



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos lácteos

Alumno: Ildefonso Padilla González

Junio, 2019



Facultad de
UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos lácteos

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del autor o del tutor, con trazos fluidos y entrelazados.

Alumno: Ildefonso Padilla González

Junio, 2019

Índice

1. Resumen	3
2. Summary	3
3. Introducción	4
3.1 Leche	4
3.2 Quesos	5
3.2.1. Clasificación de los quesos	6
3.2.2. Fabricación de quesos	6
3.3. Valor nutricional de los productos lácteos	7
3.4. Patógenos que pueden transmitirse por los alimentos lácteos	8
3.5. Seguridad alimentaria en la leche y productos lácteos	10
3.6. Tratamientos de conservación de la leche y los productos lácteos	11
3.7. Productos fermentados	13
3.8. Enfermedades causadas por bacterias lácticas	14
4. Objetivos	15
5. Material y métodos.	16
5.1. Material utilizado	16
5.2. Alimentos empleados	16
5.3. Medios de cultivo	17
5.3.1. Preparación de medios de cultivo no selectivos	18
5.3.2. Preparación de medios de cultivo selectivos.	19
5.4. Procesado de los alimentos	23
5.4.1 Diluciones seriadas	23
5.4.2. Siembra en placas	24
5.5. Recuento de placas	26
5.6. Tinción de Gram y prueba de la catalasa	26

5.6.1. Tinción de Gram.....	26
5.6.2. Prueba de la catalasa	28
6. Resultados.....	29
6.1. Recuento Microbiano de las colonias	29
6.3. Tinción de Gram.....	35
6.4 Prueba de la catalasa.....	37
7. Discusión	38
8. Conclusiones	40
9. Bibliografía.....	42

1. Resumen

Los productos lácteos constituyen uno de los pilares básicos de la alimentación por sus propiedades nutricionales y también un medio en el que pueden crecer numerosos microorganismos, pudiendo causar intoxicaciones. En este estudio se han analizado 11 alimentos lácteos: yogur, diferentes tipos de quesos y de leches. Se ha realizado un estudio microbiológico para comparar el número y tipo de microorganismos encontrados en leche cruda recién ordeñada, leche pasteurizada y en productos derivados de la leche. Según nuestros resultados, los quesos, por el desarrollo normal de bacterias lácticas en productos fermentados, presentan mayor carga microbiana que las leches frescas o las pasteurizadas, donde el crecimiento fue nulo, así como en el yogurt, donde tampoco se encontró crecimiento. Entre los distintitos tipos de quesos analizados, el que mayor carga microbiana presentó fue el Queso fresco de Cabra, mientras el Queso Massdam de Vaca fue el que menor crecimiento mostró en los medios utilizados.

Palabras clave: Productos lácteos, carga microbiana, queso, leche.

2. Summary

Dairy products play an important role in human diet due to their nutritional properties, but they are also a favourable medium in which many microorganisms can grow and cause food poisoning. In this article, 11 dairy products are analyzed: different types of cheeses and milks, as well as yogurt. Microbiological analysis is carried out to compare the number and type of microorganisms found in freshly milked raw milk, pasteurized milk and processed dairy products. According to our results, due to the reasonable development of lactic bacteria in fermented products, cheeses present a higher microbial load than fresh milks or pasteurized milks, where no growth was detected. Among the different types of cheeses analysed, fresh Goat Cheese was the type with the highest microbial load whereas Massdam cow cheese showed the lowest microbial growth in the bacteriological media employed.

Key words: Dairy products, microbial load, cheese, milk.

3. Introducción

3.1 Leche

La leche es el producto integral que proviene de ordeñar una hembra lechera sana, bien alimentada y no agotada, recogida de forma limpia y que no contenga calostros (Luquet, 1991a).

La leche entera fresca puede procesarse para dar lugar a diferentes productos líquidos como la leche desnatada, que contiene un 0.5% de grasa o la leche semidesnatada, que contiene un 2% de grasa. Esto se puede obtener gracias a la centrifugación a alta velocidad y un posterior calentamiento a 38 grados para separar la nata y así obtener una leche desnatada, a la que se le puede añadir el porcentaje de grasa que se desee (Vieira, E.R. 1996)

Otro tipo de leche, como es la leche evaporada, se elabora eliminando aproximadamente el 60% del agua original de la leche entera. Con esto, el contenido de lactosa se eleva a un 11.5%. Para su fabricación, se le añade sacarosa o glucosa antes de evaporar parte de su agua por lo que suele tener un 54% de azúcar, lo que supone un 64% de azúcar en su fórmula final.

Leche caprina: posee una mayor proporción de los ácidos grasos de cadenas cortas (ácidos cáprico, capríco y caprílico) que la de vaca por lo que es más digestible y tiene un sabor particular. La alta proporción de grasa de cadena cortas se está usando para el tratamiento de gran cantidad de pacientes con mala absorción nutricional, que sufren de quiluria, esteatorrea, hiperlipoproteinemia y en casos intestinas, problemas coronarios, etc. (Arbiza, 1996). La leche de estos rumiantes presenta una alta calidad desde un punto de vista nutritivo e incluso cosmético e incluso es mejor que la leche de vaca en algunos aspectos. Las cabras son de fácil crianza y sus costos son más bajos por lo que algunos estudios están fomentando que su crianza y posterior producción de leche sea mayor que la leche de vaca.

Desde el punto de vista de la seguridad microbiológica, la pasteurización es el proceso que se emplea básicamente con el objeto de ajustarse a la normativa vigente. Por ejemplo, en los Estados Unidos, la leche cruda de grado A que va a pasteurizarse, no debe de tener una carga microbiana superior a 300.000 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml). Tras la pasteurización, ese recuento

no debe pasar de 20.000 UFC/ml y el número de coliformes no debe pasar de 10 UFC/ml (Food and Drug Administration, United States.1995). La leche cruda debe pasteurizarse antes de 5 días siempre que la temperatura de mantenimiento sea igual o inferior a 4.4 grados. La leche chocolateada, se pasteuriza a 75 grados en vez de los habituales 72 grados. Un estudio que se llevó a cabo con leche chocolateada demostró que la cantidad de microorganismos aerobios totales tras 14 días de almacenamiento era mayor en esta leche que en la que carecía de cacao (Dolye, M.P. and Roman, D.J. 1982). Los investigadores sugieren que el chocolate en polvo contribuye de alguna manera al desarrollo de los microorganismos.

La leche, además, puede sufrir varios procesos para transformarse en productos diferentes como nata, quesos o mantequilla.

3.2 Quesos

El queso se puede definir como el producto que se obtiene por coagulación de la leche cruda o pasteurizada que puede ser entera, semidescremada y descremada y constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel deshidratado (Eck, 2000).

Es un alimento que se consume en todo el mundo y que tiene unas características nutritivas, funcionales, textuales y sensoriales que varían en cada tipo. Se calcula que hay alrededor de unas 2000 variedades de queso (Gunasekaran y Ak, 2003) entre curados, semi-curados y frescos.

La elaboración del queso implica fenómenos físicos y químicos que son muy complejos. Se trata de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche que es la caseína por la acción enzimática (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido que normalmente es el ácido láctico (Johnson y Law, 2011).

Por ejemplo, en lo quesos suaves, la coagulación se lleva a cabo aproximadamente a 38 grados mientras que por ejemplo para el queso tipo Oaxaca se tiene que llevar a 42 grados.

Finalmente, el salado proporciona el sabor y evita la proliferación de microorganismos así como ayuda a la formación de la corteza del queso.

3.2.1. Clasificación de los quesos

Se clasifican dependiendo de su textura o su contenido en humedad, si se maduran o no, si son las bacterias o los mohos los microorganismos que más colaboran en darle sus características peculiares, etc.

Según las características fisicoquímicas del tipo de queso se pueden clasificar en:

- Por humedad: Duros (20-42%); Semiduros (44-55%); Blandos o suaves (55%) (Scott et al. 1998)

- Tipo de coagulación de caseína: Coagulación enzimática; Coagulación ácida; Coagulación ácida /térmica (Dalglish.1999; Fox et al.2000; Gunasekaran y Ak. 2003).

- Maduración: frescos (6 días), Semi-madurados (40 días) y madurados (>70 días) (McSweeney, 2004).

En cuanto a las propiedades nutricionales, el queso en general comparte casi las mismas que la leche a excepción de la lactosa y destaca por ser una fuente importante de calcio y fósforo (Alais. 1985).

Debido al bajo contenido en humedad de los quesos duros y semiduros, son productos nada proclives a la alteración microbiana. Sin embargo, los mohos pueden desarrollarse en su superficie. Algunos quesos poseen potenciales de óxido-reducción suficientemente bajos para permitir el desarrollo de los anaerobios y no es extraño que las bacterias anaerobias a veces causen alteración cuando la actividad de agua les permite desarrollarse.

3.2.2. Fabricación de quesos

La gran mayoría de los tipos de quesos que existen, son el resultado de la fermentación láctica de la leche. En 1972, Hettinga y Reinbold publicaron una extensa revisión sobre estas bacterias lácticas.

Su fabricación pasa por dos etapas:

1. La leche se prepara e inocula con el cultivo iniciador específico para el tipo de queso que se esté elaborando. El cultivo iniciador generará ácido láctico, que junto a la quimosina añadida, forma la cuajada. Para lograr una acidificación en las

variedades de queso en las que se cuece la cuajada, se recurre a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, porque de entre las bacterias lácticas más habituales en la industria del queso, es la más termorresistente. También se pueden utilizar una combinación de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

2. La cuajada se corta, desuera y prensa y, a continuación, se sala y en el caso de los quesos se le somete a un proceso más o menos largo de curado en condiciones particulares y adecuadas a cada variedad de queso.

