



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos lácteos

Alumno: José Alberto Vico Sevilla

Julio 2020



Facultad de
Ciencias Experimentales

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de productos lácteos

Alumno: José Alberto Vico Sevilla

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Vico Sevilla', is centered below the student's name.

Julio 2020

1. Resumen	4
2. Abstract	4
3. Introducción	5
3.1 Leche	5
3.1.1 <i>Leche de vaca</i>	5
3.1.2 <i>Leche de cabra</i>	6
3.2 Queso	6
3.2.1 <i>Tipos de queso y valor nutricional</i>	6
3.3 Yogurt	8
3.4 Posibles vías de contaminación de los productos lácteos	9
3.5 Microorganismos patógenos frecuentes en los productos lácteos	10
3.6 Importancia de la seguridad alimentaria	12
3.6.1 <i>Controles reglamentarios en el lugar de explotación</i>	12
3.6.2 <i>Controles reglamentarios en el centro lácteo</i>	13
3.7 Tipos de antibióticos empleados y resistencias	13
3.7.1 <i>Ampicilina</i>	14
3.7.2 <i>Gentamicina</i>	15
3.7.3 <i>Eritromicina</i>	16
4. Objetivos	17
5. Materiales y métodos	17
5.1 Alimentos empleados	17
5.2 Medios de cultivo y material para procesamiento de las muestras	18
5.3 Procesado de los alimentos y preparación de diluciones seriadas	21
5.4 Recuentos bacterianos	23

5.5 Identificación preliminar	24
5.6 Antibiograma	25
6. Resultados y Discusión	27
6.1 Recuentos bacterianos	27
6.2 Tinción de Gram y prueba de la catalasa	34
6.2.1 <i>TSA</i>	34
6.2.2 <i>KAA</i>	35
6.2.3 <i>EMB</i>	36
6.2.4 <i>MRS</i>	37
6.2.5 <i>V-J</i>	38
6.3 Antibiograma	40
7. Conclusiones	42
8. Bibliografía	43
8.1 Normativa consultada	46

1. RESUMEN

A día de hoy, los productos lácteos se han consolidado como uno de los pilares fundamentales en la dieta básica del ser humano debido a sus características nutricionales y efectos beneficiosos. Sin embargo, estos productos también pueden causar intoxicaciones alimentarias y diversas patologías del tracto gastrointestinal. En este estudio se recoge el análisis microbiológico de distintos tipos de productos lácteos entre los que encontramos yogurt natural azucarado, cinco variedades de queso y cuatro variedades de leche en las que se han aislado diferentes especies microbianas. Nuestros resultados muestran, en general, un mayor crecimiento bacteriano en quesos, siendo éste prácticamente inexistente para el yogurt o más reducido en el caso de las leches. Además, se realizó la evaluación de resistencias frente a antimicrobianos de las cepas aisladas en estos alimentos sobre diferentes medios de cultivo, encontrando las mayores tasas de resistencia antimicrobiana frente a la ampicilina.

Palabras clave: Productos lácteos, análisis microbiológico, resistencia a antibióticos

2. ABSTRACT

Nowadays, dairy products are one of the most important basis in human's diet because of their nutritional characteristics and beneficial effects. However, these products can cause food poisoning and various diseases at the gastrointestinal tract. In this research, we have carried out a microbiological analysis of different types of dairy products such as sweetened plain yogurt, five varieties of cheese and four varieties of milk, where we have been able to isolate diverse microbial typologies. Our results show, mostly, a bigger bacterial growth in cheeses, a practically nonexistant one in yogurt and a fewer bacterial growth in milks. Moreover, the evaluation of the antimicrobial resistance of isolated strains from these dairy products on different culture media shows the largest antimicrobial resistance against ampicillin.

Key words: dairy products, microbiological analysis, antimicrobial resistance.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Leche

La leche es un producto líquido complejo a niveles fisiológicos que facilita el correcto desarrollo y adaptación de recién nacidos aportándoles nutrientes y componentes biológicos necesarios y que además, estimula el crecimiento de sus células, la maduración del sistema digestivo y los tejidos linfoides asociados al intestino y el establecimiento de lo que será la futura microbiota asociada a este sistema. Por otro lado, estos componentes biológicos incluyen diferentes tipos de proteínas y vitaminas, oligosacáridos o ácidos orgánicos que pueden tener efectos beneficiosos para la salud entre los que encontramos una disminución de la presión sanguínea y de la absorción del colesterol o incluso efectos antimicrobianos, ya sea actuando durante la digestión o directamente como agentes preventivos (Ebringer *et al.*, 2008)

3.1.1 Leche de vaca

La leche vacuna es una mezcla de varias sustancias que se pueden encontrar en emulsión o suspensión y en la forma denominada extracto seco, compuesto por lactosa, agua grasa, vitaminas, minerales, como el calcio, y proteínas, entre las que se encuentran la B12 o la caseína (Gómez *et al.*, 2005), que ha sido usada históricamente como suplemento nutricional para la prevención y tratamiento de casos de desnutrición infantil. De hecho, se ha demostrado que un consumo deficiente de este tipo de leche durante la infancia sin usar un suplemento mineral de calcio junto a otros factores como la falta de ejercicio físico, deriva en un aumento de las posibilidades de sufrir sobrepeso y fracturas óseas durante la etapa preadolescente (Goulding *et al.*, 2004). Sin embargo, ante el consumo de este producto también podemos encontrar diversos efectos perjudiciales, ya que alimentar a niños de edades no muy avanzadas (< 1 año) con él puede acarrear una alta carga renal, debido a que reciben una cantidad mayor de minerales y proteínas de la que necesitan, anemia por deficiencia de hierro, como consecuencia de la baja cantidad de hierro que contiene, o incluso alergias a la proteínas de la leche

(fracción de Whey y de la caseína) que pueden originar problemas en los tractos respiratorio y digestivo, así como en la piel (Turck *et al.*, 2013).

3.1.2 Leche de cabra

Al igual que la leche de vaca, ésta es considerada como una gran fuente de calcio y proteínas varias. Sin embargo, estos elementos se encuentran en cantidades tan altas que sin el correcto tratamiento de este tipo de lácteo, podría verse aumentado el riesgo de padecer enfermedades como el síndrome urémico hemolítico, hipernatremia o incluso la acidosis metabólica. La leche caprina es también baja en vitamina B12 y ácido fólico, por lo que al contrario que la leche de vaca, ésta no es indicada, ni aun siendo tratada, para su uso en dietas infantiles, ya que los niños tienden a desarrollar como consecuencia de esta deficiencia anemia megaloblástica (4). Sin embargo, otros estudios sugieren que este producto podría ser apropiado para personas que sean intolerantes a la leche vacuna o que sufran de anomalías que les obliguen a ingerir alimentos que sean fácilmente digeribles y de los que se puedan extraer los nutrientes necesarios, siempre y cuando puedan cubrir las necesidades de folato y vitamina B12 en la dieta mediante suplementos (Boza *et al.*, 1997)

3.2 Queso

Este es el nombre que se le da a aquellos productos lácteos agrupados dentro del grupo de fermentaciones basadas en la leche y que se han extendido por el mundo bajo una gran variedad de formas, texturas y sabores, teniendo su origen en varias coincidencias que ocurrieron de manera fortuita basadas en la habilidad de las bacterias del ácido láctico para desarrollarse en la leche y ser capaces de reducir su pH hasta el mismo nivel isoeléctrico que el de la caseína que contiene la misma y en definitiva de fermentar su lactosa (Fox *et al.*, 2017).

3.2.1 Tipos de queso y valor nutricional

Por otro lado, gracias a la adquisición de nuevos conocimientos químicos y microbiológicos dentro de la industria láctea, con el tiempo comenzó a ser posible la creación de nuevas variedades de queso con diferentes cualidades y una calidad

más consistente. Es más, una de las causas más importantes para que exista una variedad de quesos tan sobresaliente en la actualidad es el tipo de animal del que se ha extraído la leche para su producción, siendo la más usada la vacuna, aunque es cierto que esto puede variar según la región del mundo en la que nos encontremos puesto que por ejemplo, en la Cuenca Mediterránea, el queso fabricado a partir de leche de cabra u oveja es muy común a diferencia de en otros lugares (Fox *et al.*, 2017). Además, otro factor que impulsa a que exista tal variedad de queso es el 'ecosistema' que rodea al mismo, compuesto a su vez de tres elementos distintos: los agentes de maduración (siendo éstos microorganismos y enzimas), la constitución del queso fresco y las condiciones del entorno en el que madure. Sin embargo, clasificar las distintas clases de queso existentes no es tan sencillo, ya que a nivel global no hay un acuerdo sobre una correcta clasificación y ésta puede variar en función de diferentes criterios ya sean microbiológicos, de composición o que incluyan los procesos realizados en la fabricación del producto (Almena-Aliste., 2014).

Aun así, quizás una de las clasificaciones más completas y que nos podrían servir de guía para ello sea la de Ottogalli, el cual divide los quesos en tres grupos distintos:

- 'Lacticinia': grupo en el que se reúnen aquellos quesos que han sido elaborados a partir de crema, leche y suero de leche o de manteca mediante un proceso de coagulación utilizando ácido, ya sea cítrico o láctico, e incluyendo o no un proceso de calentamiento.

- 'Formatica': grupo que contiene la mayor variedad existente de quesos y que han sido coagulados mediante el uso de cuajo.

- 'Miscellanea': grupo más heterogéneo puesto que incluye productos procesados, encurtidos, rallados, ahumados, quesos creados mediante mecanismos de ultrafiltración o análogos, e incluso aquellos que contienen en parte elementos que no son lácteos como verduras o frutas (Fox *et al.*, 2017).

En cuanto a su valor nutricional, y continuando con la temática anterior, el contenido de grasas, proteínas, cloruro de sodio y humedad variará en función del tipo de queso, influyendo también de manera importante su procedencia, puesto que un queso artesano contendrá de manera general más grasas y proteínas que uno elaborado industrialmente. Además, el aporte energético que puede ofrecer varía mucho, igualmente, dependiendo del tipo de queso y la estructura química que

presente, puesto que debido a que presenta un contenido no muy alto de lactosa, casi todas las calorías que aporta provienen de su materia grasa y sólo una pequeña parte de sus proteínas.

Conjuntamente, en este caso el tipo de leche y sus características microbiológicas influirán a la hora de elaborar el queso y en su calidad final (Ares Cea *et al.*, 2002).

