

# CALIDAD MICROBIOLÓGICA DIFERENCIAL DE LA LECHE DE OVEJA PROCEDENTE DE TANQUE

Differential microbiological quality of sheep milk from bulk tank

Lorena Jiménez-Sobrino<sup>1</sup>, Ana Garzón-Sigler<sup>2</sup>, María Dolores Pérez-Guzmán Palomares<sup>1</sup>, Antón García-Martínez<sup>2</sup> y Ramón Arias-Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA). Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF). Valdepeñas (Ciudad Real). <sup>2</sup>Departamento de Producción Animal, Universidad de Córdoba. Ctra. Madrid-Cádiz, km. 395, 14071 Córdoba, España. Autor de correspondencia e-mail: lorenaj@jccm.es.

## RESUMEN

La producción ovina lechera adquiere gran importancia en la cuenca mediterránea con un 28% de la producción mundial, que contribuyen a la fijación de la población rural y al mantenimiento de un sector transformador enfocado a los productos tradicionales. Uno de los retos a los que enfrenta el sector es el de mantener la calidad higiénico-sanitaria de la leche, que en la actualidad es evaluada por los sistemas de control de la calidad mediante el recuento de mesófilos totales. Sin embargo, la calidad de la leche de oveja está relacionada con múltiples géneros microbianos, cuya presencia genera diferentes efectos en la leche y productos derivados. El objetivo del presente trabajo ha sido investigar la calidad microbiológica diferencial de la leche de oveja de tanque y la relación entre los diferentes grupos evaluados. Para ello se recogieron 308 muestras de leche de tanque procedentes, de 77 ganaderías, para el estudio microbiológico diferencial de los grupos mayoritarios presentes en la leche (mesófilos totales, termodúricos, psicotrofos, coliformes totales, cocos Gram positivos coagulasa negativos, bacterias ácido lácticas, gérmenes butíricos y estafilococos coagulasa positivos). El mayor porcentaje de muestras de los diferentes microorganismos se encuentran concentradas en recuentos bajos e intermedios. El estudio refleja la necesidad de optimizar el manejo higiénico (limpieza y desinfección de la ganadería, proceso de refrigeración, manejo de la alimentación, principalmente) y sanitario (actuación adecuada frente las mastitis clínicas) para el control de determinados grupos microbianos. Además, la ausencia de relación entre el recuento de gérmenes totales con determinados grupos microbianos importantes desde el punto de vista sanitario (estafilococos coagulasa positivos) o tecnológico (bacterias ácido butíricas) informan de la necesidad de monitorizarlos en los sistemas de control de calidad de la leche de oveja.

**Palabras clave:** Oveja; leche de tanque; microbiología diferencial.

## ABSTRACT

Sheep dairy sector is a valuable activity in Mediterranean Countries that represents 28% of the world milk production, contributes to maintain the rural population and is the support of a processing sector focused on traditional products. One of the challenges that the sector faces is the fulfillment of hygienic-sanitary standards of quality, evaluated within milk quality systems through the standard plate count. Nevertheless, the quality of sheep milk is related to different groups of microorganisms, whose presence have different consequences in milk and milk products. Thus, the aim of the present work has been to investigate the differential microbiological quality of sheep milk from bulk tank and the relationship between the microbial groups. A total of 308 bulk tank milk samples from 77 sheep farms were tested for the microbiological study with the main microbial groups found in milk (standard plate count, thermotrophic, and psychrotrophic flora, total coliforms, catalase negative Gram positive cocci, lactic acid bacteria, butyric acid bacteria and coagulase positive staphylococcus). The results of the different microbial groups show that, in general, milk samples collected in this study show an adequate hygienic quality and the counts are distributed around low and intermediate intervals. The study demonstrates the necessity to optimize hygiene (above all, on-farm cleaning and disinfection, refrigeration process and feeding management) and sanitary practices (mastitis protocol), for the control of some microbial groups. In addition, the lack of relationship between standard plate count and some microbial groups with interest in sanitary (coagulase positive staphylococcus) or technological procedures (butyric acid bacteria) informed about the necessity to monitor them in the control systems of sheep milk quality.

**Key words:** Sheep; bulk tank milk; differential microbiology.

## INTRODUCCIÓN

La producción de leche de oveja (*Ovis aries*) en los países europeos de la cuenca mediterránea representa el 28% de la producción mundial, y constituye una actividad importante, tanto por sustentar un importante sector transformador como por el mantenimiento de la población rural [11]. Además, el sector ovino lechero se encuentra ligado a la obtención de productos tradicionales de calidad diferenciada, muy apreciados por el consumidor. España ocupa uno de los primeros puestos en la producción de leche de oveja de la Unión Europea, siendo la región de Castilla-La Mancha una de las más productoras, donde la industria quesera posee tradicionalmente una gran importancia [29].

