimentos. En: *Seguridad alimentaria integrada y salud pública veterinaria*. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. pp. 297- 300.

Buncic, S. 2006b. Las explotaciones animales en el contexto de la cadena alimentaria. En: *Seguridad alimentaria integrada y salud pública veterinaria*. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. pp. 5- 81.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2010a. Staphylococcal food poisoning.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2010b. Investigation update: Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with cheese. <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/cheese0157/archive/111210.html> Accedido 30 Mayo, 2016.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2014. Multistate outbreak of *Salmonella* Stanley Infections linked to raw Cashew cheese (final update). <http://www.cdc.gov/salmonella/stanley-01-14/> Accedido 30 Mayo, 2016.

Chandan, R.C, Kilara, A., Shah, N.P. 2008. Microbiological Considerations Related to Dairy Processing. In: Dairy processing and quality assurance. Ed. Wile-Blackwell. New Delhi, India. pp. 105- 134.

Choi, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Yoon, Y. 2016. Cheese Microbial Risk Assessments. Asian Australas. J. Anim. Sci. 29: 307-314.

Codex Alimentarius. 2011. Leches fermentadas. En: Leche y productos lácteos. 2ª edición. Roma, Italia. pp. 6-8.

De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. Int. J. Food Microbial. 20, 1–17.

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F., Montel, M.C. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. Journal of Food Protection, 69: 2161-2167.

DECRETO 2478/1966 de 6 de octubre de 1966, per el que se aprueba el Reglamento de Centrales Lecheras y otras industrias lácteas. Boletín Oficial de Estado de 7 de octubre de 1966.

Early, R. 1998a. Controles analíticos en la elaboración de productos lácteos. En: Tecnología de los productos lácteos. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 379-390.

Early, R. 1998b. Leche y nata. En: Tecnología de los productos lácteos. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 1- 21.

Early, R. 1998c. Leches fermentadas y quesos frescos. En: Tecnología de los productos lácteos. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 151.

Fernandes, R. 2009. Pathogen profiles. In: Microbiology handbook dairy products. Ed. Leather head Food International. pp. 145-157.

Forbes, B.A, Sahm, D.F, Weissfeld, A.S. 2009. Cultivos e identificación tradicional. En: Diagnóstico Microbiológico. 12ª edición. Ed. Médica panamericana. Buenos Aires. pp. 93-111.

Giacometti, F., Bonilauri, P., Albonetti, S., Amatiste, S., Arrigoni, N., Bianchi, M., Bertasi, B., Bilei, S., Bolzoni, G., Cascone, G., Comin, D., Daminelli, P., Decastelli, L., Merialdi, G., Mioni, R., Peli, A., Petruzzelli, A., Tonucci, F., Bonerba, E., Serraino, A. Quantitative risk assessment of human salmonellosis and listeriosis related to the consumption of raw milk in Italy. *Journal of Food Protection*. 78 (1): 13-21.

Honish, L., Predy, G., Hislop, N., Chui, L., Kowalewska G., K., Trottier, L., Kreplin, C., Zazulak I. 2005. An outbreak of E. coli O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. *Can. J. Public Health*. 96: 182-184.

ICMSF. 2005. Milk and dairy products. In: *Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*. 2ª edición, Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, USA. pp. 643-696.

IDF (International Dairy Federation). 1979. Design and use of CIP systems in the dairy industry. *Bull. Int. Dairy Fed.*, N° 117.

Ingraham, John J. y Ingraham, Catherine A. 1998. Métodos de estudio de los microorganismos. En: *Introducción a la microbiología*. Ed. Reverte, S. A. Barcelona, España. Volumen 1. pp. 55-71.

Johler, S. Weder D., Bridy C., Huguenin M.C., Robert L., Hummerjohann J., Stephan R. 2015. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci*. 98 (5): 2944-8

MacFaddin. 2003. Pruebas de catalasa y peroxidasa. En: *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª edición. Ed. Médica panamericana. Buenos Aires. pp. 74-83.

McAuley, C.M., Moore, S.C., Fegan N., Fox, E.M. 2014. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J. Dairy Sci.* 97(12): 7402-12.

Montville, T.J., Matthews, K.R. 2005a. Lactic acid bacteria and food fermentations. In: *Food microbiology: an introduction*. 2ª edición, Ed. American Society for Microbiology. Washington, USA. pp. 243-248.

Montville, T.J., Matthews, K.R. 2005b. Spoilage organisms. In: *Food microbiology: an introduction*. 2ª edición, Ed. American Society for Microbiology. Washington, USA. pp. 281-289.

ORDEN de 11 de febrero de 1987 por la que se modifica la Norma General de Calidad para la Leche UHT. *Boletín Oficial de Estado* 44 de 22 de febrero de 1987. 4525.

ORDEN de 29 de noviembre de 1985 por la que se aprueban las Normas de Calidad para Quesos y Quesos Fundidos destinados al mercado interior. *Boletín Oficial de Estado* 292 de 6 de diciembre de 1985. 25515.

Ordoñez, J.A. 1998a. Leche de consumo. En: *Tecnología de los alimentos*. Volumen II, alimentos de origen animal. Ed. Síntesis. Madrid, España. pp. 64- 65.

Ordoñez, J.A. 1998b. Leche fermentada. En: *Tecnología de los alimentos*. Volumen II, alimentos de origen animal. Ed. Síntesis. Madrid, España. pp. 90- 93.

Ordoñez, J.A. 1998c. Microbiología de la leche. En: *Tecnología de los alimentos*. Volumen II, alimentos de origen animal. Ed. Síntesis. Madrid, España. pp. 52- 60.

Pascual, Mª R, Calderón, V. 1999. Leche y derivados. En: *Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª edición, Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid, España. pp. 281-306.

Pascual A., M.R. 1982. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Nacional de Sanidad. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.

REAL DECRETO 1679/1994, de 22 de julio, por el que se establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. Boletín Oficial de Estado 229 de 24 de septiembre de 1994. 20998.

Rossi, M.L., Mariela T., A.P., Chianelli, S., Troncoso, A. 2008. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Revista Chilena de Infectología, 25 (5), 328-335.

Ryser, E.T. 2001. Public Health Concerns. In: Applied dairy microbiology, 2^a edition. Ed. E. H. Marth and J. L. Steele. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 397-546.

Suhren, G., Reichmuth, J. 2003. Measurability and development of the hygienic value of the raw material milk. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 55, 5–36.

Vila E., J., Zboromyrska, Y. 2012. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. Revista Elsevier Doyma. Gastroenterología y hepatología, 35 (2), 89-93.

Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2008. Bacteria: Gram positivas con bajo contenido de G+C. En: Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7^a edición. Ed. Mc Graw Hill. Aravaca, Madrid. pp. 578-587.

Yousef, A.E., Carlstrom, C. 2003. Técnicas microbiológicas básicas. En: Microbiología de los alimentos: manual de laboratorio. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 5-13.