3.3. Valor nutricional de los productos lácteos

Los productos lácteos tienen una serie de características que les hacen ser uno de los pilares de la alimentación:

- Presentan una amplia gama de nutrientes. Hay un buen balance entre los principales constituyentes de la leche que son grasa, proteínas y carbohidratos. Gracias a estos balances, los productos lácteos pueden ser una gran oportunidad para cubrir las necesidades nutricionales de la población.

- Presentan una elevada densidad de nutrientes. Aportan gran variedad tanto de macro como de micronutrientes en relación a su contenido en calorías. Son alimentos ricos en proteínas y en calcio de fácil asimilación.

- Adaptabilidad: Presentan una composición variable en agua, lactosa, grasa, proteínas, vitaminas y minerales, lo que produce que se adapten de manera adecuada a todo tipo de dietas.

Las proteínas de la leche se componen principalmente de caseínas que representan entre un 80 y 85% del total de las proteínas lácteas. Si se produce una disminución del pH de la leche por debajo de 4.6, las caseínas precipitan. Cuando esto se produce, la fracción que permanece en ese estado líquido se denomina suero y en ese suero persisten solubles el resto de las proteínas de la leche entre las que hay que citar la seroalbúmina, inmunoglobulinas, etc. Los productos lácteos contienen proteínas con todos los aminoácidos esenciales que presentan una alta digestibilidad y valor biológico y por lo tanto se pueden definir como proteínas de alta calidad.

El carbohidrato que podemos encontrar fundamentalmente en la leche es lactosa (disacárido compuesto de glucosa y galactosa) aunque también se pueden encontrar pequeñas concentraciones de glucosa y ácido cítrico. El contenido graso varía entre el 3.5% y el 5%. Consiste mayoritariamente en triglicéridos compuestos de ácidos grasos. También se pueden encontrar pequeñas cantidades de diglicéridos y fosfolípidos. La gran parte de los lípidos encontrados en la leche están en forma de glóbulos grasos rodeados por una capa fosfolipídica. (Jay, J.M. et al. 2005).

Entre los ácidos grasos presentes en la leche, hay proporciones importantes de ácidos de cadena corta y media que va a favorecer su digestibilidad. Hay diversos componentes bioactivos de interés como la esfingomielina y el ácido linoleico conjugado (CLA) con poder cardioprotector y antitumoral.

El pH de la leche entera y fresca es aproximadamente de 6.6. Cuando la vaca padece mastitis, que es una infección de la ubre frecuentemente originada por *Streptococcus agalactiae*, puede llegar a pH 6.8. La leche fresca de un animal mamítico suele contener leucocitos (glóbulos blancos de la sangre) en una proporción superior a 10^6 /ml, en contraste con la leche de un animal sano, en la que solo aparecen unos 70.000/ml. La leche contiene vitaminas del grupo B: las dos más abundantes son el ácido pantoténico y la riboflavina (Jay, J.M. et al. 2005).

En los productos lácteos cobra gran importancia el aporte de calcio que en la dieta proporciona entre el 65-75% de la cantidad diaria recomendada. También son fuente de potasio, magnesio, zinc y fósforo.

3.4. Patógenos que pueden transmitirse por los alimentos lácteos

Si tenemos en cuenta que la leche es una gran fuente de nutrientes y además se asume el riesgo de que los animales que producen leche pueden albergar microorganismos que causan enfermedades a los seres humanos, es obvio que la leche cruda puede constituir una fuente de enfermedades.

Dentro de esta categoría, se pueden encontrar los procesos patológicos que son padecidos tanto por los humanos como por las especies animales que son productoras de leche: Brucelosis, Salmonelosis, Tuberculosis, Campilobacteriosis, Colitis enterohemorrágica, Carbunco, Listeriosis, Fiebre Q, Mastitis estafilocócica y estreptocócica, etc.

Ante de utilizarse los equipos de ordeño mecánicos, la leche cruda era el origen de enfermedades respiratorias tales como la difteria o las fiebres tifoideas. Cuando se ordeña una vaca manualmente, la leche se va depositando en un balde abierto y esto puede ocasionar que cualquier persona que esté infectada pueda contaminar la leche, ya sea por sus estornudos o mediante el contacto directo de la mano. Por ejemplo, en el año 1910, se produjo un importante brote de fiebre tifoidea en Nueva York cuyo origen estaba en un operario de una granja productora de leche que era portador crónico del agente etiológico de la fiebre tifoidea (Rosen, G. 1958).

Aunque se aplica un proceso muy estricto de pasteurización, la leche puede ser origen de diversas enfermedades. En el caso de campilobacteriosis, no es de extrañar que su agente causal se encuentre en la leche puesto que esta bacteria se encuentra de forma habitual en las heces. En un estudio realizado a partir de muestras tomadas de tanques de leche cruda de gran mezcla en Wisconsin, se encontró que las leches del 64% de los rebaños de grado A eran positivas en esa bacteria (Dolye, M.P., and D.J. Roman. 1982).

Entre 1973 y 1992, se demostró que de 46 brotes con 1.733 casos de gastroenteritis humana que radicaba en la leche cruda, *Campylobacter* fue responsable del 57%, *Salmonella* del 26% y *E.coli* O157:H7 del 2% (Headrick, M.L et al. 1998).

En otras investigaciones se ha detectado *Yersinia enterocolitica* en la leche cruda. En un estudio en Brasil, de 219 muestras de leche cruda, 37 contenían *Listeria* spp., mientras que el 32.4% contenía *Y.enterocolitica* (Tibana, A. et al. 1987). *Listeria monocytogenes* ha sido encontrada también en la leche de vaca (Gitter, M. et al. 1998).

Se realizó un estudio sobre la prevalencia de *E.coli* O157:H7 en diferentes muestras de heces de vacas de desecho y de leche a granel en la zona este de Tennessee y se comprobó que el 2% de las muestras de heces y el 0.7% de las de leche fueron positivas a esta bacteria (Murinda, S.E. et al. 2002).

Por último, la enfermedad de Johne del ganado vacuno parece tener alguna relación con la enfermedad de Crohn del ser humano. Hay ciertos microorganismos que están cuestionados por esta enfermedad: *Mycobacterium avium* subsp. *avium* origina la tuberculosis aviar que resulta infeccioso para pacientes con SIDA. *M.avium* subsp.

silvaticum es un patógeno obligado de algunos animales en los que produce paratuberculosis a los mamíferos y tuberculosis a las aves (Thorel, M.F. et al. 1990).

3.5. Seguridad alimentaria en la leche y productos lácteos

A la vista de los diversos microorganismos que pueden encontrarse en la leche y que pueden ser origen de enfermedades de transmisión alimentaria en el ser humano, se deben de seguir una serie de pautas a la hora de controlar los distintos tipos de productos lácteos.

Para el control de leche cruda de vaca se deben de seguir una serie de pasos:

- Los operadores tienen que realizar unos controles mínimos obligatorios para determinar que se cumplen los requisitos higiénicos-sanitarios y poder comercializar dicha leche. Tales controles afectan tanto a la explotación como al centro lácteo (Real Decreto 1728/2007).

- Si no se cumplen los requisitos de gérmenes y células somáticas, los operadores de la empresa deben informar a la autoridad competente y adoptar medidas para corregir la situación. Si en un plazo de 3 meses no se corrige la situación, se deberá suspender la entrega de leche cruda de la explotación de producción o en su defecto se deberá someter dicha entrega a los requisitos de tratamiento para la protección de salud pública.

- Se debe de realizar un control para corroborar que el contenido de gérmenes a 30 grados de la leche cruda es inferior a 300.000 colonias por mililitro, previamente a ser procesado.

Cuando el queso se fabrica y vende en su totalidad en la explotación directamente al consumidor final se considera venta al por menor y pueden elaborarse de conformidad con los requisitos establecidos en el Reglamento (CE) nº 852/2004 así como en el anexo III, sección IX, capítulo I relativo a la leche cruda del Reglamento (CE) nº 583/2004.

Para realizar la producción y comercialización de calostros y productos a base de calostro se someten a requisitos específicos de higiene.

También se deben de usar los métodos de referencia sobre la leche cruda y la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina sobre la leche tratada térmicamente.

No se puede autorizar el suministro directo por la parte del productor de pequeñas cantidades de leche cruda al consumidor final o a establecimientos locales de venta al por menor que suministran directamente al consumidor final (Real Decreto 640/2006).

La leche cruda de otras especies distintas al bovino que no cumpla los criterios en cuanto a contenido en gérmenes y células somáticas, puede utilizarse para la elaboración de quesos con un ciclo de maduración de 60 días como mínimo y productos lácteos obtenidos en relación con la fabricación de dichos quesos, siempre que se registre el tiempo de permanencia de cada lote de productos para garantizar una estancia mínima de 60 días (Real Decreto 640/2006).

3.6. Tratamientos de conservación de la leche y los productos lácteos

Termización: Proceso de conservación que consiste en calentar la leche a temperaturas de 57-68 grados durante 15 segundos con la finalidad de disminuir el número de bacterias termo sensibles (psicrotrofas y psicrófilas) que son capaces de multiplicarse de manera significativa a temperaturas en torno a los 8 grados. Es el primer paso antes de los tratamientos de elaboración a los que se someterá posteriormente.

Pasteurización: El objetivo de la pasteurización de la leche es la destrucción de todos los microorganismos que puedan causar una enfermedad. Aunque los patógenos pueden destruirse mediante otros métodos que no implican calentamiento, la pasteurización de la leche se hace exclusivamente mediante tratamientos térmicos.