En el escenario actual de la producción de alimentos han cobrado gran importancia todas aquellas actuaciones encaminadas a la protección de la salud pública y la salvaguarda de la seguridad alimentaria. Así, desde el punto de vista microbiológico, la legislación europea ha establecido límites para los principales grupos de gérmenes de interés alimentario [7]. Sin embargo, estos criterios sólo se enfocan en productos lácteos, no estableciéndose límites para la leche de oveja procedente de tanque. No obstante, algunos países europeos ya han establecido normas nacionales al respecto, por la importancia que los recuentos microbianos tienen en la calidad de la leche y en la producción de sus productos derivados [8].

La calidad higiénica de la leche de tanque de las ganaderías se determina de forma rutinaria en los sistemas de control de calidad de la leche, mediante el recuento de gérmenes mesófilos totales [15]. Sin embargo, este parámetro es considerado poco específico por distintos autores, habiéndose realizado varios estudios de recuentos microbiológicos diferenciales en leche de tanque en vacuno (*Bos taurus*) [9, 25, 34, 37] y en ovino lechero [2, 4, 5]. En estos trabajos han sido descritos distintos grupos microbianos en la leche de tanque, importantes desde el punto de vista higiénico (psicotrofos, termodúricos, coliformes, entre otros), sanitario (estafilococos, estreptococos, entre otros) o tecnológico (bacterias lácticas, bacterias ácido butíricas, entre otros), cuyo estudio es interesante para la mejora de la producción quesera.

En este contexto, el objetivo del trabajo consistió en la evaluación de la calidad microbiológica diferencial de la leche de oveja procedente de tanque y la relación entre los distintos grupos microbianos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del estudio

El estudio se desarrolló en España, en la Comunidad de Castilla-La Mancha (38°-41°N; 1°-5° O). Su clima es Mediterráneo Continental caracterizado por inviernos fríos y veranos calurosos

y secos. Las precipitaciones tienen lugar sobre todo en primavera y otoño sobrepasando los 600 mm anuales en regiones montañosas, oscilando en el resto de las zonas entre 300-350 mm anuales [27].

### Determinación de la muestra

Durante el año 2013, y con periodicidad estacional, se recogió un total de 308 muestras de leche de tanque en 77 ganaderías de raza ovina Manchega. Las explotaciones fueron seleccionadas de modo estratificado según su dimensión y zona geográfica, alcanzando la muestra el 10% de la población [28].

### Análisis microbiológico de la leche

Las muestras de leche se recogieron, previa homogenización del contenido del tanque de refrigeración, en contenedores estériles de 50 mL, siendo transportadas en condiciones de refrigeración (<5°C) hasta el laboratorio de Lactología del Centro Regional de Selección y Reproducción Animal (CERSYRA-IRIAF) de Valdepeñas (España), para proceder a su análisis microbiológico diferencial. A partir de cada muestra de leche se realizaron diluciones seriadas para inocular 0,1 mL en diferentes medios de cultivo. Así, para el recuento total de bacterias mesófilas (RMT), termodúricas (TERMO) y psicotrofos (PSICRO) se utilizó el medio PlateCount Agar (PCA) (Panreac, España). Los microorganismos mesófilos totales se incubaron (Raypa 150L Modelo B-292 I-150, Raypa, España) en condiciones de aerobiosis a 30°C durante 72 horas (h) [20]. Los termodúricos se incubaron en las mismas condiciones que los mesófilos, habiendo pasteurizado previamente la leche a 62,8°C durante 30 minutos (min). Los psicotrofos fueron incubados a 6,5°C durante 10 días (d) [19]. La determinación de coliformes (COLIT) se realizó con el medio CromoIDTMColi (bioMérieux, España), incubado a 37°C durante 24 h [21].

Los cocos Gram positivos catalasa negativos (CGPCN) se determinaron en el medio Edwards modificado, con suplemento selectivo de colistina y ácido oxolínico (Oxoid, Reino Unido), incubando las placas a 35°C durante 48 h [5]. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se sembraron en medio MRS (Panreac, España) acidificado a pH 5,7, incubándose a 30°C durante 72 h [18]. El recuento de esporas del género *Clostridium* fermentadoras de láctato (BAB) se ha realizado con la técnica del número más probable (NMP), en medio Bryant and BurkeyBroth (BBB, Merck, Alemania), siguiendo la metodología indicada por Arias y col. [2]. Para el recuento de estafilococos coagulasa positivos (SCP) se utilizó el medio Agar Baird Parker RPF (bioMérieux, España), incubando a 37°C durante 24 h [30]. Los resultados de los recuentos fueron obtenidos como el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL) o esporas por mililitro (en el caso de los BAB).