3.3 Yogurt

El yogurt ha sido un alimento incorporado en la dieta del ser humano durante cientos de años, siendo actualmente un producto resultante de la fermentación de leche acidificada gracias a bacterias como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Otras bacterias como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidus* también se añaden en algunas ocasiones al yogurt para potenciar sus efectos positivos sobre la salud y, cuando se consume diariamente, puede disminuir el crecimiento de organismos patógenos en el tracto gastrointestinal y mejorar los problemas de intolerancia a la lactosa principalmente en niños. Asimismo, se ha demostrado que este alimento también es capaz de reducir el riesgo de contraer gran cantidad de problemas de salud como enfermedades respiratorias y alergias, enfermedades cardiovasculares, diabetes (tipo 2), síndromes metabólicos e incluso mejorar nuestra salud dental y ósea (Fisberg *et al.*, 2015).

Sin embargo, a pesar de que el yogurt lleva introducido en nuestras vidas tanto tiempo, sigue teniendo bajas tasas de consumo a nivel mundial debido a diversas barreras que aún cuesta superar. Las principales dificultades que hallamos son la intolerancia a la leche, la alergia a la leche de vaca o la imposibilidad de acceder a este tipo de productos en los países más empobrecidos, convirtiéndose así en una oportunidad perdida para llevar un estilo de vida más saludable, ya que este lácteo tiene un alto valor nutricional al ser una gran fuente de proteínas, calcio, potasio y probióticos, además de contener fósforo y vitaminas B12 y B2 (Fisberg *et al.*, 2015). En cuanto a los tipos de yogurt existentes, según el Real Decreto 179/2003, por el que se aprueba la norma de calidad para el yogur o yoghurt (Boletín Oficial del Estado núm. 42, de 18/02/2003), podemos distinguir:

- Yogurt natural: producto de leche cuajada que ha sido obtenida a través de la fermentación láctica mediada por las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* por medio de leche pasteurizada, leche en polvo, leche

concentrada pasteurizada totalmente o en parte desnatada, suero en polvo y diversos productos obtenidos como resultado del fraccionamiento de la propia leche.

- Yogurt azucarado: yogurt natural al que se le ha incorporado algún azúcar o azúcares comestibles.

- Yogurt edulcorado: yogurt natural al que se le añade algún tipo de edulcorante autorizado.

- Yogurt con zumos, fruta y/u otros artículos naturales: yogurt natural al que se le ha agregado cualquier tipo de producto natural, zumo y/o fruta.

- Yogurt aromatizado: yogurt natural con agentes aromáticos regularizados incorporados.

- Yogurt pasteurizado tras la fermentación: tipo de yogurt sometido a un proceso de pasteurización o similares tratamientos con calor, provocando así que se dañe la viabilidad de las bacterias del ácido láctico específicas.

No obstante, las distintas clases de yogurt pueden variar según la zona del mundo en la que nos encontremos y el correspondiente estilo de vida que lleve su población, ya que por ejemplo en Asia y Europa del Este se consumen derivados que se han sometido a una fermentación alcohólica mezclando bacterias y levaduras (Kéfir o kumis), mientras que en otros lugares como Alemania y España se suelen usar procedimientos bactericidas que involucran calor (Fisberg *et al.*, 2015).

3.4 Posibles vías de contaminación de los productos lácteos

En la industria láctea, la mayoría de productos siguen una serie de etapas, empezando por la alimentación animal, seguido de la producción de leche cruda y procesado de la misma, en las cuales pueden ser contaminados antes de llegar al consumidor. Las principales vías mediante las que el alimento puede llegar a deteriorarse son tres:

- Vía física: normalmente asociada a la presencia de cuerpos extraños como resultado de las diferentes transformaciones que puede sufrir la leche hasta otra variedad de producto lácteo, o durante su almacenamiento, embalaje y transporte.

- Vía química: la producción de leche está fuertemente unida al ambiente en el que el ganado se encuentre y depende en gran medida de las actividades humanas. Por ello, el pastoreo de reses en suelos contaminados con componentes químicos y la deposición atmosférica de partículas procedentes de residuos industriales en el

mismo, suponen la entrada de estos componentes en la cadena de producción primaria de leche. Estos compuestos químicos también pueden ser administrados al ganado mediante medicamentos veterinarios y acaban afectando a la producción y calidad de la leche igualmente.

- Vía microbiológica: los agentes patógenos son capaces de producir todo tipo de efectos perjudiciales y enfermedades en el ser humano como veremos en el siguiente apartado (Mercogliano *et al.*, 2018).

3.5 Microorganismos patógenos frecuentes en los productos lácteos

Los productos lácteos se han consolidado a día de hoy como una fuente primaria de probióticos, los cuales incluyen, por lo general, especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, que nos confieren efectos beneficiosos a nivel gastrointestinal, mejorando las condiciones para el desarrollo de la microbiota e incluso, disminuyendo la población de microorganismos patógenos (Tunick *et al.*, 2014)). Sin embargo, los lácteos no solo incluyen microorganismos beneficiosos ya que, pese a la implementación de la técnica de pasteurización de la leche cruda, podemos encontrarlos de todo tipo y pueden causar efectos adversos sobre la salud humana. Aun así, el consumo de leche cruda y derivados de la misma, puede acarrear la aparición de una gran cantidad de enfermedades, entre las que incluimos el cólera, la disentería o la tuberculosis, llegando a incrementarse el riesgo de sufrir una entre un 150% y un 850% respecto al consumo de un producto resultante de este proceso térmico antimicrobiano. Pese a que, en el presente, la pasteurización ha supuesto la eliminación de gran cantidad de patógenos perjudiciales para nuestra salud, siguen existiendo varios capaces de provocar contaminación tras el proceso como *Listeria monocytogenes*, o, en menor medida, *Escherichia coli*, *Salmonella* no tifoidea y *Cronobacter*, entre otros. La capacidad para reconocer estos organismos y su supervivencia en los productos lácteos está suponiendo a día de hoy graves problemas de salud pública. Además, en la leche en polvo se ha demostrado la presencia microorganismos no patógenos que pese a no causar enfermedades, contienen genes o elementos que confieren resistencia a antimicrobianos (Boor *et al.*, 2017).

Por otra parte, la investigación llevada a cabo por Aguirre *et al* (1993) nos sugiere que a pesar de que indudablemente las bacterias ácido lácticas son beneficiosas

para nuestra salud y antiguamente no eran consideradas una amenaza clínica, también están asociadas a diversas enfermedades por su potencial como patógenos oportunistas. De entre los principales géneros involucrados en estas afecciones, podemos incluir los mencionados anteriormente, incorporando a los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y, destacando por encima de los demás, *Enterococcus*, causante de infecciones nosocomiales, y cuya resistencia natural a gran variedad de antibióticos, además, de su capacidad para transferir genes de resistencia a otras bacterias como *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* sigue causando graves problemas clínicos y genera serias dudas en su uso como probiótico (Aguirre *et al.*, 1993).

De igual manera y, a pesar de no ser un organismo bacteriano, el protozoo parásito *Cryptosporidium parvum* puede causar diarreas agudas en pacientes inmunodeprimidos, siendo una de sus principales vías de infección la ingestión de productos derivados de la leche vacuna, especialmente si ésta no ha sido tratada mediante el proceso de pasteurización. En el caso de que el alimento en cuestión haya pasado este proceso, se han documentado ocasiones en las que ooquistes de *C.parvum* son capaces de sobrevivir y mantener su capacidad infectiva incluso tras la fermentación de la leche hasta derivados como el yogurt, llegando al consumidor y produciéndole efectos nocivos (Deng *et al.*, 1999).

Por último, el papel de los productos lácteos en la transmisión de organismos víricos es casi inexistente. En todo caso, podríamos mencionar el virus vacuna o *Vaccinia virus*, el cual está considerado como causante de una zoonosis emergente que produce exantemas en las ubres vacunas y en las manos de personas encargadas del ordeño bajo condiciones pobres de higiene, pero que en ciertos casos puede transmitirse tras el consumo de leche cruda o derivados de leche pasteurizada, debido a la resistencia térmica del microorganismo (De Oliveira *et al.*, 2017). También, cabe destacar la existencia de bacteriófagos presentes en la industria láctea, los cuales son virus que eliminan las bacterias necesarias para procedimientos como la fermentación de productos lácteos y en muchos casos pueden causar grandes pérdidas económicas en la industria. De hecho, la mayoría de los bacteriófagos que atacan a las bacterias del ácido láctico pueden clasificarse dentro de la familia *Siphoviridae* y en menor medida en la familia *Podoviridae* (Fox *et al.*, 2017).

3.6 Importancia de la seguridad alimentaria

Debida a la anteriormente vista variedad de microorganismos que podemos encontrar en los productos lácteos y que pueden causar diversas patologías y afectos adversos en el ser humano, deben de seguirse una serie de normas que garanticen la calidad del producto de cara al consumidor.

Con la introducción del método de pasteurización, la seguridad alimentaria en lo referente a la industria de los productos lácteos mejoró notablemente. Progresivamente, fueron apareciendo otras estrategias como los controles del estado de salud del ganado y mejorías en la higiene de los lugares de su explotación o los test de detección de microorganismos en la leche cruda que optimizaron aún más este aspecto. Sin embargo, pese a la gran cantidad de avances que se han conseguido hasta la fecha en la industria, todavía quedan grandes desafíos que afrontar en este sector para implementar metodologías que permitan controlar de manera más exhaustiva la contaminación tras el procesado o la fiabilidad de quesos elaborados con leche cruda (Boor *et al.*, 2017).

Por su parte, en España según el Real Decreto 1728/2007 se estipulan una serie de normas básicas que deben de seguir los operarios de la industria láctea para garantizar la calidad y seguridad de sus productos.

3.6.1 Controles reglamentarios en el lugar de explotación

1. Una vez que la leche cruda ha sido extraída del animal, deberá realizarse una verificación de los parámetros higiénico-sanitarios previa a su carga en la cisterna de transporte.

2. La leche cruda no podrá someterse bajo ninguna circunstancia a cualquier procedimiento que pueda alterar su composición o características en el lugar de explotación.

3. La verificación de parámetros debe de ser llevada a cabo por personal autorizado y experto, que realizará una inspección visual y olfativa y realizará diversos controles de temperatura y las condiciones de limpieza del tanque que alberga la leche, además de una prueba que permita detectar restos de antibióticos. En caso de que se sospeche de cualquier indicio de contaminación microbiológica, se realizarán pruebas adicionales de determinación de la acidez y la estabilidad alcohólica.