Hay diferentes modalidades de pasteurización. El método LTLT (baja temperatura, largo tiempo) consiste en lograr un calentamiento en la parte más fría de la leche de 63 grados durante 30 minutos. Se le conoce como el método discontinuo o de aplicación de calor por lotes.

La otra modalidad de pasteurización que es más utilizada es el HTST (alta temperatura, corto tiempo) que aplica 72 grados durante 15 segundos. Se le conoce

como el método instantáneo o flash que es menos destructivo de las propiedades del alimento que el LTLT.

El fundamento de los pares de tiempo y temperatura aplicados es el tiempo de muerte o destrucción térmica (TDT) del patógeno no esporulado más termorresistente que pueda estar presente en la leche. En la leche bien pasteurizada, la enzima nativa de la leche, la fosfatasa alcalina, ha de quedar inactivada (Vaclavik, V.A. and E.W. Christian. 2003).

Se ha puesto en duda la capacidad de destrucción de los tratamientos LTLT y HTST de algunas subespecies de micobacterias relacionadas con la enfermedad de Crohn. La mayoría, si no todas, las Gram negativas (sobre todo las psicrotofas) se destruyen durante la pasteurización junto con muchas Gram positivas. Al proceso pasteurizante, no obstante, sobrevive algún número de bacterias Gram positivas de los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* (*S.salivarius* subsp. *thermophilus*), *Microbacterium*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium*, así como la mayor parte de los microorganismos esporulados. Entre los supervivientes puede haber una cantidad de psicrotofos del género *Bacillus* (McComas, K.A. and Gilliland S.E. 2003).

Esterilización: En este proceso la leche se va a someter a temperaturas altas (115-120 grados) durante 15-30 minutos para asegurar la destrucción total de microorganismos y esporas y así dar lugar a un producto que sea estable y tenga un largo periodo de conservación. Este proceso y la conservación posterior provocan una pérdida de vitaminas sobre todo B1, B12 y C, así como disminución de la disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales.

Esterilización UHT: En este método denominada Ultra alta temperatura, la cantidad de microorganismos esporulados también se reduce drásticamente. Este tratamiento consiste en calentar la leche a una temperatura de 135-140 grados durante unos pocos segundos. La leche UHT es comercialmente estéril y se le da una vida útil de 40-45 días a 4.4 grados, siempre que se envase en condiciones asépticas (Bodnaruk, P.W. et al. 1998).

3.7. Productos fermentados

La mantequilla, la mazada fermentada y la nata ácida son productos que se elaboran inoculando un cultivo iniciador en leche o nata pasteurizada e incubando hasta que se alcanza el grado de acidez que se desee.

El yogur se elabora con el cultivo iniciador del yogur que es un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en proporción 1:1. El yogurt se puede elaborar con leche desnatada o entera a la que se le añaden hasta un 5% de sólidos lácteos y luego se le somete a una condensación o a vacío para evaporar agua hasta conseguir una reducción del contenido en humedad de una cuarta parte. La leche que ya está concentrada se trata térmicamente a 82-93 grados durante 30-60 minutos y se deja enfriar a unos 45 grados (Pederson, C.S. 1979). Se le añade el cultivo iniciador, se incuba a 42 grados durante 3-5 horas y posteriormente se enfría el producto de la fermentación hasta 5 grados.

Un yogurt recién elaborado puede contener unas 10^9 bacterias/gramo. El número de lactobacilos decrece más que el de los cocos.

El kéfir se elabora a partir de granos de kéfir y leche. Estos granos contienen *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* y alguna levadura de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*. Esta microbiota simbiotes se mantiene unida mediante proteínas coaguladas (Garrote, G.L. et al. 2000).

La leche acidófila se elabora inoculando una cepa de *L.acidophilus*.

La mantequilla no es un alimento muy dado a la alteración pero los mohos y las bacterias pueden deteriorarlo. Contiene sobre un 15% de hidratos y proteínas y la gran mayoría, el 81%, son grasas. La mantequilla salada puede llegar a contener hasta un 2% de sal, lo que quiere decir que las gotas de agua dispersas en la mantequilla van a tener un 10% de cloruro sódico, lo que va a hacer que la mantequilla sea un sustrato poco favorable para el crecimiento bacteriano (Henning, D.R.1999).

Por otro lado, hay mohos que pueden causar alteraciones en la mantequilla. Algunos de estos son especies de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Geotrichum*. Este crecimiento hará que la superficie cambie

de tonalidad debido a los colores de las esporas generadas por los mohos contaminantes. El género *Torula* hace que la mantequilla se ponga de tonalidad negruzca. Debido a su bajo contenido en agua y alto contenido en grasa, hace que este alimento sea más susceptible de alterarse por mohos que por bacterias.

Otro tipo de queso, el queso *Cottage*, puede alterarse por bacterias, mohos y levaduras siendo la alteración más común la cuajada viscosa. *Alcaligenes* spp. suele ser el agente causal más frecuente, de modo que la vida útil de este queso queda limitada por el desarrollo de mohos y levaduras (Roth, L.A. et al. 1971).

3.8. Enfermedades causadas por bacterias lácticas

Las bacterias lácticas proporcionan muchos beneficios pero algunas de ellas están vinculadas con enfermedades del ser humano. Aguirre y Collins (2009), han revisado este problema y han recopilado hasta 68 casos en los que se ha asociado un lactobacilo con una enfermedad clínica humana en un periodo de 50 años. Hay varias especies de *Leuconostoc* y *pediococos* que se han identificado como responsables de algunos casos. Los enterococos ocupan el tercer puesto como causantes de infecciones nosocomiales que son enfermedades transmitidas en un hospital, siendo *E.faecium* y *E. faecalis* las especies más implicadas.

4. Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo es determinar la carga microbiana de distintos productos lácteos y comparar el número y tipo de microorganismos encontrados en leche cruda recién ordeñada, leche pasteurizada y en productos derivados de la leche.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Determinar la carga microbiana presente en distintos productos lácteos
2. Evaluar la eficacia de la pasteurización de la leche en la reducción de los recuentos de microorganismos
3. Determinarla cantidad de microorganismos presentes en quesos fabricados con leches de diferente origen
4. Realizar un estudio comparativo de la cantidad y tipos de microorganismos presentes en leche y en sus productos derivados

5. Material y métodos.

5.1. Material utilizado

- Recogida del material: tubos estériles.
- Preparación de los medios de cultivo: agua destilada, medios de cultivo deshidratados, matraces aforados, probeta, algodón, papel de aluminio, balanza, autoclave, baño termostático, placas de Petri, mechero Bunsen. (Fig.1A)
- Preparación de la solución salina: cloruro de sodio, agua destilada, matraz aforado, balanza, tubos eppendorf de 1ml y una gradilla. (Fig.1B)

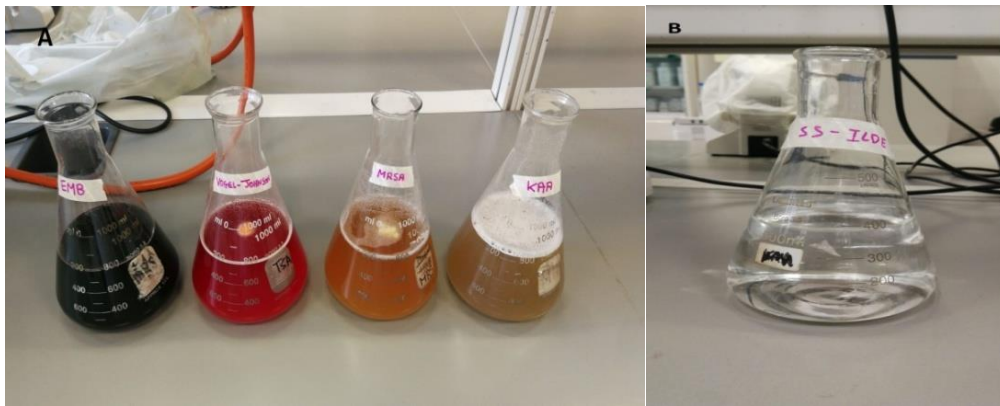


Fig.1. Preparación de los medios de cultivo y solución salina. **A**, preparación de los medios de cultivo antes de su esterilización. **B**, preparación de solución salina.

- Procesamiento de las muestras: balanza, homogeneizador, bolsas estériles y herméticas.
- Siembra de las muestras: Mechero Bunsen, micropipetas, puntas para micropipetas, placa, asa de Drigalski, estufa de cultivo a 37 °C y estufa de cultivo a 30°C.
- Tinción de Gram: Colorantes (safranina, lugol, cristalvioleta), etanol 96°, agua destilada, porta objetos, aceite de inmersión y microscopio óptico.
- Prueba Catalasa: Porta objetos, Agua oxigenada, asa de siembra.

5.2. Alimentos empleados

Para la realización del proyecto se emplearon 11 muestras de productos lácteos y derivados (Tabla 1). Algunas de esas muestras fueron obtenidas en establecimientos tanto en la localidad de Bailén como en Jaén. También tuve la

suerte de poder participar personalmente en la recolección de algunas muestras directamente del ganado caprino. De las 11 muestras analizadas, 5 procedían de quesos, 1 de yogurt y las 5 restantes de diferentes tipos de leche en las que se estableció una comparación entre los distintos tipos, es decir, Desnatada, Semidesnatada y Entera. La mayoría de leches son frescas. Una vez recogidas las muestras, éstas se conservaron en la cámara fría hasta su procesamiento.