### Análisis estadístico

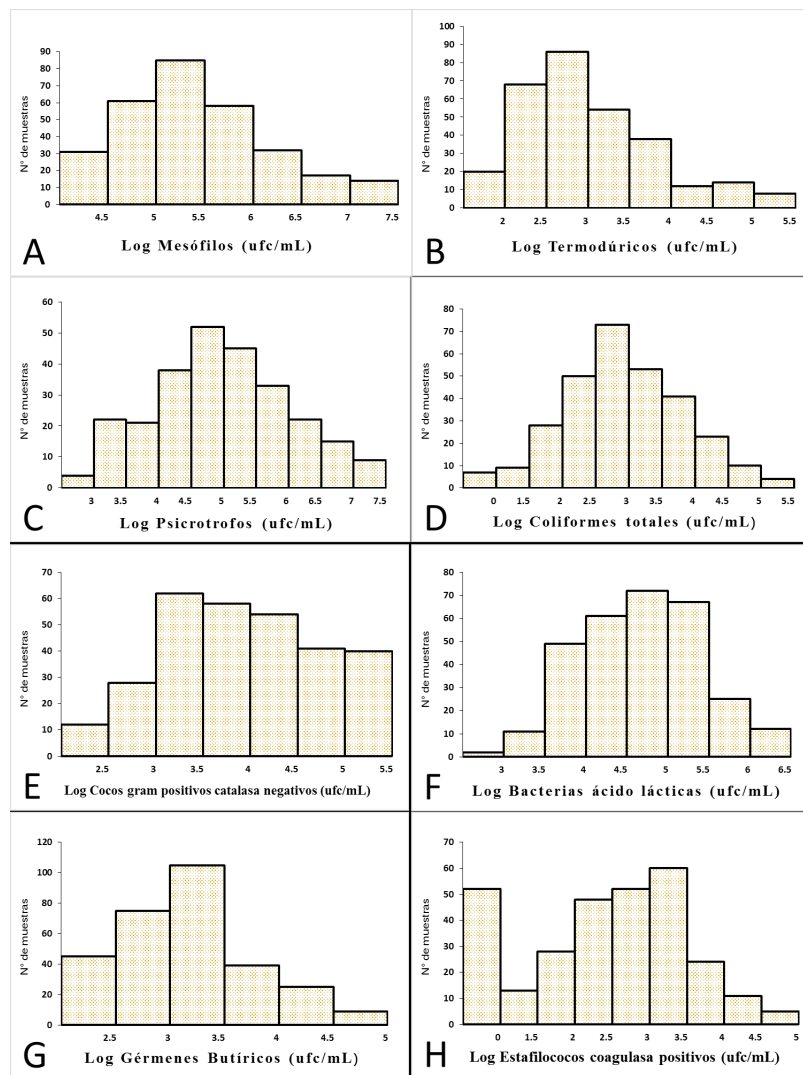
Los datos obtenidos de los recuentos microbiológicos se han transformado en logaritmos decimales. Todos los datos han sido analizados utilizando el paquete estadístico SAS, 9.3 [35].

Los estadísticos generales y las frecuencias de distribución han sido calculados para todos los recuentos. El análisis de correlaciones se ha utilizado para el cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman entre todos los recuentos obtenidos.

Para determinar la asociación entre diferentes niveles de microorganismos se ha realizado un análisis de correspondencias entre categorías de los recuentos anteriormente considerados. Para cada grupo se han establecido dos categorías según el valor del correspondiente  $P_{50}$  (I: inferior al  $P_{50}$ ; S: superior al  $P_{50}$ ), excepto para el RMT donde se ha utilizado el rango de 500.000 ufc/mL establecido en el Reglamento (CE) 853/2004 [6].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las ganaderías de este estudio presentaron un recuento de mesófilos totales medio de  $\log RMT = 5,36 \pm 0,63$ . Este valor está en la línea de otros trabajos publicados en ovino lechero [4, 16]. Este indicador es el que se utiliza de forma rutinaria en los sistemas de control de la calidad, siendo generalmente relacionado con la higiene del proceso de obtención de la leche en las ganaderías. En la distribución de RMT en las explotaciones estudiadas (FIG. 1A), se observó que aproximadamente dos tercios de las muestras (59,39%) presentaron valores promedio por debajo de las 500.000 ufc/mL (5,70 log ufc/mL), rango establecido por la legislación de la Unión Europea [6] para destinar la leche a la elaboración de productos lácteos con leche cruda. De éstas, el 30,87% mantuvieron un valor promedio por debajo de las 100.000 ufc/mL (5 log ufc/mL), indicando una excelente calidad higiénica de la leche [26].



**FIGURA 1. FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN DE RECuento DE GÉRMEENES TOTALES (A), TERMODÚRICOS (B), PSICROTROFOS (C), COLIFORMES TOTALES (D), COCOS GRAM POSITIVOS CATALASA NEGATIVOS (E), BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (F), GÉRMEENES BUTÍRICOS (G), ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS (H).**