4. Una vez verificado que la leche cruda posee unas características idóneas, ésta podrá cargarse para su transporte.

5. Si una vez que la leche se ha cargado en el tanque se observan restos de partículas sólidas en el fondo, el personal encargado de la toma de muestra deberá avisar al responsable del centro lácteo y al productor de la explotación.

3.6.2 Controles reglamentarios en el centro lácteo

1. Al igual que en el lugar de explotación los controles deben de ser realizados por personal cualificado o autorizado. Asimismo, se realizará una verificación de los parámetros mencionados anteriormente, añadiendo en este caso, la supervisión del cumplimiento de las condiciones de conservación y transporte preestablecidas.

2. Una vez realizadas las comprobaciones pertinentes, tras el transporte únicamente podrá descargarse en el centro lácteo la leche sin rastros de contaminación microbiológica, con apariencia y aroma normales, temperatura superior a 0°C e inferior a 10°C, estable ante el alcohol, acidez inferior a 18° y transportada en una cisterna en condiciones idóneas de higiene.

3. Si la leche no cumple con algunos de los requisitos vistos en el apartado anterior, será procesada como un subproducto según 'el Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009'.

4. Finalmente, el producto lácteo que haya sido verificado, será transportado a un laboratorio de análisis cualificado para un estudio final que dé el visto bueno de cara a su comercialización.

3.7 Tipos de antibióticos empleados y resistencias

Ahora bien, como ya se ha comentado anteriormente, en este estudio se realizó la evaluación de resistencias frente a antimicrobianos de las cepas aisladas en los tipos de productos lácteos utilizados. Para ello, empleamos tres clases de antibióticos distintos entre los que incluimos ampicilina, gentamicina y eritromicina

3.7.1 Ampicilina

La ampicilina es un antibiótico bactericida perteneciente a la familia de los betalactámicos, los cuales derivan de agentes antibióticos que contengan en su estructura molecular un anillo betalactámico, y que frecuentemente es utilizado contra infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas dado que ambas contienen en su pared celular peptidoglicano. Este heteropolímero es el principal foco de acción de esta clase de antimicrobianos ya que es un requisito indispensable en las células bacterianas pero no está presente en la estructura celular de mamíferos, actuando concretamente, sobre la enzima transpeptidasa, responsable de mediar en la etapa final de su síntesis. Además, la ampicilina tiene una gran actividad contra organismos bacterianos que están en un período de desarrollo activo y aunque este mecanismo aún no está totalmente descrito, se especula que puede deberse a que cuando las proteínas de unión a la penicilina que están en una etapa avanzada de su vida y no sintetizan peptidoglicano están unidas por betalactámicos, no se activan las autolisinas, enzimas asociados a la lisis de la pared celular mediada por los betalactámicos. (Sarasola *et al.*, 1994)).

Ahora bien, el principal mecanismo de resistencia frente a este antimicrobiano está relacionado con su inactivación mediada por enzimas hidrolíticas conocidas como betalactamasas y que son capaces de formar derivados ácidos de los betalactámicos carentes de actividad antibacteriana. Aun así, la resistencia a este tipo de antimicrobianos también puede surgir debido a las porinas, que son proteínas encargadas de regular la permeabilidad antibacteriana de la membrana exterior de los organismos Gram negativos y la interacción con el entorno que los rodea, y mutaciones de ciertos genes que codifican a las proteínas de anclaje a las penicilinas, ya que una alteración en su estructura puede conllevar que se reduzca su afinidad hacia los propios betalactámicos (Rafailidis *et al.*, 2007). De hecho, este último mecanismo es el que ha sido utilizado de manera más competente por bacterias Gram positivas ya que mantienen activas estas proteínas de anclaje, mientras que en el caso de bacterias Gram negativas la producción de betalactamasas es el proceso que con más eficacia ha conseguido evitar los efectos letales de antibióticos como la ampicilina y que a día de hoy están causando tantos problemas de salud pública (Bush., 2018).

3.7.2 Gentamicina

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido bactericida derivado de productos de la fermentación de la bacteria *Micromonospora purpurea* que resiste relativamente bien las altas temperaturas, es soluble en agua, estable a rangos amplios de pH y cuya composición se basa en un amino azúcar unido mediante un enlace glucosídico a dos anillos alifáticos. Este antimicrobiano, como el resto de los aminoglucósidos, provoca fallos en la síntesis polipeptídica bacteriana al unirse a sitios específicos de los ribosomas 30S, causando así que la bacteria afectada sea incapaz de producir proteínas necesarias para su supervivencia. Además, se ha demostrado su eficacia contra infecciones causadas por organismos bacterianos Gram negativos como pueden ser la gran mayoría de géneros de la familia *Enterobacteriaceae* o cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que contra Gram positivos ha demostrado no ser adecuado por su baja actividad (salvo contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) a no ser que actúe junto la penicilina para combinar sus efectos (Appel., 1978). Sin embargo, es cierto que algunos estudios han esclarecido que penicilinas como la carbenicilina o la ticarcilina son capaces de inactivar a la gentamicina u otros aminoclucósidos cuando se combinan bajo determinadas circunstancias de temperatura o cantidad administrada. (Mclaughlin *et al.*, 1971) (Davies *et al.*, 1975).

Por otro lado, en cuanto a los variados mecanismos de resistencia frente este antibiótico, podemos diferenciar su modificación e inactivación debido a las enzimas aminogucósido-acetiltransferasa, fosfotransferasas y nucleotidil-transferasas que actúan tanto en bacterias Gram negativas como positivas y que en la actualidad supone el principal problema de resistencia tanto a la gentamicina como a los demás aminoglucósidos existentes. Esto, se debe a que estas enzimas son capaces transformar los grupos $-OH$ y $-NH_2$ del propio medicamento, lo que provoca su inactivación. Asimismo, existen otros mecanismos que parecen estar relacionados con mutaciones cromosómicas puntuales (menos comunes) que provocan la metilación del componente de la subunidad menor ribosómica 30S (ARN ribosomal 16S), así como sistemas que reducen la permeabilidad de membrana debido a que se disminuye el transporte en la membrana interna o la permeabilidad de la

membrana exterior es modificado, o incluso bombas de eflujo o exporte que se encargan de expulsar fuera de la célula bacteriana el propio antimicrobiano evitando, por tanto, sus efectos. (Daza., 1998) (Ramirez *et al.*, 2010) (Doi *et al.*, 2016).

3.7.3 Eritromicina

La eritromicina es un antimicrobiano originalmente obtenido de *Streptomyces erythrus* e incluido dentro de la familia de los macrólidos, los cuales se caracterizan por poseer un anillo de lactona macrocíclico, que puede ser considerado tanto bacteriostático como bactericida dependiendo de diversos factores entre los que encontramos la concentración en la que se suministre, siendo no mortal a bajas concentraciones y letal a altas, la sensibilidad del organismo en cuestión o la fase de crecimiento en la que éste se encuentre. Este compuesto, además de ser poco soluble en agua y una base débil, posee un mecanismo de acción basado en la interrupción de la síntesis proteica bacteriana debido a su unión con la subunidad 50S de los ribosomas, inhibiendo así su translocación. La eritromicina es usada principalmente contra bacterias Gram positivas ya que presentan una sensibilidad elevada al fármaco, mientras que no es recomendable su uso contra la gran mayoría de bacterias Gram negativas ya que presentan resistencia innata frente a su uso (Gribble *et al.*, 1982). Aun así, en algunos casos de infecciones del tracto urinario causado por organismos Gram negativos, puede estar recomendado su uso junto al de agentes alcalinizantes, del mismo modo que en infecciones respiratorias en las que, junto a sulfamidas, puede tener un efecto positivo principalmente frente a *Haemophilus influenzae*. (Brittain., 1987).

Finalmente, en cuanto a los fenómenos de resistencia bacterianos existentes tanto frente a la eritromicina, como a macrólidos en general, distinguimos sistemas de exclusión o bombeo activos (muy común en bacterias Gram negativas), delecciones o inserciones en las proteínas ribosómicas L4 y L22 e incluso resistencias mediadas por enzimas fosfotransferasa, ligeramente diferentes de las enzimas fosfotransferasa asociadas a otros antimicrobianos por su interdominio conector característico. Sin embargo, la gran mayoría de ocasiones en las que la resistencia antimicrobiana se manifiesta, es vinculada a mutaciones (metilaciones) del componente ARN ribosomal 23S, asociado a la subunidad 50S, que pueden ser inducibles (para macrólidos de 14 y 15 átomos) o constitutivas (para macrólidos con anillos de 16

átomos y lincosamidas). La principal diferencia entre ambas mutaciones radica en que en la constitutiva, los macrólidos de 16 átomos y lincosamidas no son capaces de inducir la actividad de metilasas debido a que carecen del azúcar conocido como cladinosa, sí presente en macrólidos con anillos de 14 y 15 átomos. (Daza., 1998) (Cobos- Trigueros et al., 2009) (Lee *et al.*, 2017) (Fong *et al.*, 2017) (Massip *et al.*, 2017).

4. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

1. Evaluar la carga y diversidad microbiana en alimentos lácteos.
2. Realizar un estudio comparativo de la cantidad y diversidad microbiana en productos lácteos fermentados y no fermentados.
3. Confirmar la eficacia de diversos medios selectivos para el aislamiento de grupos microbianos de interés alimentario.
4. Estudiar la resistencia frente a antibióticos de empleo habitual en clínica humana en cepas aisladas de alimentos lácteos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Alimentos empleados

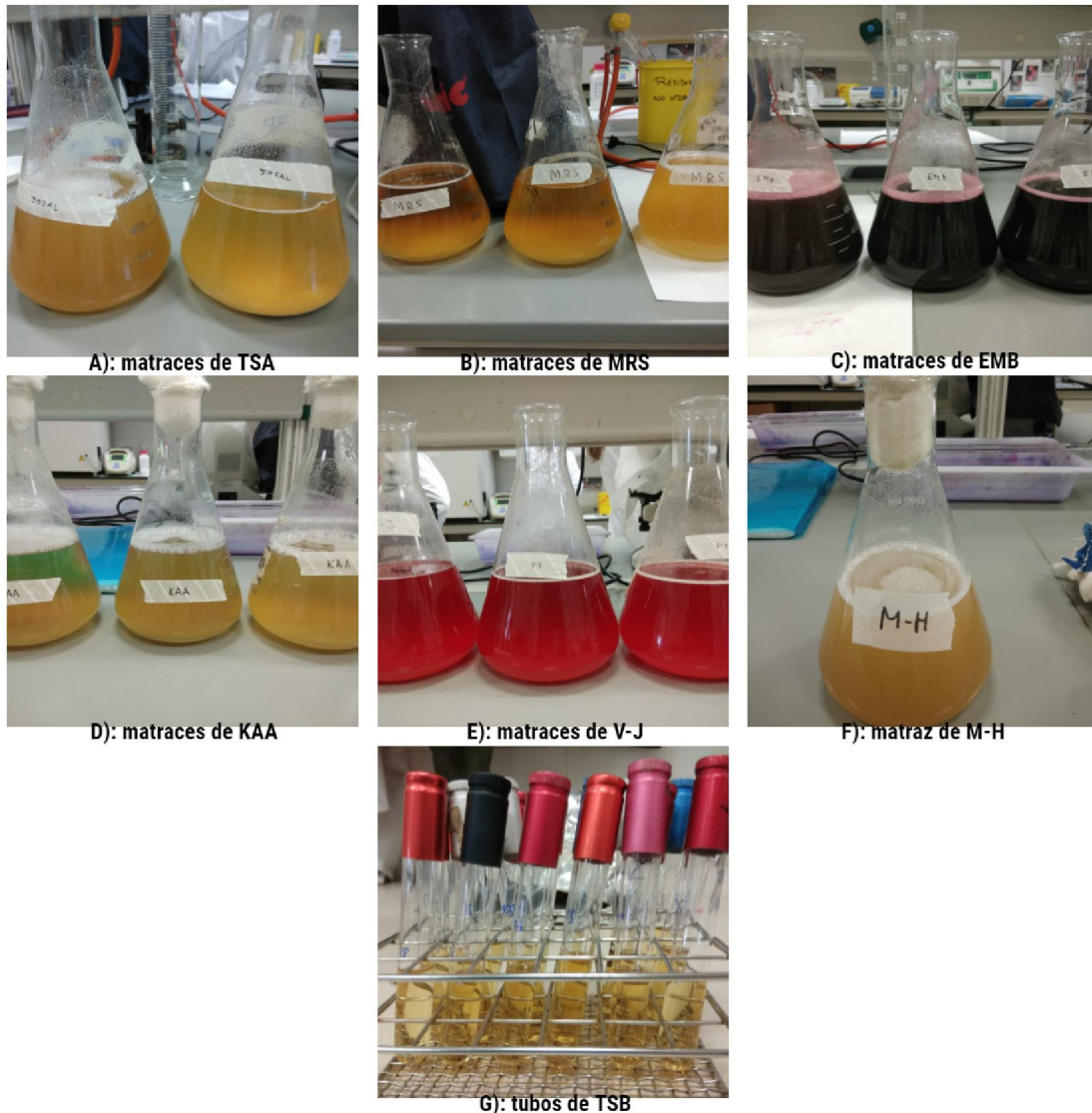
Los alimentos empleados en este caso fueron, por un lado, cuatro tipos de leche: desnatada, semidesnatada, leche extraída directamente de cabra, que llevaba dos semanas en producción, y calostro de una cabra que había dado a luz unos segundos antes. Por otro lado, se utilizaron muestras de yogurt natural azucarado, de dos tipos de quesos frescos de cabra (obtenidos en dos establecimientos diferentes), de queso de vaca en barra pasteurizado, de queso mezcla de oveja, cabra y vaca y de queso curado reserva.

5.2 Medios de cultivo y material para procesamiento de las muestras

Los medios utilizados para el aislamiento de la microbiota presente en los alimentos fueron, un medio general, TSA (tryptic-casein soy agar) (*imagen A*) y cuatro medios selectivos, siendo estos MRS Agar (Man, Rogosa y Sharpe) (*imagen B*), EMB Agar (eosin methylene blue agar) (*imagen C*), KAA Agar (kanamycin aesculin azide agar) (*imagen D*), y V-J Agar (Vogel-Jhonson agar) (*imagen E*), además, de los medios M-H Agar (Müller-Hinton agar) (*imagen F*) y TSB (tryptic-casein soy broth) (*imagen G*) que hemos empleado para la determinación de la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas, todos ellos de Scharlab (Barcelona), excluyendo al medio MRS que procede de PanReac Applichem (Barcelona).

Todos los medios se prepararon según las instrucciones del fabricante:

Medio	Gramos de medio deshidratado	Mililitros de agua destilada
TSA	32	800
MRS	49,6	800
EMB	30	800
KAA	26,4	800
V-J	48	800
M-H	30,8	800
TSB	4,5	150



Cada medio presenta una composición diferente y permite aislar diferentes tipos de microorganismos:

-TSA: Medio que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, ya sean exigentes nutricionalmente o no. Su composición consta de peptona de caseína (15g/l), peptona de soja (5g/l), cloruro sódico (5g/l) y agar (15g/l).

-TSB: Medio líquido general que se emplea para hacer crecer las cepas bacterianas para el ensayo de resistencia a antibióticos. Está formado por peptona de caseína (17g/l), peptona de soja (3g/l), cloruro sódico (5g/l), fosfato dipotásico (2,5 g/l) y D (+) Glucosa (2,5 g/l).

-MRS: En este medio crecerán principalmente bacterias lácticas, concretamente cocos o bacilos G+. Entre los elementos que lo componen distinguimos peptona

proteosa (10g/l), extracto de carne (8g/l), extracto de levadura (4g/l), D (+) Glucosa (20g/l), acetato sódico (5g/l), citrato triamónico (2g/l), sulfato magnésico (0,20g/l), sulfato manganeso (0,05g/l), fosfato dipotásico (2g/l), polisorbato 80 (1g/l) y agar (10g/l).

-EMB: En este medio crecen de forma selectiva enterobacterias, bacilos o cocobacilos G-. Sus constituyentes son peptona (10g/l), lactosa (10g/l), dipotasio hidrógeno fosfato (2g/l), eosina amarillenta (0,4g/l), azul de metileno (0,065g/l) y agar (15g/l).

-KAA: En este medio se desarrollan los enterococos, concretamente cocos G+ que suelen agruparse en parejas o tétradas. Sus componentes son triptona (20g/l), extracto de levadura (5g/l), cloruro sódico (5g/l), citrato disódico (1g/l), esculina (1g/l), citrato férrico-amónico (0,5g/l), azida sódica (0,15g/l), kanamicina sulfato (0,02g/l) y agar (15g/l).

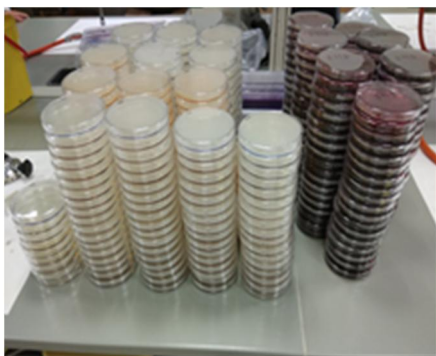
-V-J: En este medio se desarrollan los estafilococos, cocos G+ en racimos. Los elementos que lo integran son peptona de caseína (10g/l), extracto de levadura (5g/l), manitol (10g/l), fosfato dipotásico (5g/l), cloruro de litio (5g/l), glicina (10g/l), rojo de fenol (0,025g/l) y agar (15g/l). Una vez esterilizado y atemperado este medio, se adiciona una solución de telurito potásico para que las cepas de *Staphylococcus aureus* aparezcan de color negro (*S. aureus* reduce el telurito de potasio al metal telurio y da como resultado el crecimiento de colonias de este color).

-M-H: Medio específicamente estandarizado para la realización del antibiograma. Está compuesto por hidrolizado de caseína (17,5g/l), infusión de carne (2g/l), almidón (1,5g/l) y agar (17g/l).

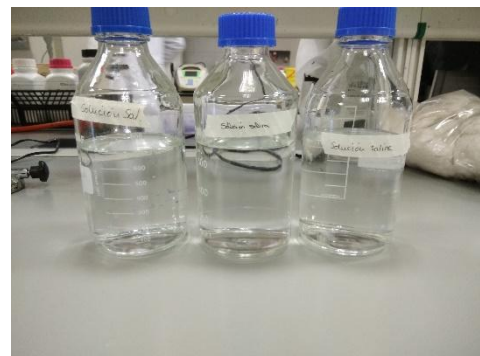
Una vez preparados los matraces, pasaremos a esterilizar los medios en autoclave, todos ellos a 121°C y una atmosfera de presión durante veinte minutos, a excepción del medio MRS, que trataremos a 115°C. Cuando termine el proceso de autoclavado, dejaremos que las preparaciones se atemperen a 50°C, para posteriormente comenzar a verterlas sobre placas de Petri estériles a razón de unos 15 mililitros cada una y así completar su preparación para la siembra (**imagen H**). Cabe mencionar, que para el medio TSA preparamos placas suficientes como para realizar el recuento bacteriano sobre todas nuestras diluciones a excepción de la 0, es decir, desde -4 hasta -1, mientras que en los medios selectivos MRS, EMB, KAA y V-J solo necesitaremos nuestra dilución 0 y la -1 *a priori* y siempre por duplicado puesto que así nos aseguramos de corroborar nuestros resultados.

Por su parte, como se ha dicho anteriormente, el TSB lo necesitaremos para la realización del antibiograma, por lo que prepararemos cincuenta tubos de ensayo rellenándolos a razón de 3 mililitros cada uno y los dejamos sobre una gradilla cubiertos por papel de aluminio y en la cámara fría hasta que los utilizemos.

También se preparará solución salina al 0,9% para diluir las muestras de alimentos sólidos (a razón de 45 mililitros por muestra) y para la obtención de las diluciones seriadas que se sembrarán en los medios de cultivo, concretamente alrededor de cincuenta tubos Eppendorf a los que anteriormente añadimos unos 900 microlitros de solución salina al 0,9% cada uno y que preservamos con papel de aluminio en la cámara frigorífica hasta su uso. Cabe destacar que dicha solución fue preparada previamente en tres frascos (por alumno) en los que mezclamos 700 mililitros de agua destilada y 6,3 gramos de NaCl (*imagen I*).