Queso	Leche	Yogurt
Queso fresco vaca (A)	Leche cabra ordeñada 1 (F)	Yogurt natural 0% (Y)
Queso curado mixto(B)	Leche cabra ordeñada 2 (G y L)	
Queso fresco cabra (C)	Leche vaca entera fresca (H)	
Queso fresco oveja (D)	Leche vaca desnatada fresca (J)	
Queso Maasdam vaca (E)	Leche vaca semidesnatada fresca (K)	

Tabla 1. Muestras de productos lácteos y derivados empleados en la realización del proyecto.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

5.3. Medios de cultivo

Se emplearon diferentes medios de cultivo, todos ellos pertenecían a la casa comercial Scharlab (Barcelona). Para su preparación se siguen las indicaciones del fabricante que se encuentran en el etiquetado de cada medio de cultivo. Tras su pesado y dilución en agua destilada, los medios se esterilizan en el autoclave, con un ciclo de 15 a 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de vapor. Finalizado el proceso de esterilización, los medios se atemperan a 50°C y se vierten en placas de Petri, aproximadamente a razón de 15ml por placa.

Con el fin de analizar los diferentes grupos microbianos que pueden aparecer en este tipo de alimentos, se prepararon 5 tipos de medios de cultivo de los que uno de ellos era un medio de cultivo no selectivo y los cuatro restantes eran medios de cultivo selectivos. Los diferentes medios utilizados fueron:

- Medio de cultivo no selectivo:

-Tryptona Soja Agar (TSA)

- Medios de cultivo selectivos:

-*Lactobacillus Agar according to DeMan, Rogosa and Sharpe* (MRS Agar)

-Kanamicina esculina azida Agar (KAA)

-Eosina Azul de Metileno Agar (EMB)

-Vogel Johnson Agar (VJ)

5.3.1. Preparación de medios de cultivo no selectivos.

5.3.1.1. Tryptona Soja Agar (TSA)

Este medio sólido tiene un uso general para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos. La presencia de dos peptonas (peptona de soja y peptona de caseína) favorecen el crecimiento de estos microorganismos. Es un medio de cultivo clásico para el cultivo de microorganismos tanto exigentes nutricionalmente como no exigentes, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias.

Debido a su fiabilidad y sus resultados, que son fácilmente reproducibles, se suele utilizar con frecuencia para fines de diagnóstico de rutina.

Composición (g/L)

-Agar: 15,00

-Tiosulfato sódico: 0,50

-Polisorbato 80: 5,00

-Lectina: 0,70

-Histidina: 1,00

-Cloruro sódico: 5,00

-Peptona de soja: 5,00

-Peptona de caseína: 15,00

Preparación

El fabricante nos indica que debemos añadir 40 gramos de medio de cultivo por litro de agua destilada. Ya que nosotros queremos preparar 800 mililitros, añadimos 32 gramos de medio de cultivo a un matraz Erlenmeyer, disolvemos en el volumen de agua destilada y posteriormente lo tapamos con algodón hidrófobo y papel de aluminio. A continuación, se esteriliza en el autoclave. Finalizado este proceso, introducimos el matraz en el baño para enfriarlo hasta 55°C y a continuación se extiende en las placas de Petri (es importante realizar el proceso al lado de un mechero Bunsen para evitar la contaminación de las placas).

5.3.2. Preparación de medios de cultivo selectivos.

5.3.2.1. *MRS Agar*

Se emplea para el cultivo y recuento de bacterias lácticas, tanto en productos lácteos como en otros productos alimenticios. También permite el recuento de lactobacilos del yogurt si se acidifica hasta $\text{pH}=5,5 \pm 0,1$.

La adición de manganeso, magnesio y acetato junto con el polisorbato aportan los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de lactobacilos.

Gracias a la alta calidad de las peptonas y los suplementos de extractos de carne y levadura van a proporcionar unos factores de crecimiento necesarios que hacen al MRS uno de los medios más completos para el cultivo de lactobacilos.

Composición (g/L)

-Peptona proteosa:10,00

-Extracto de carne:8,00

-Extracto de levadura:4,00

-Agar:14,00

-Polisorbato 80: 1,00

-Fosfato dipotásico: 2,00

-Sulfato manganoso: 0,05

- Sulfato magnésico: 0,20
- Citrato triamónico: 2,00
- Acetato sódico: 5,00
- D(+)-Glucosa: 20,00

Preparación

El fabricante nos indica que hay que añadir 62 gramos de medio de cultivo por cada litro de agua destilada. En nuestro caso queremos preparar 800 mililitros por lo que añadimos 49,6 gramos de medio de cultivo. Posteriormente tapamos el matraz con algodón hidrófobo y papel de aluminio. Esterilizamos en autoclave durante 20 minutos a 121°C y tras este proceso dejamos el matraz enfriar en el baño para finalmente verter el medio de cultivo en las placas de Petri.

5.3.2.2. Kanamicina esculina azida Agar (KAA)

Este medio de cultivo es utilizado para identificar y aislar enterococos. Gracias a la presencia de Kanamicina y Azida de sodio es posible inhibir el crecimiento de bacterias acompañantes. Ya que el medio presenta esculina, es posible que se produzca la aparición de colonias de color negro debido a la hidrólisis que realizan estas bacterias, hasta esculentina.

Composición (g/L)

- Tryptona: 20,00
- Extracto de levadura: 5,00
- Cloruro sódico: 5,00
- Citrato disódico: 1,00
- Esculina: 1,00
- Citrato férrico amónico: 0,50
- Azida sódica: 0,15
- Kanamicina sulfato: 0,02

pH final a 25 grados, $7,0 \pm 0,2$.

Preparación

En el etiquetado del bote comercial, nos indica añadir 48 gramos de medio de cultivo por cada litro de agua destilada. En nuestro caso, añadimos 38.4 gramos de medio de cultivo ya que queremos preparar 800ml. Tras este proceso, agitamos y tapamos el matraz con algodón hidrófobo y con papel de aluminio. Se introduce en el autoclave para esterilizarlo durante 20 minutos a 121°C. Finalmente, se introduce en el baño para enfriarlo y se vierte en las placas de Petri.

5.3.2.3. Eosina Azul de Metileno Agar (EMB)

Se emplea como medio diferencial para el aislamiento y diferenciación de bacterias entéricas Gram-negativas.

A partir de la mezcla de azul de metileno y eosina consigue un efecto diferenciador entre las bacterias capaces de fermentar la lactosa y las que no lo son. Posteriormente la inclusión de la sacarosa fue propiciada para aquellos microorganismos que fermentan con dificultad a la lactosa y fácilmente la sacarosa.

Se pueden distinguir algunos géneros gracias a la combinación de estos dos colorantes y los dos hidratos de carbono. Por ejemplo, las bacterias lactosa-negativas y sacarosa negativas (*Salmonella* y *Shigella*) dan colonias incoloras. Las lactosa y/o sacarosa-positivas dan colonias púrpura-violeta negruzco con/sin un centro oscuro y quedan rodeados de una zona que es incolora. Destaca en este medio el crecimiento de la especie *Escherichia coli*, que aparece con un brillo verde metálico característico. La microbiota acompañante queda inhibida por el efecto de estos colorantes (sobre todo las bacterias Gram-positivas).

Composición(g/L)

-Lactosa: 5,00

-Eosina Amarillenta: 0,40

-di-Potasio Hidrógeno Fosfato: 2,00

-Agar: 13,50

-Azul de Metileno: 0,065

-Peptona Bacteriológica: 10,00

-Sacarosa: 5,00

pH: 7,2±0,2

Preparación

El fabricante nos indica que se deben suspender 37,4 gramos por cada litro de agua destilada. En nuestro caso, solo necesitamos 800 mililitros por lo que pesamos 28.8 gramos de medio de cultivo. Posteriormente se agita el matraz y se tapa con un algodón hidrófobo y papel de aluminio. Se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C. Finalmente, dejamos atemperar el matraz en el baño y se extiende en placas de Petri.

5.3.1.4. *Vogel Johnson Agar (VJ)*

Medio selectivo para la detección y enumeración de estafilococos patógenos. La presencia en este medio de Litio Cloruro, Glicina y Telurito Potásico le dan a este medio una fuerte acción selectiva donde la microbiota secundaria se inhibe casi por completo. Por otro lado, los estafilococos reducen el telurito a telurio metal lo que produce colonias negras sobre un fondo rojo si son fermentadores de manitol. También se pueden dar colonias negras rodeadas de un halo amarillo si los estafilococos son fermentadores del manitol.

Si se produce un cambio de color del medio se debe al viraje del indicador del pH que se produce por la acumulación de productos ácidos que se producen en la fermentación del manitol.

Composición (g/L)

-Peptona de caseína:10,00

-Manitol:10,00

-Extracto de levadura: 5,00

-Fosfato dipotásico:5,00

-Cloruro de litio:5,00

-Glicina:10,00

-Rojo de fenol:0,025

-Agar: 15,00

pH final a 25 grados, $7,2 \pm 0,2$

Preparación

En el etiquetado comercial nos indica que debemos de suspender 60 gramos del medio en un litro de agua destilada. En nuestro caso, preparamos 800 mililitros de agua destilada por lo que le añadimos 48 gramos del medio a un matraz Erlenmeyer. Posteriormente agitamos y tapamos el matraz con un algodón hidrófobo y papel de aluminio. Autoclavamos a 121°C durante 20 minutos, se atempera el matraz en el baño y se añadió 16 mililitros de una solución de (Telurito Potásico) al 1%(previamente esterilizada por filtración). Se homogeneiza el medio y se extiende en placas de Petri.

5.4. Procesado de los alimentos

Una vez obtenidas las muestras de los productos lácteos y sus derivados, se transportan al laboratorio en las condiciones más asépticas teniendo precaución para no contaminarlas.