El recuento diferencial de microorganismos ofrece una información más detallada sobre el estado higiénico-sanitario de las ganaderías (TABLA I). El recuento medio de termodúricos fue de 3,25 log ufc/mL, relacionándose este indicador con el estado higiénico de la sala y el equipo de ordeño (instalación, maquinaria, limpieza, entre otros) [24]. De Garnica y col. [4] señalaron un valor medio inferior al de este estudio (2,41 log ufc/mL, en un rango entre 1,00 y 4,02 log ufc/mL). Estos gérmenes (*Bacillus*, *Clostridium*, entre otros) son de interés en la producción de queso, tanto elaborado con leche cruda como tratada térmicamente; así, en el presente caso evidenció que el 60,63% de los RMT fueron

microorganismos termodúricos que resisten a la pasteurización. En la FIG. 1B, se observó cómo la mayor concentración de muestras (82,55%) tienen recuentos de termodúricos entre 2,5 y 4 log ufc/mL (entre 316 y 10.000 ufc/mL). En ovino, Gonzalo y col. [17] fijan el rango de <400 ufc/mL para bajos recuentos de estos microorganismos, lo que en el presente caso corresponde al 28,86 % de las muestras. En vacuno se considera también como bajos recuentos de termodúricos aquellos <300 ufc/mL, y explica que estos microorganismos se relacionan con deficiencias higiénicas continuadas en el tiempo en las ganaderías [38].

TABLA I  
ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA GENERAL Y DIFERENCIAL DE LAS MUESTRAS DE LECHE DE TANQUE DE OVEJA MANCHEGA (N=308)

Microflora	Promedio <sup>1</sup>	DS <sup>2</sup>	CV <sup>3</sup>	P <sub>50</sub> <sup>4</sup>	IC 95% <sup>5</sup>
<b>Mesófilos</b>	5,36	0,63	11,78	5,35	5,29-5,43
<b>Termodúricos</b>	3,25	0,86	26,60	3,14	3,15-3,35
<b>Psicrotrofos</b>	5,25	1,08	20,60	5,22	5,11-5,38
<b>COLIT<sup>6</sup></b>	3,15	0,97	30,68	3,15	3,04-3,26
<b>CGPCN<sup>7</sup></b>	4,16	0,81	19,49	4,18	4,07-4,25
<b>BAL<sup>8</sup></b>	4,90	0,72	14,73	4,94	4,82-4,98
<b>BAB<sup>9</sup></b>	3,41	0,62	18,23	3,36	3,34-3,48
<b>SCP<sup>10</sup></b>	2,50	1,37	55,01	2,78	2,34-2,65

<sup>1</sup>Logaritmo de ufc/mL (esporas/mL en el caso de BAB); <sup>2</sup>DS: Desviación estándar; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variación; <sup>4</sup>P<sub>50</sub>: Percentil 50; IC<sup>5</sup>: Intervalo de confianza al 95%; <sup>6</sup>COLIT: coliformes totales; <sup>7</sup>CGPCN: cocos gram positivos catalasa negativos; <sup>8</sup>BAL: bacterias ácido lácticas; <sup>9</sup>BAB: gérmenes butíricos; <sup>10</sup>SCP: estafilococos coagulasa negativos.

Las bacterias psicrotrofas son aquellas que siguen manteniendo su desarrollo en condiciones de refrigeración, y son indicativas de deficientes condiciones higiénicas de las ganaderías; por ello, su interés radica especialmente en leche almacenada durante un periodo prolongado de tiempo. Representan un amplio número de géneros, siendo de interés, tanto desde el punto de vista tecnológico como de salud pública, por ejemplo, los gérmenes del género *Pseudomonas*, y aquellos cuya capacidad enzimática (lipolítica o proteolítica) puede provocar problemas en la elaboración de productos lácteos [9, 38]. En este estudio el valor medio fue de 5,25 log ufc/mL, valor inferior a otros estudios realizados en ovino lechero [4], lo que sería indicativo de buenas condiciones higiénicas en estas ganaderías. En la distribución de recuentos de psicrotrofos (FIG. 1C) se obtuvo que, la mayor concentración (65% de las muestras) se encontraba entre 4,5-6,0 log ufc/mL, y que aproximadamente dos tercios de las muestras (61,81%) presentaban unos valores inferiores a 200.000 ufc/mL (5,3 log ufc/mL), límite marcado por Gonzalo y col. [17] para indicar una calidad adecuada con respecto a estos microorganismos.

El recuento de coliformes totales (CT), también es considerado un buen estimador del nivel higiénico de la ganadería (camas, suelo, aguas contaminadas, y sistemas deficientes de limpieza y desinfección) [12]. En el presente estudio se obtuvieron valores inferiores (3,15 log ufc/mL) a los de otros autores [36]. Los recuentos de coliformes totales (CT) están siendo utilizados en

los sistemas de control de calidad de la leche de oveja en algunas regiones de la Unión Europea (Roquefort o Pirineos Atlánticos) [32], estableciendo un sistema de puntuación/calificación de la leche en función de distintos rangos de coliformes. El rango <500 ufc/mL (2,69 log ufc/mL) califica la leche de mayor calidad, lo que en el presente estudio correspondió al 46,25% de las muestras de leche, y el rango >2.500 ufc/mL (3,39 log ufc/mL) el que delimita la leche de inferior calidad, lo que representa el 29,73% de las muestras (FIG. 1D). Estos resultados manifiestan la necesidad de establecer sistemas preventivos más eficientes para minimizar este tipo de contaminación y protocolos efectivos de limpieza y desinfección en instalaciones y equipos para su control.