H): placas de Petri preparadas



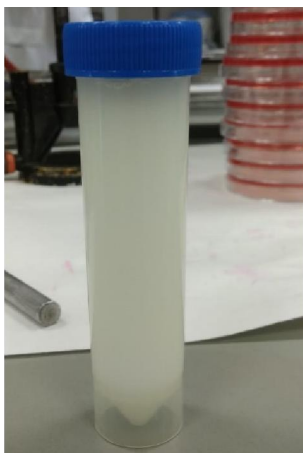
I): frascos de solución salina

5.3 Procesado de los alimentos y preparación de diluciones seriadas

En primer lugar, para el procesado de nuestros alimentos pesaremos 5 gramos de cada uno de los tipos de quesos de los que disponemos y del yogurt para posteriormente añadirles 45 mililitros de solución salina y homogeneizarlos en bolsas estériles en un Stomacher (modelo 80 Biomaster, Seward Ltd). Hecho esto, pasaremos la suspensión resultante a un tubo Falcon de 50 mililitros para trabajar más cómodamente (*imagen J*). Una vez completado el proceso, cada una de estas muestras pasará a ser considerada la dilución 0, con la que posteriormente obtendremos las correspondientes diluciones seriadas. Por otro lado, los productos lácteos líquidos constituirán, en sí mismos, la dilución 0.

Una vez realizado el homogeneizado de los productos sólidos, pasaremos a efectuar las diluciones seriadas, necesitando para ello otro material y condiciones como pueden ser micropipetas de 1 mililitro, puntas estériles, trabajar, por supuesto, cerca de la llama de mechero Bunsen para mantener las condiciones de esterilidad (*imagen K*) y alrededor de cincuenta tubos Eppendorfs con 0,9 mililitros de solución salina, puesto que necesitaremos cinco tubos por cada alimento (*imagen L*), ya preparados previamente.

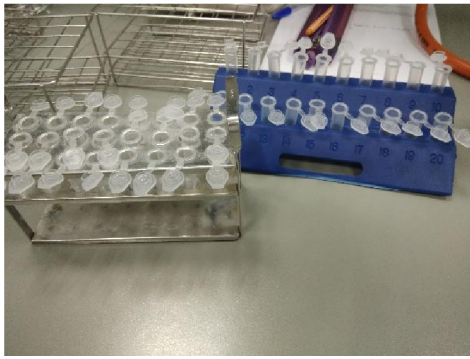
El proceso a seguir para realizarlas comienza por rotular cada uno de los cinco tubos con los que trabajaremos en cada alimento, siendo dos de ellos para una dilución 10^{-1} y los tres restantes para 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} respectivamente (la dilución -1 se siembra en todos los medios, tanto general como selectivos, por lo que necesitamos más cantidad y se prepara doble). Una vez hecho esto, tomaremos 100 microlitros de nuestra dilución 0 (sea el homogeneizado o la leche) y los agregaremos a nuestro tubo que contendrá la dilución -1, agitamos suavemente y, cambiando la punta que estamos usando, repetiremos el mismo proceso, pero en este caso cogeremos los 100 microlitros de la dilución -1 para pasarlo a la -2. Posteriormente volveremos a hacer esto un par de veces más hasta llegar al Eppendorf que contiene la dilución -4 y, finalmente, el procedimiento al completo con los demás alimentos (*imagen M*).



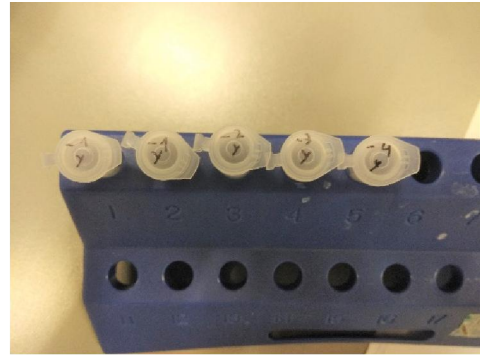
J): homogeneizado en tubo Falcon



K): puntas estériles, mechero Bunsen, micropipeta y asa de Digrafsky



L): tubos Eppendorf



M): Eppendorf para diluciones

5.4 Recuentos bacterianos

El objetivo de esta etapa, será realizar un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, ya sea en caso de productos líquidos como son los distintos tipos de leche, o por gramo, en caso de nuestros productos sólidos como son las diversas variedades de quesos y el yogurt. Cabe destacar que únicamente daremos como válidos para ello aquellos medios que contengan entre treinta y trescientas colonias, puesto que menos sería un número despreciable y más sería un número excesivo para poder realizar el recuento en placa. Así pues, una vez tenemos nuestras diluciones seriadas y placas de Petri con sus respectivos medios preparados, comenzaremos a realizar la siembra, para lo que necesitaremos una micropipeta, puntas estériles, un asa de Digralsky (*imagen K*) y por supuesto, trabajar en las proximidades de la llama de mechero Bunsen en condiciones de esterilidad. Empezaremos por extraer 100 microlitros de nuestra dilución con la micropipeta y los pasaremos a su placa de Petri correspondiente, extendiéndolo seguidamente por la misma con el asa flameada y fría. Repetiremos así pues este mismo procedimiento para el resto de diluciones y medios. Además, decir que si realizamos este proceso desde nuestra dilución más diluida hasta la que lo está en menor proporción, séase desde -4 hasta -1 en TSA y desde -1 a 0 en nuestros medios selectivos, no será necesario cambiar la punta de nuestra micropipeta ni flamear el asa de Digralsky cada vez que vayamos a cambiar de una placa a la siguiente. Una vez terminada la siembra, incubaremos nuestras placas en la estufa a 37°C, a excepción de las que contengan el medio MRS que necesitan estar a 30°C y se colocarán en una estufa diferente a esta temperatura. Tras 24-48 horas

pasaremos a realizar el recuento bacteriano haciendo las medias de los recuentos de colonias obtenidas en las placas duplicadas para dar los resultados finales.

5.5 Identificación preliminar

Para poder dar una identificación presuntiva de las cepas aisladas, seleccionaremos las colonias obtenidas en los diferentes medios de cultivo que hemos empleado y estudiaremos los microorganismos aislados, así como sus diversas morfologías, realizando dos tipos de pruebas de procedimiento sencillo:

-Tinción de Gram: esta técnica nos permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas en función del color que adquiera su citoplasma según el mayor o menor grosor de su pared celular tras el uso de diferentes colorantes. En caso de que el interior bacteriano se torne de un color rosado diremos que estamos ante una bacteria Gram negativa, mientras que si la bacteria se torna de color morado, diremos que es una bacteria Gram positiva. El procedimiento comienza por verter una gota de agua destilada sobre un portaobjetos y a continuación, recoger una muestra de la colonia en cuestión con nuestra asa de siembra flameada (evitando así contaminación) y fría (*imagen N*) para extenderla sobre nuestro portaobjetos.



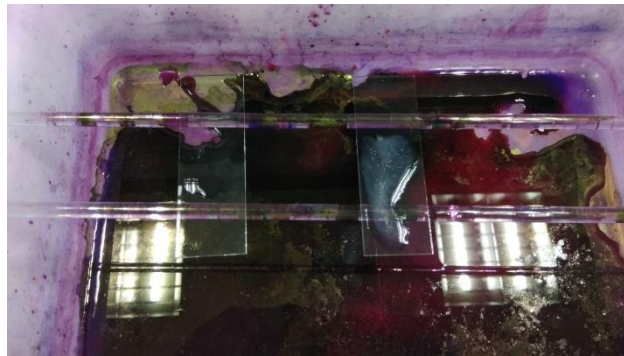
N): asa de siembra

Una vez hecho esto, secaremos y fijaremos con calor nuestro microorganismo sobre el mismo, lo dejaremos enfriar y posteriormente verteremos cristal violeta sobre el porta, cubriéndolo por completo, dejándolo penetrar en el interior bacteriano durante dos minutos. Pasado este tiempo y sin lavar con agua destilada, añadiremos lugol sobre nuestro porta cubriéndolo por completo y esperaremos nuevamente dos

minutos. Transcurrido este tiempo, eliminaremos el exceso de colorante y decoloramos con alcohol etílico hasta que veamos que comienza a arrastrarse nuestro tinte, en ese momento lavaremos con agua destilada y daremos paso a la safranina, la cual cubrirá nuestro porta durante tres minutos. Tras este intervalo, lavaremos la muestra y la dejaremos secar para, por último, ya poder visualizar nuestro microorganismo al microscopio con aceite de inmersión (objetivo $\times 100$).

-Prueba de la catalasa: gracias a este método podremos averiguar si, ante una bacteria con morfología Gram positiva, nos encontramos frente al género *Staphylococcus* o si por el contrario, se trata del género *Streptococcus*, siendo el primero catalasa positivo mientras que el segundo es catalasa negativo. Para esto, arrastraremos el asa de siembra flameada y fría sobre nuestra colonia en cuestión e inmediatamente después la frotaremos sobre un portaobjetos. Una vez hecho esto, echaremos un par de gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre la muestra y comprobaremos el resultado, siendo éste positivo en el caso de que aparezcan burbujas y negativo en caso de que no (*imagen Ñ*).

La aparición de burbujas nos indica la actividad catalasa de la bacteria, que descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno, que se desprende.

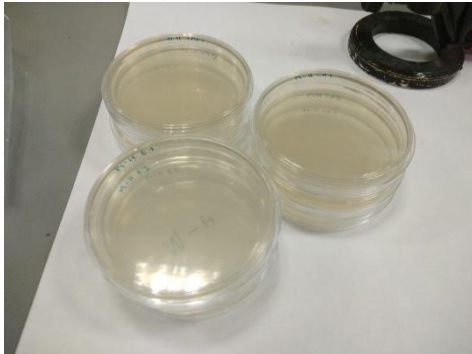


Ñ): ejemplo de catalasas negativa y positiva respectivamente

5.6 Antibiograma

Para determinar la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas de los alimentos necesitaremos el medio M-H (previamente preparado) en sus respectivas placas de Petri (*imagen O*) y el medio TSB, habiendo dispuesto con anterioridad de unos 50 tubos del mismo a razón de 3 mililitros cada uno, además de puntas

amarillas estériles, pinzas de punta recta (*imagen P*), micropipeta, escobillones estériles (*imagen Q*), mechero Bunsen, para trabajar en condiciones de asepsia, y por supuesto, discos de antibiótico de la marca `Oxoid' (*imagen R*), siendo estos ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg) y gentamicina (10 µg).