Con cada alimento, tenemos que realizar el mismo proceso. Se va a pesar 5 gramos o bien medir 5 mililitros (en este caso con la leche) de cada alimento y se va a introducir en una bolsa hermética a la que se le va a añadir 45 mililitros de solución salina estéril al 0,9% para ser procesado en el homogeneizador (Stomacher 80 Biomaster, Seward Ltd.). Para facilitar la posterior extracción del líquido, se vierte la mezcla de solución salina y el alimento en un tubo Falcon. El resultado de la mezcla es lo que vamos a considerar como dilución cero.

3.4.1 Diluciones seriadas

Hay que realizar varias diluciones seriadas. Para esto, hay que añadir 100 microlitros de la solución madre en tubos Eppendorf de 1,5ml. Cada uno de estos tubos, contiene 0,9 ml de solución salina que ha sido preparada previamente. Para preparar las diluciones seriadas, partimos de nuestra dilución cero, que, tal y como se ha mencionado anteriormente, bolsa procede de la bolsa hermética con el

alimento homogeneizado en solución salina. De esta dilución cero, se extrae 100 microlitros con una micropipeta y se añade a uno de los tubos eppendorf. Este tubo será la dilución -1. Hacemos la misma operación, medimos 100 microlitros del tubo -1 y se vierte sobre otro tubo que va a ser la dilución -2. Realizamos esta operación hasta la dilución -4 que será la más diluida. Es importante tener en cuenta que después de hacer cada dilución se debe cambiar la punta de la micropipeta para evitar arrastrar bacterias de la dilución anterior y también es importante voltear el eppendorf para facilitar la homogeneización del líquido. Todo este proceso es realizado en condiciones de esterilidad al lado del mechero Bunsen. (Fig 2.)

La finalidad de realizar las diluciones seriadas es para poder realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro de alimento (UFC/g) tras la siembra e incubación de las muestras.



Fig 2. Diluciones seriadas.

5.4.2. Siembra en placas

Una vez que se ha realizado todo el proceso de las diluciones seriadas, se comienza con la siembra de las muestras en los medios de cultivo. Para esto, se toman 100 microlitros de cada una de las diluciones y se depositan en sus placas correspondientes, extendiéndose a continuación con un asa de Digralsky. Se recomienda realizar este proceso desde la placa más diluida a la más concentrada. Todo este proceso hay que realizarlo en condiciones de esterilidad al lado del mechero Bunsen.

De cada alimento se van a sembrar las siguientes placas:

- 10 placas del medio TSA: 2 placas con la dilución 0, 2 placas con la dilución -1, 2 placas con la dilución -2, 2 placas de la dilución -3, 2 placas de la dilución -4.
- 4 placas del medio EMB: 2 placas con la dilución 0, 2 placas con la dilución -1.
- 4 placas del medio VJ: 2 placas con la dilución 0, 2 placas con la dilución -1.
- 4 placas del medio KAA: 2 placas con la dilución 0, 2 placas con la dilución -1.
- 4 placas del medio MRS: 2 placas con la dilución 0, 2 placas con la dilución -1.

Es decir, del medio no selectivo se siembran 10 placas, desde la dilución 0 a la dilución -4, realizando cada una por duplicado. De los medios selectivos, se realiza solamente las diluciones 0 y 1, cada una por duplicado. En total, tenemos que sembrar 26 placas por alimento. (Fig. 3.A)

Una vez sembradas, las placas se incuban en la estufa 37°C durante 48 horas excepto las placas del medio MRS Agar que se incuban a 30°C ya que es la temperatura óptima de crecimiento para las bacterias lácticas.(Fig. 2.B)

Las placas siempre se introducen en la estufa boca abajo y es importante rotularlas de manera correcta para evitar confusiones. Ejemplo: A.ILDE.MRS , donde A es el alimento que se ha sembrado.

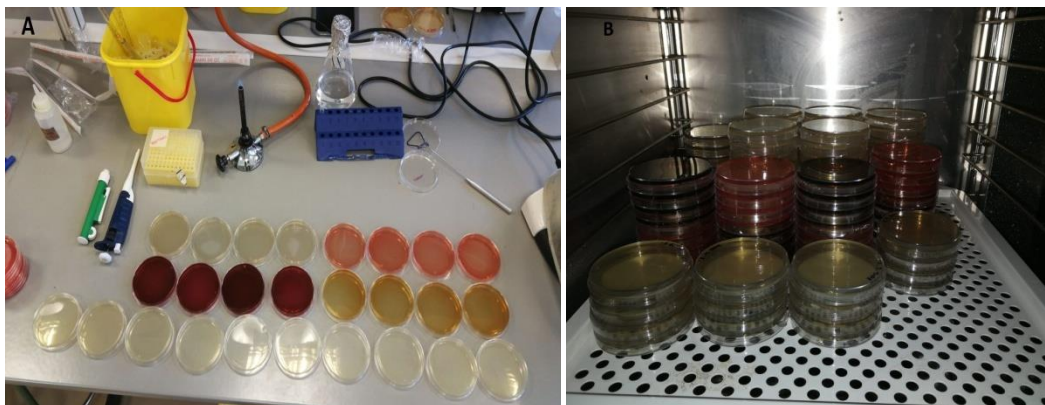


Fig. 3.A. Placas con los diferentes medios de cultivo para cada alimento. Fig. 3.B. Placas ya sembradas en la estufa a 37°C.

5.5. Recuento de placas

Una vez que se siembran las placas, tal y como se ha mencionado antes, se dejan incubar 48 horas en la estufa para que se produzca crecimiento bacteriano. A continuación, se extraen las placas de la estufa y se observa una a una el tipo de colonias que aparecen (morfología y color).

Este recuento que hay que realizar consiste en la enumeración de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) presentes en una unidad del alimento (gramo o mililitro).

$$UFC/g = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen}}$$

El recuento se debe de realizar en la placa que corresponda a la dilución en la que el crecimiento bacteriano se encuentre entre 30 y 300 colonias.

El factor de dilución es la dilución donde se haya efectuado el recuento.

El volumen siempre es 0,1 debido a que depositamos 100 microlitros (0,1 mililitros) de cada dilución en las placas a la hora de sembrarlas.

Hay que tener en cuenta que en las muestras sólidas, en las que tenemos 5 gramos de alimento en 45 ml de solución salina, se realiza una dilución previa por lo que estos alimentos van a tener una dilución adicional de 10. En el caso de los alimentos líquidos (leche) no hay que tener en cuenta ninguna dilución adicional.

5.6. Tinción de Gram y prueba de la catalasa

5.6.1. Tinción de Gram

Esta tinción permite, en función de la estructura y grosor de la pared bacteriana, clasificar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas así como evaluar su morfología (coco o bacilo) y tipo de agrupación (parejas, cadenas, racimos...). Para realizar la tinción de Gram se utilizan dos colorantes (cristal violeta y safranina) con los que vamos a conseguir que las bacterias Gram + se tiñan de un color azul/morado, mientras que las bacterias Gram - se tiñen de color rosa. La tinción de Gram involucra varios pasos:

-Sobre un portaobjetos limpio y seco, depositamos una pequeña gota de agua. Con un asa de siembra, picamos una colonia bacteriana y la depositamos sobre la gota de agua y extendemos.

-A continuación dejamos secar la extensión para después fijarla con calor, pasando 2 ó 3 veces por la llama del mechero.

-Una vez que la preparación se enfríe, se tiñen las células con cristal violeta (colorante primario). Con este colorante las células se tiñen de color morado. Añadimos cristal violeta durante 2 minutos y pasado este tiempo escurrimos el colorante.

-Pasados los 2 minutos, se añade Lugol. El Lugol reacciona con el colorante cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro que favorece la tinción de las bacterias. Dejamos actuar el lugol 2 minutos.

-El siguiente paso es una decoloración. Adicionamos alcohol etílico de 96° para producir el lavado del complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. Este paso es crítico en la tinción y hay que tener cuidado en no dejar actuar el alcohol demasiado tiempo para evitar la decoloración de las Gram positivas así como no dejarlo actuar poco tiempo ya que no se produciría la decoloración de las Gram negativas. Para realizar la decoloración adicionamos sobre un extremo alcohol etílico y dejamos que escurra por toda la preparación. Tras este paso, es importante lavar abundantemente con agua destilada para eliminar los restos de alcohol etílico.

-Se vuelve a teñir con Safranina por lo que aquellas bacterias Gram negativas que habían sido decoloradas, ahora se tiñen de color rosado. A las bacterias Gram positivas no le afecta esta contra tinción por lo que van a seguir de color morado. Se añade Safranina y se deja actuar 3 minutos. (Fig 4.)

-Finalmente se lava la preparación con agua destilada, se deja secar y se observa al microscopio con el objetivo de 100 aumentos utilizando aceite de inmersión.

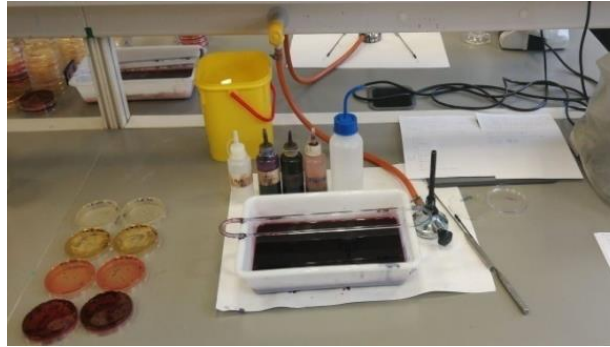


Fig 4.Diferentes colorantes usados en la tinción de Gram.

5.6.2. Prueba de la catalasa

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de carbohidratos.

La acumulación del peróxido es muy tóxico para los microorganismos, por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus* sp. producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno gas (Gil Microbitos.2011).