Los recuentos de bacterias incluidas en el grupo de los cocos Gram positivos catalasa negativos (CGPCN) fueron de 4,16 log ufc/mL, similares a los indicados por Alexopoulos y col. [1] (4,95 log ufc/mL), y superiores a los de De Garnica y col. [5] (2,95 log ufc/mL). En la FIG. 1E se indica la distribución de frecuencias para los recuentos de los CGPCN. La mayor concentración de valores (86,45%) se encontró entre 3,5 y 5,5 log ufc/mL (3,16 a 316.227 ufc/mL). La importancia de este amplio grupo de microorganismos radica en la información que aporta, tanto desde el punto de vista higiénico (enterococos, entre otros) como de la sanidad mamaria del rebaño (estreptococos, entre otros) [5, 23]. No obstante, hay que tener en cuenta que algunos de estos microorganismos resultan beneficiosos en el proceso de coagulación y desarrollo



de aromas característicos en la producción de queso [13]. Por ello, este grupo de microorganismos debería ser cuantificado en leche de oveja en tanque, teniendo en cuenta la importancia relativa de sus diversas tipologías por su interés higiénico, sanitario y tecnológico.

Los recuentos de bacterias lácticas (BAL) obtenidos en leche de oveja en tanque en este estudio fueron de 4,90 log ufc/mL, superiores a los de otros estudios en ovino lechero [3, 31]. La distribución de frecuencias para el recuento de las BAL se recoge en la (FIG. 1F). El mayor porcentaje de muestras (83,28%) presentó unos recuentos entre 4 y 5,5 log ufc/mL. Este grupo de microorganismos es muy importante desde el punto de vista de la tecnología quesera, siendo esenciales en los procesos de fermentación del queso, y en el desarrollo del aroma y sabor característico de éstos [33]. No obstante, convendría discriminar las BAL que poseen acciones beneficiosas, de aquellas que podrían generar efectos negativos, como por ejemplo la producción de aminas biógenas [39].

Uno de los principales problemas tecnológicos de la industria quesera en la actualidad es la aparición de quesos con “hinchazón tardía”. Diversos estudios han explicado que este problema está relacionado con esporas ácido butíricas del género *Clostridium* (BAB) [2]. Este estudio también identifica los factores de riesgo de la aparición de BAB en leche de oveja en tanque: el tipo de alimentación de los animales en ordeño, principalmente ensilados y subproductos, y una deficiente higiene de la sala de ordeño. En el presente estudio, el recuento BAB fue de 3,41 log ufc/mL, similar a los resultados del estudio citado anteriormente. En la (FIG. 1G) se muestra la distribución de BAB; el 59,73% de las muestras presentaron recuentos >1.000 esporas/mL (>3 log ufc/mL), límite establecido por estudios como el de Gaggiotti y col. [14] o en los sistemas de control de las regiones de Roquefort y Pirineos Atlánticos en Francia [32] para discriminar una leche de mala calidad. Esta problemática hace necesaria la revisión del manejo de la alimentación del ovino lechero y los protocolos de manejo y limpieza y desinfección de las instalaciones de ordeño.

Por otra parte, adquiere gran importancia zootécnica la evaluación de la sanidad mamaria del rebaño a partir de la información analítica de la leche de tanque, siendo en la actualidad efectuada de forma rutinaria con la determinación

del recuento de células somáticas [32]. Esta información podría complementarse con el recuento de microorganismos que pudieran estar implicados en las infecciones intramamarias. Es conocido el amplio número de gérmenes que pueden causar este síndrome, siendo los estafilococos coagulasa positivos (SCP) uno de los generalmente implicados en las mastitis clínicas. Asimismo, tienen importancia desde el punto de vista de la salud pública porque son productores de toxinas termoestables. Los recuentos medios de SCP en leche de tanque de este estudio fueron de 2,50 log ufc/mL, valores similares a los citados por otros estudios en ovino lechero [4]. La distribución para los recuentos de SCP (FIG. 1H), mostró que la mayor concentración de muestras (54,61%) se localizó en el rango 2,5-3,5 log ufc/mL (316 y 3.160 ufc/mL). Destacar que en el 17,75% de los casos no se evidenciaron recuentos de SCP. El riesgo derivado de la presencia de niveles de toxinas termoestables con repercusiones sanitarias ha sido establecido por diversos estudios a partir de 10.000 ufc/mL (4 log ufc/mL) ó 100.000 ufc/mL (5 log ufc/mL) [10,22], siendo sólo del 5,45% el número de muestras del presente estudio por encima de este rango. Estos resultados indicarían una correcta calidad de la leche para SCP, aunque sería conveniente valorar la presencia de toxinas por sus implicaciones en salud pública.