O): placas con medio M-H



P): pinzas de punta recta



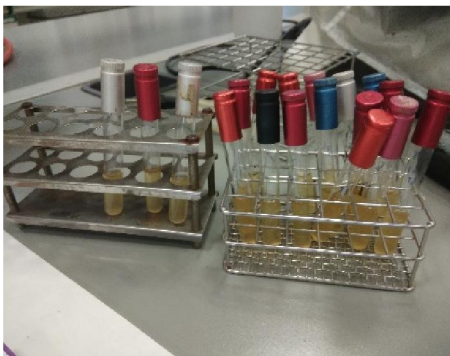
Q): escobillones



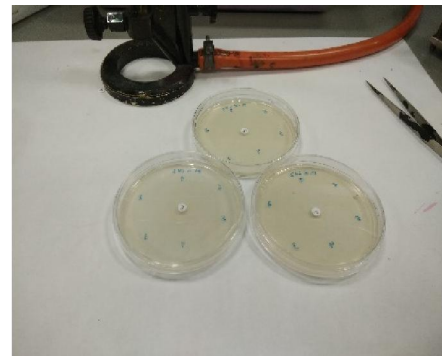
R): discos de antibiótico

En primer lugar, rotularemos cada una de las placas que vayamos a usar y que contengan nuestro medio M-H, usando en este caso nueve placas, puesto que tres de ellas serán para comprobar la resistencia a gentamicina (rotuladas del 1 al 6), eritromicina (rotuladas del 7 al 13), y las tres restantes para ampicilina (rotuladas del 13 al 18). A continuación, pasaremos a tomar muestras de las colonias que utilizaremos para el antibiograma, necesitando para ello las puntas estériles. Una vez recogida la muestra de nuestra colonia pasaremos a, ayudándonos de una micropipeta, realizar una resuspensión en los tubos de TSB (concretamente solo usaremos dieciocho de ellos, puesto que en mi caso solo aparecieron un total de dieciocho tipos de colonias diferentes). Una vez obtenida la suspensión bacteriana, dejaremos nuestros tubos incubando en la estufa a 37°C durante 24 horas, a excepción de aquellos tubos que contengan colonias provenientes del medio MRS,

los cuales deberán incubarse en una estufa diferente a 30°C como ya se ha mencionado anteriormente (*imagen S*). Transcurrido este tiempo, sacaremos nuestros tubos de las estufas y, por otra parte, pasaremos a colocar los discos de antibiótico en el centro de sus placas correspondientes con pinzas que habremos flameado previamente para conservar las condiciones de esterilidad (*imagen T*) y poder comenzar así con nuestro último paso, la siembra. Así pues, en cada placa sembraremos seis colonias, en forma de estrella alrededor del disco de antibiótico, empleando para ello escobillones, los cuales mojaremos en el tubo con TSB y su colonia correspondiente para después arrastrarlos en la placa de M-H en línea recta y dejando un pequeño espacio entre el disco de antibiótico colocado en el centro y la muestra. Realizaremos este mismo proceso con los demás tubos y una vez terminada la siembra, dejaremos las placas en la estufa a 37°C para comprobar nuestros resultados 24 horas después.



S): tubos de TSB preparados para la estufa de 30°C y 37°C respectivamente



T): placas de M-H con disco de antibiótico

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Recuentos bacterianos

Una vez han pasado un tiempo entre 24 y 48 horas desde que dejamos nuestras placas de Petri en la estufa, se habrá completado su proceso de incubación y podremos observar si han crecido distintos tipos de colonias bacterianas sobre las mismas. Así pues, pasaremos a realizar los recuentos de colonias obtenidas en las placas duplicadas para dar los resultados, siendo el objetivo final de esta fase cuantificar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro o por

gramo de alimento como ya comentamos anteriormente en el apartado 'materiales y métodos'. Para ello, utilizaremos un par de fórmulas sencillas:

$$UFC/ml: \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen (0,1 ml)}}$$

$$UFC/g: \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución} \times 10}{\text{Volumen (0,1 ml)}}$$

Cabe destacar, que en la ecuación 'UFC/g' multiplicamos por diez a diferencia de en la ecuación 'UFC/ml', debido a que partiremos de la mezcla realizada entre el alimento sólido (5 gramos) y la solución salina (45 ml) a diferencia de para los productos líquidos en los que nuestra 'dilución 0' era el alimento en sí mismo.

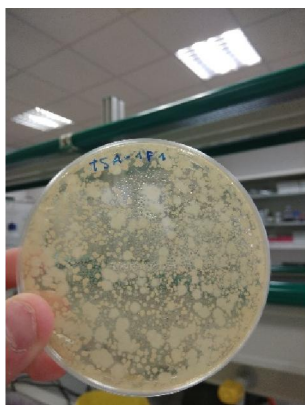
Dicho esto, a continuación se muestran los recuentos finales obtenidos en este ensayo experimental:

Alimentos	UFC/ml o UFC/g
Calostro	1,49×10⁵
Leche desnatada	3,30×10⁵
Leche semidesnatada	-
Leche de dos semanas	2,88×10³
Yogurt	-
Queso mezcla	4,95×10⁶
Queso en barra	3,91×10⁵
Queso curado reserva	Despreciable
Queso fresco 1	6,50×10⁷
Queso fresco 2	2,14×10⁸

Tabla 1 Recuento en medio TSA.

A la vista de los resultados, podemos observar que en este medio TSA hay un crecimiento bacteriano considerable, a excepción de en la muestra de yogurt, leche semidesnatada y queso curado reserva, en los cuales encontramos un número inferior a 30 colonias en las placas, por lo que lo consideraremos despreciable. Por otro lado, este suceso es lógico puesto que este es un medio general que permite el desarrollo de una gran diversidad de microorganismos con variada morfología, ya que aparecieron colonias de diferentes tamaños (*imagen A*) y colores,

predominando el tono amarillento, aunque se encontraron también colonias de tono más anaranjado (*imagen B*).



A): diversidad colonial en placa de TSA



B): colonias anaranjadas en placa de TSA

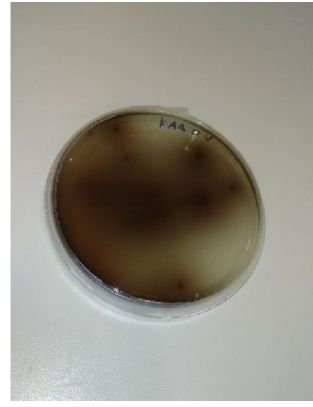
Alimentos	UFC/ml o UFC/g
Calostro	-
Leche desnatada	-
Leche semidesnatada	-
Leche de dos semanas	-
Yogurt	-
Queso mezcla	-
Queso en barra	$7,05 \times 10^3$
Queso curado reserva	-
Queso fresco 1	Despreciable
Queso fresco 2	$5,20 \times 10^4$

Tabla 2 Recuento en medio KAA.

En el medio KAA, apreciamos un crecimiento no muy notable e incluso inexistente en el caso de los productos lácteos líquidos, encontrándolo solo en el queso en barra de vaca y los quesos frescos 2 y 1, éste último despreciable puesto que hallamos muy pocas colonias. Así mismo, estas colonias son típicas del crecimiento de enterococos y se presentan con un color negro capaz de oscurecer toda la placa cuando aparecen en gran número (*imagen C*). También, éstas se presentan de dos tipos distintos, siendo uno de ellos de un tono ligeramente más claro que el otro (*imagen D*).



C): placa de KAA oscurecida

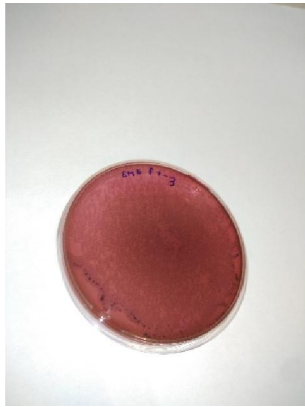


D): diversidad colonial en placa de KAA

Alimentos	UFC/ml o UFC/g
Calostro	-
Leche desnatada	-
Leche semidesnatada	-
Leche de dos semanas	-
Yogurt	-
Queso mezcla	-
Queso en barra	$7,24 \times 10^4$
Queso curado reserva	-
Queso fresco 1	$> 3,00 \times 10^7$
Queso fresco 2	$> 3,00 \times 10^7$

Tabla 3 Recuento en medio EMB

El crecimiento que podemos encontrar en el medio EMB, al igual que en el medio KAA, es inexistente en los distintos tipos de leche, pero muy considerable en los dos tipos de queso fresco y en barra de vaca, ya que pese a haber realizado nuevas diluciones con un factor -2 y -3, seguimos encontrando más de 300 colonias (*imagen E*). Además, atendiendo a la composición del medio crecerán enterobacterias, encontrando en este caso tres tipos de colonias distintas: ligeramente transparentes, de un color anaranjado y de un color ennegrecido (*imagen F*).



E): crecimiento colonial de queso fresco 1 en medio EMB, dilución -3



F): diversidad colonial en placa de EMB

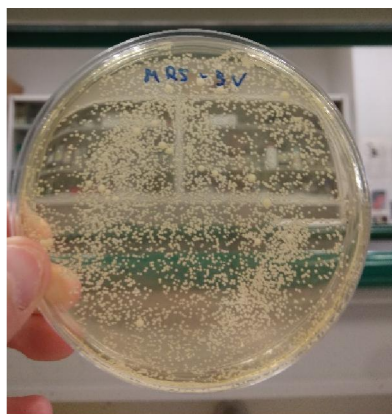
Alimentos	UFC/ml o UFC/g
Calostro	$1,25 \times 10^5$
Leche desnatada	-
Leche semidesnatada	-
Leche de dos semanas	Despreciable
Yogurt	-
Queso mezcla	$2,96 \times 10^6$
Queso en barra	$> 3,00 \times 10^7$
Queso curado reserva	$5,25 \times 10^5$
Queso fresco 1	$> 3,00 \times 10^7$
Queso fresco 2	$2,22 \times 10^5$

Tabla 4 Recuento en medio MRS.

En el medio MRS, podemos observar un gran crecimiento de colonias de bacterias lácticas entre las que encontramos pequeñas colonias que pueden ser de dos tipologías diferentes, siendo uno de ellos de un color ligeramente más claro que el otro (*imagen G*). Ahora bien, en los diversos tipos de queso este crecimiento es especialmente abundante, particularmente en el queso en barra de vaca y el queso fresco 1, en los cuales a pesar de haber realizado diluciones -2 y -3, siguen apareciendo más de 300 colonias en sus respectivas placas (*imagen H*). Por otro lado, para nuestros productos lácteos y el yogurt no encontramos un crecimiento notable (en la leche de dos semanas en producción aparecieron 3-4 colonias) a excepción de en calostro, donde se observa un crecimiento similar al de los quesos.