Se usa con frecuencia para diferenciar géneros como *Streptococcus* (-) de *Staphylococcus* (+) y *Micrococcus* (+) así como de *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-) (Rodríguez et al. 2005b).

En nuestro caso, esta prueba la realizamos sobre un portaobjetos en el que añadimos una gota de peróxido de hidrógeno al 30%, flameamos el asa de siembra y picamos sobre una colonia bacteriana extendiéndola después sobre la gota de peróxido de hidrógeno hasta que la colonia se desprenda totalmente del asa de siembra.

Hay que comprobar si se produce efervescencia, es decir, se libera O_2 , por lo que la prueba se consideraría positiva (Fig. 5) o si por el contrario no se produce efervescencia, por lo que la prueba se consideraría negativa.



Fig. 5. Ejemplo de Catalasa positiva

6. Resultados

6.1. Recuento Microbiano de las colonias

Tras 48 horas de incubación, se procede al recuento del número de colonias en cada medio de cultivo. Para esto, se deben elegir aquellas placas en las que el crecimiento bacteriano sea de 30 a 300 colonias y posteriormente proceder a su recuento. Una vez realizado este proceso, se procede al cálculo de las Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro de alimento (UFC/g o UFC/ml) para los distintos alimentos analizados y en todos los medios de cultivos empleados. Este método nos permite conocer la cantidad de microorganismos presentes en cada alimento.

En cada placa, primero realizamos un análisis macroscópico, es decir, identificamos el número de microorganismos diferentes que han crecido en función del color y tamaño de las distintas colonias. Después, y gracias a la tinción de Gram, realizamos un análisis microscópico que nos va a permitir clasificar cada tipo bacteriano según su tipo de pared celular, su morfología y su agrupación.

Finalmente, realizamos la prueba de la catalasa que nos permite una identificación presuntiva de diferentes géneros.

La siguiente tabla (Tabla 2.) recoge las Unidades Formadoras de Colonias obtenidas en cada alimento:

	TSA	MRSA	KAA	EMB	VJ
Queso fresco Vaca (A)	1.18×10^7	$>3.00 \times 10^5$	4.5×10^2	3.8×10^3	4.5×10^2
Queso curado mixto (B)	4.10×10^6	$>3.00 \times 10^5$	0	1.32×10^4	1.15×10^3
Queso fresco Cabra (C)	1.81×10^8	$>3.00 \times 10^5$	$>3.00 \times 10^5$	$>3.00 \times 10^5$	$>3.00 \times 10^5$
Queso fresco Oveja (D)	2.86×10^8	$>3.00 \times 10^5$	$>3.00 \times 10^5$	$>3.00 \times 10^5$	7.2×10^4
Queso Maasdam Vaca (E)	1.73×10^5	6.25×10^4	0	2.15×10^4	0
Leche cabra ordeñada 1 (F)	1.45×10^5	1.6×10^3	0	4×10^3	6.55×10^4
Leche cabra ordeñada 2 (G y L)	1.46×10^7	0	0	3×10^3	3×10^3
Leche vaca entera fresca (H)	0	0	0	0	0
Leche vaca desnatada fresca (J)	0	0	0	0	0
Leche vaca Semi fresca (K)	0	0	0	0	0
Yogurt Natural 0% (Y)	0	0	0	0	0

Tabla 2. Unidades Formadoras de Colonias obtenidas en cada alimento en los correspondientes medios de cultivo.

A simple vista, se aprecia una gran diferencia entre los recuentos obtenidos en la leche y en el queso, siendo en estas últimas muestras muy superiores.

Los mayores recuentos se han observado en el medio TSA ya que como se ha mencionado anteriormente se trata de un medio general en el que puede crecer una amplia variedad de bacterias, tanto Gram + como Gram -. El alimento que mayor carga microbiana ha presentado es el Queso fresco de oveja (2.86×10^8 UFG/g)

seguido del Queso fresco de cabra (1.81×10^8) y del queso fresco de vaca (1.18×10^7). Por el contrario, la Leche de cabra ordeñada 1 es la muestra que menos carga microbiana ha presentado (1.45×10^5). Se han obtenido recuentos nulos tanto en este medio como en todos los medios selectivos empleados para los tres tipos de leche envasada que se han ensayado, resultado que era de esperar gracias a los tratamientos térmicos de pasteurización a que se somete la leche para su venta con una vida útil lo más prolongada posible. Igualess resultados se han observado en el yogur, sin crecimiento microbiano detectable en ninguno de los medios empleados y probablemente debido al mismo motivo.

En el medio MRSA, que permite el crecimiento de bacterias lácticas, hay un gran crecimiento microbiano tanto en los tres tipos de queso fresco como en el queso curado, obteniéndose un elevado número de UFC/g, incluso por encima del límite de detección en los ensayos realizados ($>3.00 \times 10^5$). En la muestra del Queso Maasdam de Vaca también se obtuvo un elevado recuento (6.25×10^4) así como en la leche de cabra ordeñada 1 (1.6×10^3), siendo nulo en todas las muestras restantes.

En el medio KAA, selectivo para enterococos, es en el que menores recuentos se han obtenido en general, siendo las muestras de queso fresco las únicas que han mostrado crecimiento microbiano. En las muestras del queso fresco de cabra y de oveja, las placas presentaban un intenso crecimiento que produjo un color negro (Fig.6) a consecuencia de la hidrólisis de la esculina, como puede apreciarse en la imagen. En ambos casos los recuentos fueron superiores a $>3.00 \times 10^5$ UFC/g. El queso fresco de vaca también presentó crecimiento en este medio, aunque con un recuento inferior, de 4.5×10^2 UFC/g.



Fig. 6. Intenso crecimiento producido en el medio KAA.

En el medio EMB, selectivo para el crecimiento de enterobacterias, se observa que las muestras que tienen mayor carga microbiana son el queso fresco de cabra y de oveja, con recuentos superiores a 3.00×10^5 UFC/g en ambos casos y la que menor recuento mostró es el queso fresco de Vaca (3.8×10^3 UFC/g), junto con las dos leches de cabra procedentes de ordeño directo (con 3×10^3 y 4×10^3 UFC/g respectivamente).

Por último, en el medio VJ se observa que, al igual que en los otros medios, la muestra que mayor crecimiento microbiano presenta es la de queso fresco de cabra ($>3.00 \times 10^5$ UFC/g) seguido por el queso fresco de oveja (7.2×10^4 UFC/g) y de la leche de cabra ordeñada 1 (6.55×10^4 UFC/ml), siendo en este medio selectivo el queso fresco de Vaca (4.5×10^2 UFC/g) el que presenta menor crecimiento microbiano.

En general, la muestra en la que se ha producido mayor crecimiento microbiano es en la del queso fresco de cabra, obteniéndose un crecimiento superior a 3.00×10^5 UFC/g en todos los medios selectivos ensayados, seguido por el queso fresco de oveja, en el que se han obtenido recuentos muy similares.

A continuación, muestro un ejemplo de los recuentos realizados en los diferentes medios (Fig. 7).

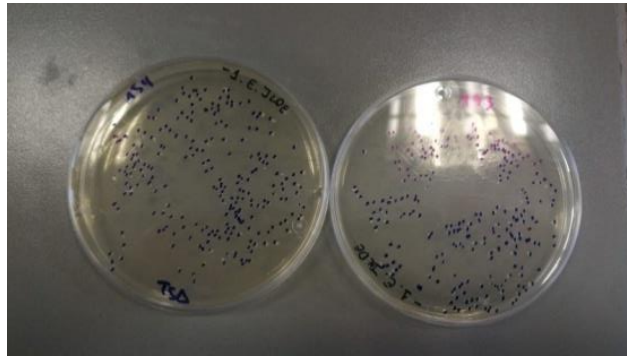


Fig.7. Ejemplo de placa marcada para realizar el recuento microbiano.

6.2. Características macroscópicas

En el medio TSA, hemos aislado una gran diversidad de colonias (Fig. 8), blancas, amarillas, transparentes y de diferentes tamaños y densidades.

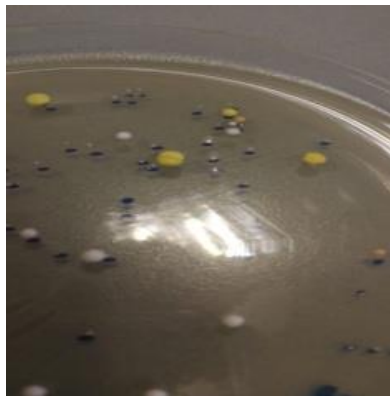


Fig. 8. Ejemplo de colonias encontradas en el medio TSA.

En el medio KAA suelen aparecer colonias pequeñas y blancas, algunas con un halo negro (Fig. 9).

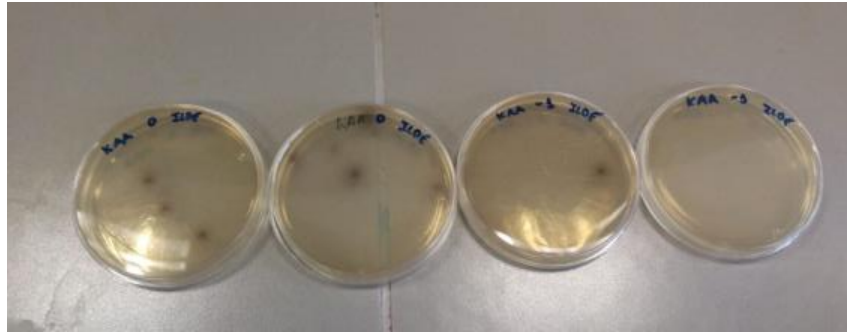


Fig. 9. Ejemplo Medio KAA con colonias con halo negro.