Un aspecto interesante a tener en cuenta es la relación que los distintos grupos microbianos tienen en la leche de tanque de oveja. En la (TABLA II) se muestran las correlaciones entre los recuentos microbiológicos estudiados. Destacó la correlación positiva y significativa existente entre el recuento de mesófilos y el resto de recuentos, excepto en el caso de estafilococos coagulasa positivos ( $P < 0,05$ ), con una alta correlación entre el recuento de mesófilos y psicotrofos ( $r=0,64$ ;  $P < 0,001$ ). Los gérmenes termodúricos registraron correlaciones intermedias con psicotrofos, BAL y los cocos Gram positivos catalasa negativos, y correlaciones bajas con los gérmenes butíricos ( $r=0,16$ ;  $P < 0,001$ ). Además cabe señalar correlaciones bajas o ausentes entre estafilococos coagulasa positivos y el resto de recuentos. Las altas correlaciones significativas ( $P < 0,001$ ) de las BAL con los coliformes totales (CT) ( $r=0,51$ ) y los cocos Gram positivos catalasa negativos ( $r=0,63$ ) indicaron la estrecha relación entre los niveles de microorganismos ambientales en la leche de tanque.

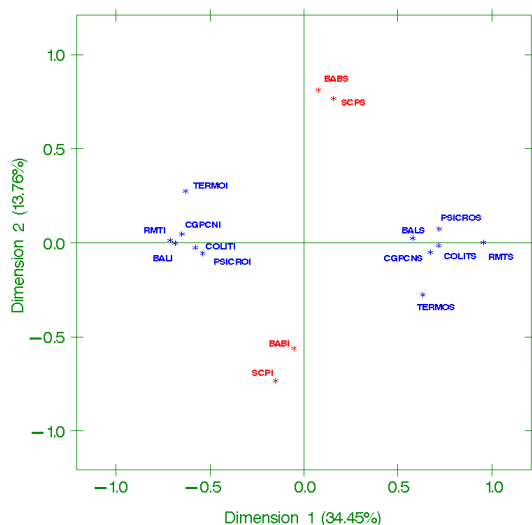
TABLA II

**COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LA COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA GENERAL Y DIFERENCIAL**

Parámetros	Mesófilos	Termodúricos	Psicotrofos	COLIT <sup>1</sup>	CGPCN <sup>2</sup>	BAL <sup>3</sup>	BAB <sup>4</sup>	SCP <sup>5</sup>
Mesófilos	1	0,45***	0,64***	0,46***	0,40***	0,38***	0,19***	0,08 <sup>ns</sup>
Termodúricos		1	0,41***	0,31***	0,39***	0,40***	0,16**	-0,05 <sup>ns</sup>
Psicotrofos			1	0,39***	0,32***	0,35***	0,06 <sup>ns</sup>	0,13*
COLIT <sup>1</sup>				1	0,40***	0,51***	0,11 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
CGPCN <sup>2</sup>					1	0,63***	0,06 <sup>ns</sup>	0,13*
BAL <sup>3</sup>						1	0,12*	0,12*
BAB <sup>4</sup>							1	0,02 <sup>ns</sup>
SCP <sup>5</sup>								1

<sup>1</sup>COLIT: coliformes totales; <sup>2</sup>CGPCN: cocos Gram positivos catalasa negativos; <sup>3</sup>BAL: bacterias ácido lácticas; <sup>4</sup>BAB: gérmenes butíricos; <sup>5</sup>SCP: estafilococos coagulasa negativos; \*\*\*P < 0,001; \*\* P < 0,0; \* P < 0,05; ns P > 0,05.

Con el fin de facilitar la comprensión de la relación entre estos grupos de gérmes se realizó un análisis de correspondencias que se muestra en la FIG. II. La Dimensión I, que explicó el 34,45% de la inercia, claramente demostró la asociación entre recuentos inferiores (I) y superiores (S) de mesófilos, termodúricos, psicotrofos, coliformes totales (CT), cocos Gram positivos catalasa negativos y BAL. Esta clara asociación indicaría la relación del nivel de recuentos de los grupos de gérmes menos específicos en leche de tanque (mesófilos, termodúricos y psicotrofos), entre ellos, y con los grupos de gérmes ambientales (coliformes totales (CT), cocos Gram positivos catalasa negativos y BAL). Por su parte, la dimensión II, que explicó el 13,76% de la inercia, permitió agrupar gérmes más específicos (gérmes butíricos y estafilococos coagulasa positivos). Estos resultados han permitido realizar una adecuada interpretación de los recuentos de gérmes totales mesófilos que son aquellos que, como se ha comentado, se realizan de forma rutinaria en los sistemas de control de la calidad de la leche, al distinguirse claramente su estrecha relación con los microorganismos ambientales, y su escasa especificidad para determinar los riesgos sanitarios (estafilococos coagulasa positivos) o tecnológicos como la "hinchazón tardía" (bacterias ácido butíricas).