G): diversidad colonial en medio MRS



H): crecimiento colonial de queso en barra en medio MRS, dilución -3

Alimentos	UFC/ml o UFC/g
Calostro	$6,50 \times 10^3$
Leche desnatada	-
Leche semidesnatada	-
Leche de dos semanas	$3,75 \times 10^2$
Yogurt	-
Queso mezcla	-
Queso en barra	$4,70 \times 10^3$
Queso curado reserva	Despreciable
Queso fresco 1	-
Queso fresco 2	-

Tabla 5 Recuento en medio V-J.

Finalmente en el medio V-J nos encontraremos con un crecimiento escaso y solo presente en algunos de los alimentos utilizados, llegando a ser despreciable en el caso del queso curado reserva ya que solo aparecieron un par de colonias. Además, pese a que la mayoría de las colonias presentan el mismo aspecto (ennegrecido) en las diversas placas de Petri, podemos apreciar como algunas de las que crecieron en calostro exhiben un halo amarillento alrededor (*imagen I*), que en el caso de la leche que llevaba dos semanas en producción, es rosáceo (*imagen J*).



I): colonias con halo amarillento en medio V-J



J): colonias con halo rosáceo en medio V-J

Como podemos comprobar, los recuentos bacterianos realizados sobre estos medios muestran que dependiendo del medio selectivo que haya sido empleado, podremos encontrar variaciones importantes respecto a la cantidad encontrada.

En el medio TSA, podemos observar como en nuestros resultados se aprecia un gran crecimiento bacteriano general en casi todos los alimentos salvo algunas excepciones (mayor en quesos). De igual manera, Haastrup *et al* (2018) nos reafirman la gran capacidad que tiene este medio para fomentar el crecimiento de todo tipo de microorganismos bacterianos, puesto que trabajando con queso 'Danbo' fueron capaces de encontrar una cantidad de en torno a 6.3 log UFC/ml y hasta diecinueve tipos de bacterias distintas.

En cuanto al medio KAA, y al igual que en nuestro experimento, el estudio realizado por Dolci *et al* (2008), reafirma la selectividad del medio KAA, ya que principalmente encontraron alta carga bacteriana en las muestras de queso utilizadas siendo éstas en su gran mayoría poblaciones de enterobacterias.

Por su parte, la investigación llevada a cabo por Al-Gamal *et al* (2019) nos muestra cómo en el medio EMB podemos encontrar colonias de *Escherichia coli*, principal indicadora de contaminación fecal y que puede causar graves patologías en el tracto gastrointestinal, especialmente si se trata de cepas productoras de factores de virulencia específicos que favorezcan la adhesión, la producción de toxinas o la capacidad invasiva de las bacterias. Esta bacteria normalmente suele encontrarse en leche sin pasteurizar o productos frescos pero, a priori, ninguno de los alimentos que hemos analizado presenta signos de esta contaminación al haber una ausencia de crecimiento de colonias de esta especie en el medio de cultivo selectivo.

Además, estudios previos realizados como el de Zamfir *et al* (2006), confirman también la presencia de gran carga bacteriana en leche cruda (sin pasteurizar) y distintos tipos de quesos, principalmente de bacterias del ácido láctico crecidas sobre medios selectivos del tipo del agar MRS. De igual manera, nuestros resultados muestran conclusiones similares, además de no mostrar presencia de estos microorganismos en leches pasteurizadas o yogurt.

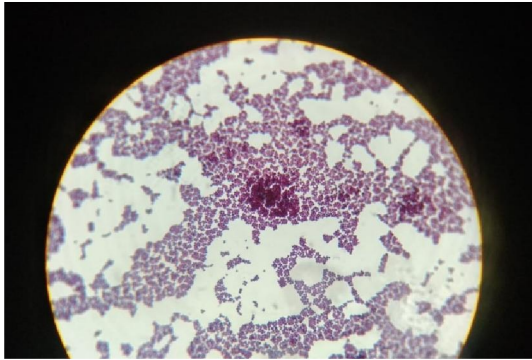
En cuanto al medio V-J, podemos mencionar el experimento realizado por Cassidy *et al* (1989). Ellos evaluaron varios tipos de productos lácteos para descubrir si *Listeria monocytogenes* era capaz de aparecer en muestras de diversos productos alimenticios, entre los que se encontraban varios tipos de lácteos, que se sembraban sobre medio Vogel-Johnson modificado, entre otros, ya que este organismo bacteriano es de interés por sus efectos nocivos tanto para la salud humana como para la industria alimentaria. Sus resultados, indican que este medio es el más fiable y en el que se puede identificar de manera más sencilla colonias de este microorganismo sobre productos lácteos, independientemente del número de colonias aisladas y el alimento analizado.

6.2 Tinción de Gram y prueba de la catalasa

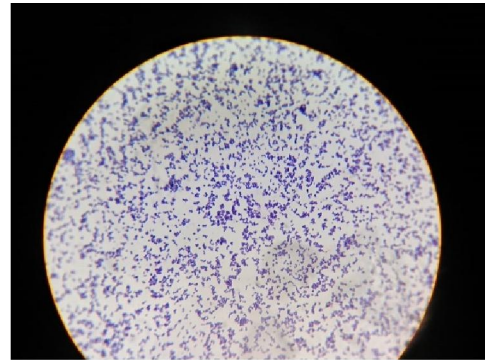
Acabados los recuentos, pasaremos a realizar una identificación preliminar de las colonias seleccionadas por su distinta morfología y crecimiento en diferentes medios (dieciocho) mediante tinciones de Gram y la prueba de la catalasa, ya explicadas anteriormente, y que corroborarán o no nuestras suposiciones sobre los distintos tipos bacterianos obtenidos en los medios selectivos.

6.2.1 TSA

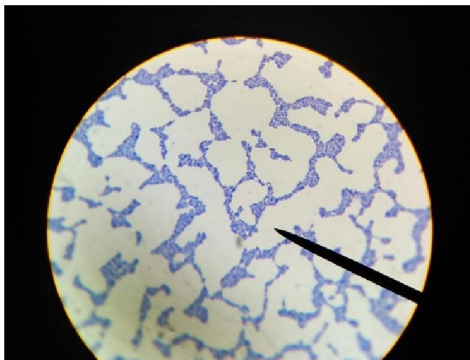
Como ya hemos comentado anteriormente este es un medio general en el que podemos encontrar gran diversidad de microorganismos, por lo que podríamos haber encontrado tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas. Sin embargo, en este caso el único grupo bacteriano hallado fue Gram +.



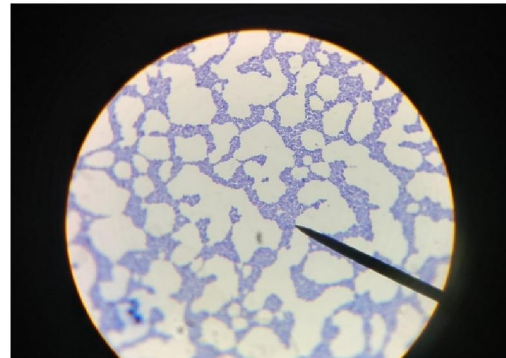
K): estafilococos en racimos Gram + en calostro de medio TSA, dilución -2



L): cocos Gram + en leche desnatada de medio TSA, dilución -3



M): estafilococos Gram + en leche de dos semanas de medio TSA, dilución 0 colonia anaranjada

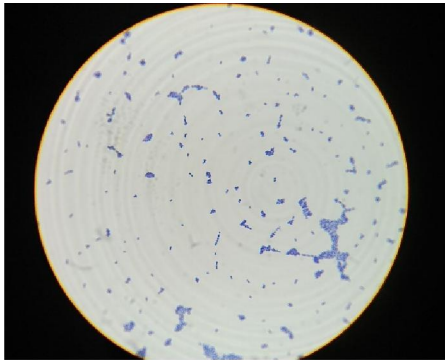


N): estafilococos Gram + en leche de dos semanas de medio TSA, dilución 0 colonia amarillenta

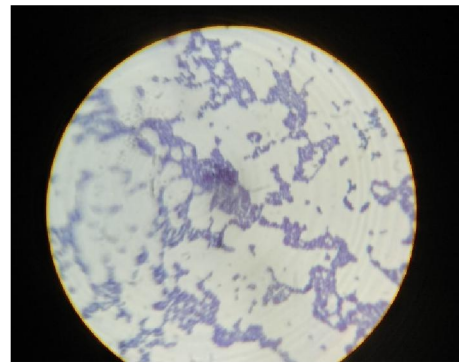
Cabe destacar, que estas dos últimas fotografías a pesar de pertenecer a la misma muestra, provienen de colonias distintas, siendo la primera perteneciente a una colonia de tono anaranjado mientras que la segunda pertenece a una con una tonalidad más clara. Aun así, no se observan diferencias significativas, siendo las dos Gram positivas y catalasa positivas, por lo que podemos presumir que son especies del género *Staphylococcus*. De igual manera, la muestra presentada en la imagen K exhibe las mismas características y puede pertenecer igualmente a este género. Por su parte, la imagen L también pertenece al grupo de bacterias Gram + y es catalasa positiva, sin embargo a diferencia de las demás muestras, son cocos que no se agrupan en racimos.

6.2.2 KAA

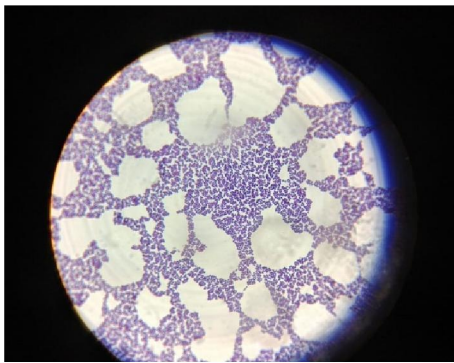
En este medio selectivo, realizamos la tinción esperando diferenciar enterococos, cocos Gram + reunidos en parejas o tétradas, cosa que a pesar del poco crecimiento colonial registrado conseguimos hallar.