En el medio MRSA podemos encontrar colonias blancas así como algunos hongos que aparecieron en el alimento E (Queso Maasdam Vaca) (Fig.10).



Fig. 10. Colonias bacterianas y hongos encontrados en el alimento E.

En el medio EMB pueden aparecer tres tipos de colonias: transparentes, negras y colonias con un brillo verde metálico característico (Fig. 11) que pueden ser indicativas de presencia de *Escherichia coli*.

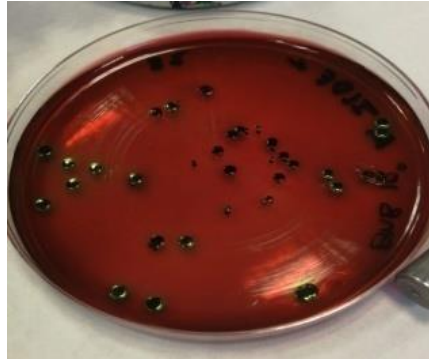


Fig. 11. Ejemplo de crecimiento de *Escherichia coli*.

En el medio VJ se encuentran colonias blancas y algunas amarillas. En algunos alimentos se produce una variación del color del medio (Fig.12) que se debe al cambio del indicador del pH de naranja a rosa producido por la acumulación de productos ácidos, obtenidos en la fermentación del manitol.

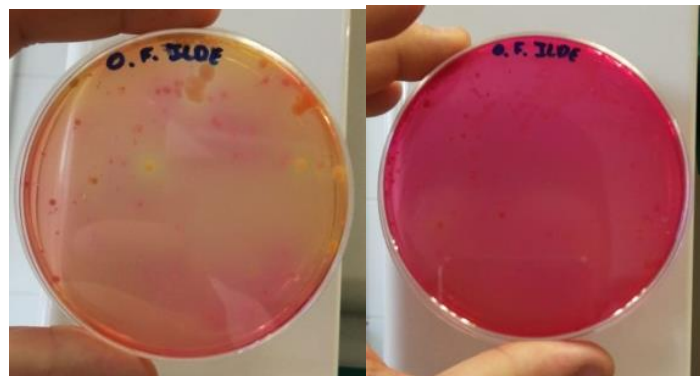


Fig. 12. Ejemplo variación color del medio VJ.

6.3. Tinción de Gram

La siguiente tabla (Tabla 3) nos muestra los resultados obtenidos tras realizar la tinción de Gram a las colonias aisladas en los distintos tipos de medios de cultivo empleados.

	MRSA	KAA	EMB	VJ
Queso fresco Vaca (A)	Cocos +	Cocos +	Bacilos -	Bacilos +
Queso curado mixto(B)	Bacilos +		Bacilos - Cocos +	Cocos + Bacilos +
Queso fresco Cabra (C)	Bacilos+ Cocos +	Cocos+	Cocos + Bacilos -	Bacilos + Cocos +
Queso fresco Oveja (D)	Cocos +	Cocos +	Bacilos - Cocos +	Cocos +
Queso Maasdam Vaca (E)	Cocos + Cocos- Bacilos +		Bacilos -	
Leche cabra ordeñada 1 (F)	Bacilos +		Bacilos -	Bacilos +
Leche cabra ordeñada 2 (G y L)			Cocos + Cocos -	Cocos-Bacilos +
Leche vaca entera fresca (H)				
Leche vaca desnatada fresca (J)				
Leche vaca Semi fresca (K)				
Yogurt Natural 0% (Y)				

Tabla 3. Morfología y Gram de cada alimento en cada medio de cultivo.

En el medio MRSA se observa que todas las colonias son Gram +. También hay crecimiento de Cocos-Bacilos tanto en el Queso fresco de Cabra como en el Queso Maasdam de Vaca. En cuanto a la agrupación, siempre aparecen en racimos excepto en el Queso Curado Mixto que aparece en forma de tétradas. Es la morfología típica de bacterias lácticas que se desarrollan en este medio de cultivo.

En el medio KAA se encuentra crecimiento de cocos Gram + en todos los alimentos excepto en el queso fresco de cabra que también encontramos crecimiento de cocos Gram -. Es el medio en que encontramos menor crecimiento y por lo tanto menor variedad microbiana. Nos permite el aislamiento principalmente de enterococos, bacterias con morfología de cocos Gram +.

En el medio EMB encontramos gran variedad tanto de Gram + como de Gram -, así como Cocos y Bacilos. En varios alimentos se observaron colonias con brillo verde metálico que presentan una morfología de bacilos Gram -. Es un medio selectivo de enterobacterias.

En el medio VJ aparecieron tanto Cocos como Bacilos y al igual que en el medio EMB, todos Gram +.

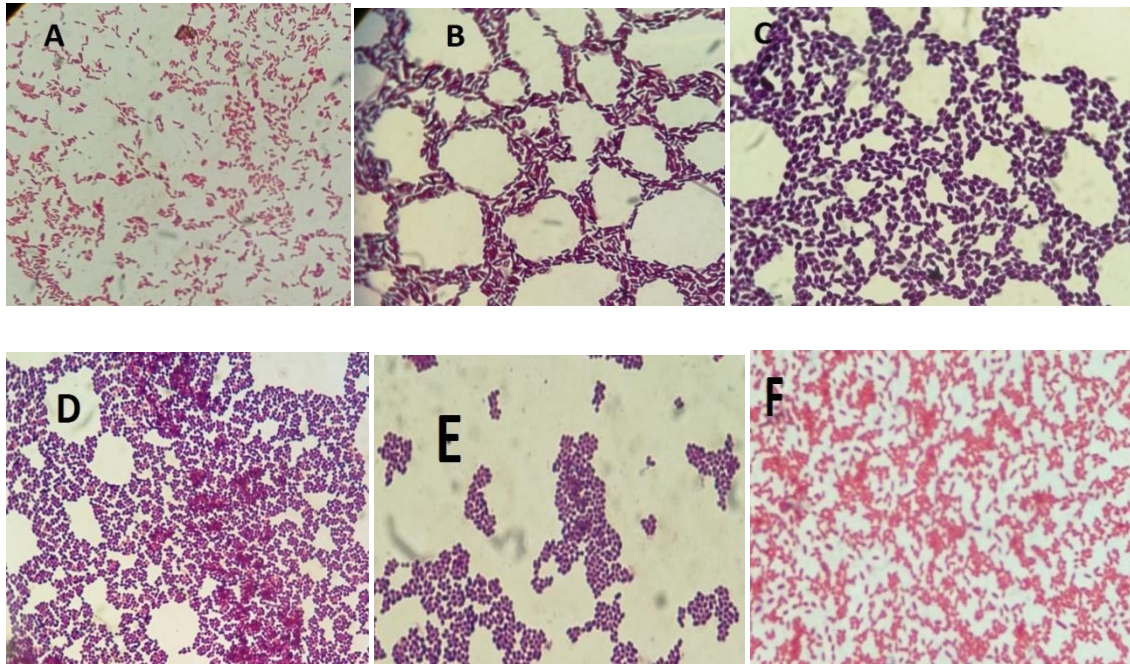


Fig. 13. Ejemplos de la morfología observada en el microscopio. **A.** Bacilos Gram - . **B.** Bacilos Gram +. **C.** Levaduras. **D,E** . Cocos Gram +. **F.** Bacilos Gram -.

6.4 Prueba de la catalasa

Se realizó la prueba de la catalasa para los medios EMB, VJ, KAA. La siguiente tabla (Tabla 4) recoge los diferentes resultados:

	EMB	VJ	KAA
Queso fresco Vaca (A)	-	+	-
Queso curado mixto(B)	-	+	
Queso fresco Cabra (C)	-	+	-
Queso fresco Oveja (D)	-	+	-
Queso Maasdam Vaca (E)	-		
Leche cabra ordeñada 1 (F)	-	+	-
Leche cabra ordeñada 2 (G y L)	+	+	
Leche vaca entera fresca (H)			
Leche vaca desnatada fresca (J)			
Leche vaca Semi fresca (K)			
Yogurt Natural 0% (Y)			

Tabla 4. Resultados obtenidos en la prueba de la catalasa.

El único alimento en el que se obtuvo catalasa positiva en el medio EMB fue la leche de cabra ordeñada 2 mientras que en todos los demás se obtuvo catalasa negativa. Las enterobacterias son todas catalasa +, por lo que podemos deducir que la mayoría de cepas aisladas en este medio corresponden a enterococos.

Sin embargo, en el medio VJ, se obtuvo siempre catalasa positiva en todos los tipos de queso (en el queso Maasdam no hubo crecimiento) y en las muestras de leche de cabra ordeñada 1 y 2, como efectivamente corresponde al género *Staphylococcus*.

Por último, en el medio KAA siempre se obtuvo catalasa negativa, como corresponde al grupo de los enterococos.

7. Discusión

Los numerosos patógenos que pueden ser transmitidos a través del queso elaborado con leche cruda o a través de la misma leche cruda constituye un riesgo

evidente para la salud, sobre todo en niños pequeños o en personas inmunodeprimidas siendo causa de muchos casos de intoxicaciones alimentarias en el actualidad (Johler et al. 2005).

Estudios previos sobre la carga microbiana de los quesos han descrito la presencia de *Staphylococcus aureus* en casi todas las muestras estudiadas así como la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* (Vásquez A.V, 2017). Nuestros resultados muestran también la presencia de *Staphylococcus* en los diferentes tipo de quesos estudiados así como presencia de *Escherichia coli* que aparecieron en algunas muestras de queso. Sin embargo, no se encontró carga microbiana alguna en los distintos tipos de leche fresca ni en el Yogurt. En los dos tipos de leche de cabra recién ordeñada, se encontraron tanto Bacilos como Cocos Gram positivos, compatibles con los géneros anteriores, en función de su crecimiento en los medios selectivos empleados. La pasteurización posterior a que se someten las leches previamente a su distribución al consumidor, no obstante, solventaría este problema.