**FIGURA 2. ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIAS ENTRE NIVELES INFERIORES (RMTI=MESÓFILOS INFERIOR, TERMOI= TERMODÚRICOS INFERIOR, PSICROI= PSICROTROFOS INFERIOR, COLITI= COLIFORMES TOTALES INFERIOR, CGPCNI= COCOS GRAM POSITIVOS CATALASA NEGATIVOS INFERIOR, BALI= BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS INFERIOR, BABI= GÉRMENES BUTÍRICOS INFERIOR Y SCPI= ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS INFERIOR) Y NIVELES SUPERIORES (RMTS= MESÓFILOS SUPERIOR, TERMOS= TERMODÚRICOS SUPERIOR, PSICROS= PSICROTROFOS SUPERIOR , COLITS= COLIFORMES TOTALES SUPERIOR, CGPCNS= COCOS GRAM POSITIVOS CATALASA NEGATIVOS SUPERIOR, BALS= BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SUPERIOR, BABS= GÉRMENES BUTÍRICOS SUPERIOR Y SCPS= ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVOS SUPERIOR.**

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se comprueba la utilidad de la microbiología diferencial como indicador de calidad de la leche de oveja en tanque, que complementa la información del recuento de gérmes totales. La escasa relación del recuento de gérmes totales de la leche de oveja en tanque con los grupos microbianos indicadores del estado sanitario (estafilococos coagulasa positivos) o tecnológico (bacterias ácido butíricas) informan de la necesidad de su evaluación en los sistemas de control de calidad de la leche de oveja. Se considera necesario seguir profundizando en el estudio de la relación de la microbiología diferencial y las características productivas e higiénicas de las ganaderías, con la finalidad de mejorar la calidad de la leche y sus productos derivados.

## AGRADECIMIENTO

Agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, por la financiación de este estudio con el Proyecto de Investigación INIA RTA2011-000057-C02-01, y al sector del ovino lechero de Castilla-La Mancha por su apoyo y colaboración.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALEXOPOULOS, A.; TZATZIMAKIS, G.; BEZIRTZOGLU, E.; PLESSAS, S.; STRAVROPOULOU, E.; SINAPIS, E.; ABAS, Z. Microbiological quality and related factors of sheep milk produced in farms of NE Greece. **Anaerobe** 17: 276-279. 2011.
- [2] ARIAS, C.; OLLETE, B.; SESEÑA, S.; JIMÉNEZ, L.; ARIAS, R. Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. Spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of Clostridium population. **Small Rumin. Res.** 111: 120-128. 2013.
- [3] CENTI, V.; MATTEUCCI, F.; LEPIDI, A.; DEL GALLO, M.; ERCOLE, C. Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino ABruzzese cheese. **Heliyon**. 3: e00258. 2017.
- [4] DE GARNICA, M.L.; SANTOS, J.A.; GONZALO, C. *Short communication*: Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. **J. Dairy Sci.** 94: 1922-1927. 2011.
- [5] DE GARNICA, M.L.; LINAGE, B.; CARRIEDO, J.A.; DE LA FUENTE, J.A.; GARCÍA-JIMENO, M.C.; SANTOS, J.A.; GONZALO, C. Relationship among specific bacterial counts and total bacterial and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. **J. Dairy Sci.** 96: 1021-1029. 2013.

- [6] DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de Abril de 2004, modificado por el Reglamento (CE) N° 1662/2006, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. 2004. En Línea: [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?qid=1507566784479&uri=CELEX:32004R0853\\_09/10/2017](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?qid=1507566784479&uri=CELEX:32004R0853_09/10/2017).
- [7] DIARIO OFICIAL DE LA UNION EUROPEA. Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 2005. En Línea: [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?qid=1507566724099&uri=CELEX:32005R2073\\_09/10/2017](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?qid=1507566724099&uri=CELEX:32005R2073_09/10/2017).
- [8] DIARIO OFICIAL DEL DERECHO FRANCÉS. Decreto N° 2012-1250 del 9 de noviembre de 2012 relativo a las modalidades del pago de la leche de vaca, oveja y cabra en función de su composición y calidad. 2012. En Línea: [https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000026601681&categorieLien=id\\_09/10/2017](https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000026601681&categorieLien=id_09/10/2017).
- [9] ELMOSLEMANY, A.M.; KEEFE, G.P.; DOHOO, I.R.; DINGWELL, R.T. Microbial quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. **J. Dairy Sci.** 92: 4239-4248. 2009.
- [10] ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **J. Appl. Microbiol.** 96: 1090-1096. 2004.
- [11] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAOSTAT), 2017. Corporate Statistical Database. En Línea: <http://faostat.fao.org/beta/en/#home>. 18/03/2017.
- [12] FOSCHINO, R.; INVERNIZZI, A.; BARUCCO, R.; STRADIOTTO, K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo región of Italy during a lactation year. **J. Dairy Res.** 69: 213-225.2002.
- [13] FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods – A conundrum for food safety. **Int. J. Food Microbiol.** 88: 105-122. 2003.
- [14] GAGGIOTTI, M.; ROMERO, L.A.; CALVHINO, M.V. Presencia de clostridios gasógenos en la leche. Calidad de leche y productos. **IdiaXXI**, 9: 143-149. 2007.
- [15] GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Mammary pathogens and their relationship with somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. **J. Dairy Sci.** 85: 1460-1467. 2002.
- [16] GONZALO, C.; CARRIEDO, J.A.; BENEITEZ, E.; JUÁREZ, M.T.; DE LA FUENTE, L.F.; SAN PRIMITIVO, F. *Short Communication: Bulk Tank Total Bacterial Count in Dairy Sheep: Factors of Variation and Relationship with Somatic Cell Count.* **J. Dairy Sci.** 89: 549-552. 2006.
- [17] GONZALO, C. Programas de Calidad, Seguridad y Certificación de la Leche del Consorcio de Promoción del Ovino. 131 pp. 2013.
- [18] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C. Pp 1-14. 1998.
- [19] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 6730/IDF 101:2005 (IDF 101:2005). Milk-Enumeration of colony-forming units of psychotropic micro-organism. Pp 1-8.2005.
- [20] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 4833-1:2014 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. Pp 1-16. 2014.
- [21] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 16140-1:2016. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 1: Vocabulary. Pp 1-18. 2016.
- [22] JAY, J. M. Gastroenteritis estafilocócica. En: JAY, J. M. (Ed.) **Microbiología moderna de los alimentos**. 4ta. Ed. Zaragoza: Editorial Acribia S. A, Pp. 537-563.2001.
- [23] JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; WOLFGANG, D.R.; GRISWOLD, D.R.; HUTCHINSON, L.J. Herd level information and bulk tank milk analysis: Tools for improving milk quality and her udder health. **Bovine Pract.** 35: 23-35.2001.
- [24] JAYARAO, B.M.; WOLFGANG, D.R. Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *The Veterinary Clinics of North American.* **Food Anim. Pract.** 19: 75-92.2003.
- [25] JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. **J. Dairy Sci.** 87: 3561-3573. 2004.
- [26] JIMÉNEZ, L.; OLIETE, B; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; ARIAS, R. Study of the differential microbiological quality of sheep milk relative to the standard plate counts. **Options Méditerranéennes.** 108: 175-181. 2014.
- [27] JIMENEZ, L.; OLIETE, B; GARZÓN, A.; GARCÍA, A.; PALOP, LL.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.; ROMERO, J.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; ARIAS, R. Calidad físico-química

- y colorimétrica de la leche de oveja Manchega. **Book of Proceedings III International Congress of Science, Technology, Innovation and Entrepreneurship**. Bolívar. 11/10-15. Ecuador: Pp 235-242. 2015.
- [28] JIMENEZ, L.; POVEDA, J.M.; GARZÓN, A.; MARTÍNEZ, A.L.; NÚÑEZ, N.; ROMERO, J.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; ARIAS, R. Composition and colour indices of sheep's bulk-tank milk are influenced by production practices. *Ital. J. Anim. Sci.* October 2017: 1-12. En Línea: <http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2017.05/10/2017>.
- [29] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE (MAPAMA), 2017. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. En línea: <http://www.mapama.gob.es>. 18/03/2017.
- [30] NOGUEIRA, G.; MENDONÇA, P.; KEIZO, A.; NERO, L.A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. In raw Milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and Thepetrifilm TM Staph Express count system. **Food Microbiol.** 27: 447-452. 2010.
- [31] PÉREZ-ELORTONDO, F.J.; ALBISU, M.; BARCINA, Y. Brining time effect on physicochemical and microbiological parameters in Idiazábal cheese. **Int. J. Food. Microbiol.** 49: 139-149.1999.
- [32] PIRISI, A.; LAURET, A.; DUBEUF, J.P. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. **Small Rum. Res.** 68: 167-178. 2007.
- [33] POVEDA, J.M.; CABEZAS, L.; MCSWEENEY, P.L.H. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. **Food Chem.** 84: 213-218. 2004.
- [34] QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T.P.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COTTER, P.D. Molecular Approaches to Analysing the Microbial Composition of Raw Milk and Raw Milk Cheese. **Int. J. Food Microbiol.** 150: 81-94. 2011.
- [35] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS) Versión 9.3. USA. 2011.
- [36] SEVI, A.; ALBENZIO, L.; MUSCIO, M., ANNICCHIARICO, G. Effect of parity of milk yield, composition, somatic cell count, renneting parameters and bacteria counts of Comisana ewes. **Small Rum. Res.** 37: 99-107. 2000.
- [37] VACHEYROU, M.; NORMAND, A.C.; GUYOT, P.; CASSAGNE, C.; PIARROUX, R., BOUTON, Y. Cultivable Microbial Communities in Raw Cow Milk and Potential Transfers from Stables of Sixteen French Farms. **Int. J. Food Microbiol.** 146:253-262. 2011.
- [38] WALLACE, R.L. Bacteria counts in raw milk DD 2008. Illini Dairy Net Papers. En línea: <http://livestocktrail.illinois.edu/uploads/dairynet/papers/Bacteria%20Counts%20in%20Raw%20Milk%20DD%202008.pdf>. 18/03/2017.
- [39] ZULJAN, F.A.; MORTERA, P.; ALARCÓN, S.H.; BLANCATO, V.S.; ESPARIZ, M.; MAGNI, C. Review: Lactid acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. **Int. Dairy J.** 62: 53-62. 2016.