Hoy en día siguen siendo relativamente frecuentes las enfermedades transmitidas por los alimentos relacionadas con el consumo de derivados lácteos, principalmente el queso. Las infecciones por *S. aureus* se han relacionado con el uso de leche no pasteurizada en su elaboración o con la contaminación debida a una manipulación inadecuada (Ryser, 2001). Cuando los recuentos del género *Staphylococcus* superan las 10^5 UFC/ml, en el producto se puede acumular una enterotoxina que es resistente a la pasteurización y responsable de brotes y alertas sanitariaspor enfermedades de transmisión alimentaria (Ryser, 2001; Delbes et al., 2006; CDC, 2010a). En nuestro estudio, el Queso fresco de cabra (C) es el único que muestra un recuento elevado($>3.00 \times 10^5$), que podría superar al límite de carga microbiana que se establece.

El género *Salmonella* es patógeno responsable de cuadros de gastroenteritis y varios serotipos han sido identificados como responsables de brotes transmitidos por el queso (González, L.J et al. 2010).De igual forma, las cepas de *E.coli*, especialmente aquéllas productoras de toxinas, son también importantes patógenos transmitidos por los alimentos (Gyles, 2007). Si bien en nuestro estudio no podemos afirmar categóricamente qué géneros de enterobacterias se han aislado de las muestras analizadas, ya que se requerirían estudios metabólicos y genéticos más

específicos, sí hemos obtenido crecimiento microbiano en el medio EMB, selectivo para enterobacterias y que permite también el desarrollo de enterococos.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios previos revisados ya que se encuentra una carga microbiana mayor en los distintos tipos de queso fresco (vaca, cabra, oveja) que en el queso curado mixto, y no se detecta crecimiento microbiano en ningún tipo de leche sometida a pasteurización, como también era de esperar tras este tratamiento térmico.

8. Conclusiones

1. El alimento que mayor carga microbiana ha presentado en medio de cultivo TSA, no selectivo, es el queso fresco de oveja seguido del queso fresco de cabra y del queso fresco de vaca. Por el contrario, la leche de cabra ordeñada (1) es la muestra con menor carga microbiana de todos los analizados.
2. Se han obtenido recuentos nulos en todos los medios empleados para los tres tipos de leche envasada, debido a los tratamientos térmicos de pasteurización a que se somete la leche para su venta al consumidor final.
3. Iguales resultados se han observado en el yogur, sin crecimiento microbiano detectable en ninguno de los medios empleados y probablemente debido al mismo motivo.
4. En el medio MRSA, que permite el crecimiento de bacterias lácticas, hay un gran crecimiento microbiano en todos los tipos de queso analizados, así como en una de las muestras de leche de cabra ordeñada, siendo nulo en todas las muestras restantes.
5. En el medio KAA, selectivo para enterococos, es en el que menores recuentos se han obtenido, siendo las muestras de queso fresco las únicas que han mostrado crecimiento microbiano en este medio.
6. En los medios EMB, selectivo para el crecimiento de enterobacterias, al igual que en el medio VJ que permite el crecimiento del género *Staphylococcus*, se observa que las muestras que tienen mayor carga microbiana son los quesos frescos de

cabra y de oveja, siendo en estos medios selectivos el queso fresco de vaca el que presenta menor crecimiento microbiano.

7. La tinción de Gram y la prueba de la catalasa, realizadas a las colonias obtenidas, confirman el crecimiento de los géneros esperados, en función de los medios selectivos empleados, y confirman los resultados de estudios previos realizados con muestras de productos lácteos.

9. Bibliografía

- Aguirre, M., and Collins, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection, *J. Appl. Bacteriol.* 75:95-107.
- Alais, C. 1985. *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. Cuarta edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. pp. 873.
- Arbiza, A.S. 1996. La leche de cabra. Sus propiedades nutritivas y farmacológicas. *Correo del maestro* Núm 3. pp. 1-5.
- Bodnaruk, P.W., Williams, R.G., and Golden D.A. 1998. Survival of *Yersinia enterocolitica* during fermentation and storage of yogurt. *J. Food Sci.* 63:535-537.
- Bonet, S.B., Dalmau, S.J., Gil, C.I., Gil, G.P., Juárez, I.M., Matía, M.P., and Ortega, R.M. Productos lácteos: obtención y procesado. En: Libro blanco de los lácteos. pp.41-53.
- Bonet, S.B., Dalmau, S.J., Gil, C.I., Gil, G.P., Juárez, I.M., Matía, M.P., Ortega, R.M. Productos lácteos: obtención y procesado. En: Libro blanco de los lácteos. pp.17-21.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [Accessed January 6, 2015]; Staphylococcal food poisoning. 2010a.
- Dalglish, D.G. 1999. The Enzymatic Coagulation of Milk. En: P.F. Fox (Ed). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volumen 1. Aspen Publishers, Maryland, EE.UU. pp. 69-100.
- 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. *J Food Prot.*; 69:2161–2167.
- Doly, M.P. and Roman, D.J. 1982. Prevalence and survival *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* pp.1154-1158.
- Dolye, M.P., and Roman, D.J. 1982. Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1154-1158.
- Eck, A. 2000. What is a cheese? En: A.Eck y J.C.Gilis (Eds). *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance*. Lavoisier Publising. pp. 661-662.

- Fox, P.F., Guinne, T.P., Timothy, M.C. y McSweeney, P.L.H. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, Maryland, EE.UU. pp. 392- 422.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G. and de Antoni, G.L. 2000. Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *J. Food Protect.* pp.364-369.
- Gitter, M.R. and Blampied, P.H. 1980. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *Vet. Rec.* 107: 390-393.
- Gobierno de España; Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición (aecosan).
- González, L.J., Martínez, N.F., Rossi, L., Tornese, M., Troncoso, A. 2010. Risk analysis of foodborne diseases: Microbial risk assessment. *Rev Chil Infect* 2010; 27 (6):513-524.
- Gunasekaran, S. y Ak, M.M. 2003. *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press, Nueva York, EE.UU. pp.437
- Gyles, C.L. Shiga. 2007. toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* ; 85(13 Suppl):E45–E62.
- Headrick, M.L., Korangy, S., Bean, N.H., Angulo, F.J., Altekruse, S.J., Potter, M.E. and Klontz, K.C.1998. The epidemiology of raw milk-associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. *J.Amer. Public-Health* 88: 1219-1221.
- Heer, E. G. 2007. Microbiota de la leche. pp. 1-2.
- Hettinga, D.H. and Reinbold, G.W. 1972. The propionic acid bacteria. A review, *J.Milk Food Technol.* 35:295-301,358-372, 436-447.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Leche, fermentación y productos lácteos fermentados o no. En: Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. pp. 155-156.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Leche, fermentación y productos lácteos fermentados o no. En: Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. pp. 166.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Leche, fermentación y productos lácteos fermentados o no. En: Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. pp. 156-157.

- Johler, S., Weeder, S., 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. *Dairy Sci.* 98 (5):2944-8.
- Johnson, M. y Law, B.A. 2011. The fundamentals of cheese technology. En: law B.A. y Tamime A.Y. (Eds). *Technology of cheesemaking*. Segunda edición. Wiley Blackwell, Reino Unido.
- McComas, K.A. and Gilliland, S.E. 2003. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *J.Food Sci.* 68:090-2095.
- McSweeney, P.L.H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology.* 57(2-3):127-144.
- Murinda, S.E., Nguyen, K.T., Ivey, S.J., Gillespie, B.E., Almeida, R.A., Draughon, F.A. and Oliver, S.P. 2002. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: A 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *J.Food Protect.* 65:752-759.
- Pederson, C.S. 1979, *Microbiology of Food Fermentations*, 2nd ed. Westport, C.T: AVI.
- Ramírez, L.C. and Vélez, R. JF. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. pp: 131-148.
- Rosen, G. 1958. *A history of Public Health*. New York: MD Publications. pp.358-360.
- Ryser, E.T. 2001. Public Health Concerns. In: Marth EH, Steele JL, editors. *Applied dairy microbiology*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc; New York, NY. pp. 397–546.
- Scott, R., Robinson, R.K. and Wilbey, R.A. 1998. Cheese varieties. En: Scott, R., Robinson, R.K. y Wilbey, R.A. (Eds). *Cheesemaking Practice*, Tercera edición. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, EE.UU. pp.449.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M. and Levy-Frébault, V.V. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. 40: 254-260.

- Tibana, A., Warnken, M.B., Nunes, M.P., Ricciardi, I.D. and Noletto, A.L.S. 1987. Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.* 50:580-583.
- Vaclavik, V.A., and Christian, E.W. 2003. *Essentials of Food Science*, 2nd ed, New York: Springer.
- Vásquez, A.V., Salhuana, G.J., Jiménez, D.A., Abanto, R.L. 2017. Evaluation of the bacteriological quality of fresh cheeses from Cajamarca. *Ecol. apl.* vol.17.
- Viera, E.R. 1996. *Elementary Food Science*. 4th ed., chap.15. New York: Kluwer/Plenum Publishing, Inc.

Normativa consultada

- Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche. *BOE* núm. 15, de 17 de enero de 2008.
- Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. «*BOE*» núm. 126, de 27 de mayo de 2006, páginas 19999 a 20002 (4 págs.)
- Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. «*DOUE*» núm. 139, de 30 de abril de 2004, páginas 1 a 54 (54 págs.)