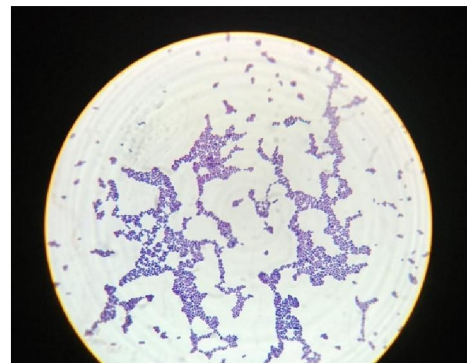
Ñ): cocos Gram + en queso en barra de medio KAA, dilución 0



O): cocos Gram + en queso fresco 1 de medio KAA, dilución 0



P): cocos Gram + en queso fresco 1 de medio KAA, dilución -1 colonia de tonalidad oscura



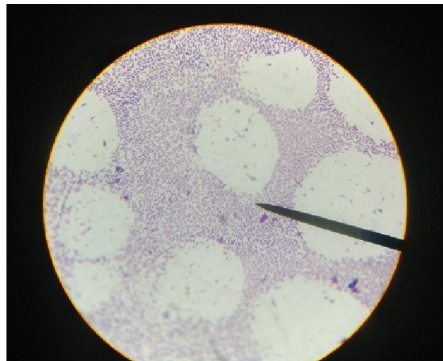
Q): cocos Gram + en queso fresco 1 de medio KAA, dilución -1 colonia ligeramente más clara

Al igual que en el medio anterior, podemos apreciar que aun perteneciendo a la misma muestra, las imágenes P y Q corresponden a distintas colonias bacterianas de cocos Gram +, proviniendo la segunda de una colonia ligeramente menos oscura. Todavía así, no observamos distinciones notables, puesto que ambas son Gram positivas, catalasa negativas y por lo tanto especies que, en este caso al trabajar en medio KAA, presuntivamente pertenecerán al género *Enterococcus*. De igual manera, la colonia que proviene de queso en barra y la que proviene del mismo tipo de queso que las anteriores pero de una dilución distinta cumplen estas características, por lo que pueden pertenecer al mismo género bacteriano.

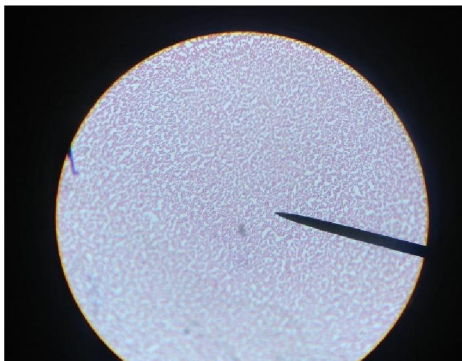
6.2.3 EMB

Nuevamente, en este medio selectivo realizaremos la tinción de Gram esperando distinguir enterobacterias, bacilos o cocobacilos Gram negativos, que al

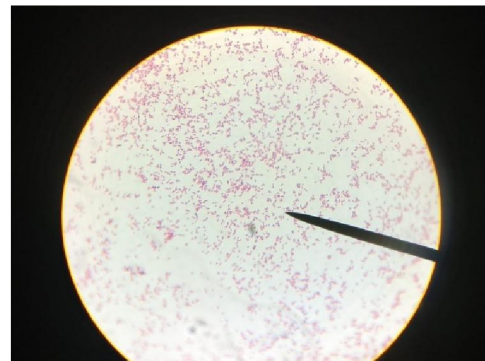
igual que en el medio KAA y a pesar del escaso crecimiento bacteriano conseguimos observar.



R): bacilos Gram – en queso en barra de medio EMB, dilución 0 colonia anaranjada



S): bacilos Gram – en queso en barra de medio EMB, dilución 0 colonia ennegrecida

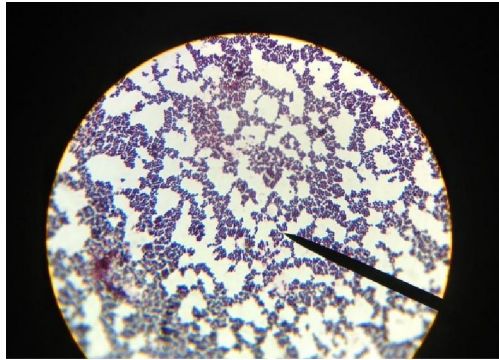


T): cocobacilos Gram – en queso en barra de medio EMB, dilución 0 colonia transparente

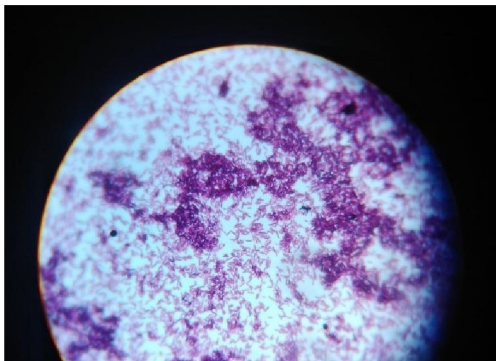
Estas tres imágenes pertenecen a diversas colonias encontradas en la misma placa de Petri incubada, siendo la primera propia de una colonia de tonalidad anaranjada (bacilos), la segunda ennegrecida (bacilos) y la última ligeramente transparente (cocobacilos). Debido a esto, no será necesario realizar la prueba de la catalasa, porque como dijimos anteriormente, es una prueba que solo se realiza en el caso de encontrarnos frente a bacterias Gram positivas y concluiremos que probablemente nos encontramos frente a enterobacterias.

6.2.4 MRS

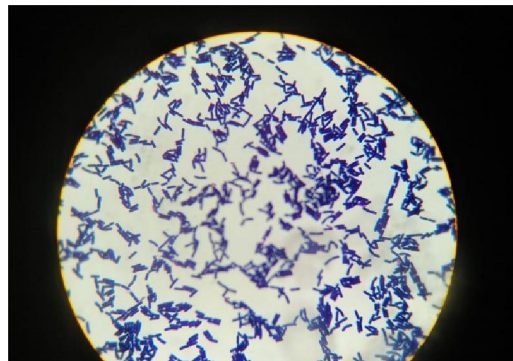
En este medio MRS, confiamos en poder diferenciar bacterias lácticas, concretamente cocos o bacilos Gram positivos tras realizar su correspondiente tinción de Gram.



V): lactococos Gram + en calostro de medio MRS, dilución -2



W): lactobacilos Gram + en queso fresco 2 de medio MRS, dilución -1 colonia de tonalidad ligeramente más clara

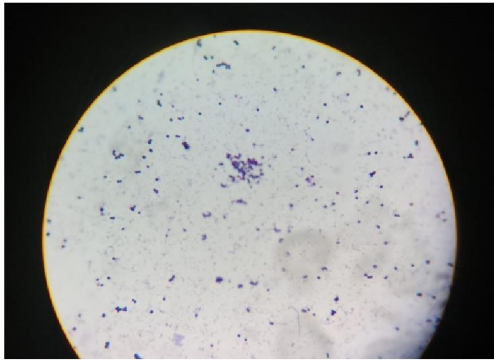


X): lactobacilos Gram + en queso fresco 2 de medio MRS, dilución -1 colonia de tonalidad más sombría

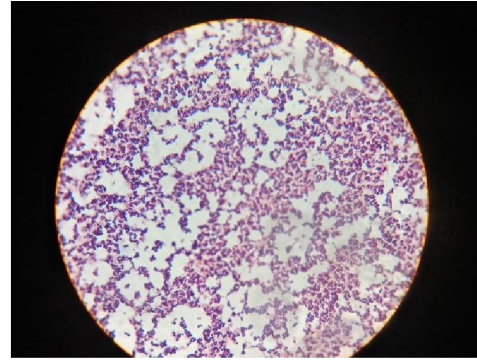
De la misma manera que en medios anteriores, las últimas dos imágenes corresponden a colonias diferentes procedentes de la misma muestra y que no exhiben alguna evidencia de diferencias entre ellas puesto que ambas son Gram positivas y catalasa negativas, por lo que podemos presumir que pertenecen al grupo de las bacterias lácticas, concretamente al de lactobacilos. Por su parte, la colonia analizada proveniente de calostro es Gram positiva, sin embargo, el resultado de la prueba de la catalasa resultó positivo y el análisis microscópico nos permite apreciar diferencias morfológicas respecto al de las dos colonias anteriores, suponiéndose así su pertenencia al género *Lactococcus*.

6.2.5 V-J

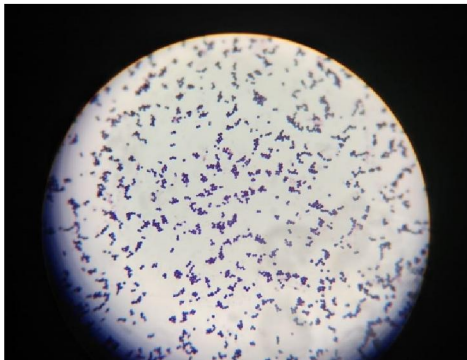
Finalmente, en este medio selectivo realizaremos la tinción de Gram con la expectativa de diferenciar estafilococos, específicamente cocos que se agrupan en racimos.



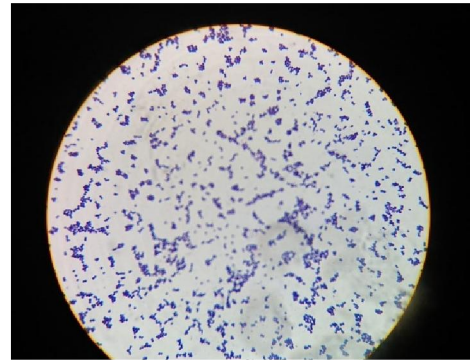
Y): cocos Gram + queso en barra de medio V-J, dilución 0 colonia sin halo



Z): cocos Gram + en leche de dos semanas de medio V-J, dilución 0 colonia con halo rosa



A2): cocos Gram + en calostro de medio V-J, dilución -1 colonia con halo amarillento



B2): cocos Gram + en calostro de medio V-J, dilución -1 colonia sin halo

En esta ocasión, nos encontramos con que las imágenes A2 y B2 corresponden a colonias que se ubicaban en la misma placa y que tenían una morfología aparente diferente. Aun así, tras realizar la prueba de la catalasa y tinciones de Gram, podemos corroborar que nos encontramos ante colonias típicas del género *Staphylococcus* puesto que las dos son Gram positivas y catalasa positivas. De igual manera, las dos imágenes anteriores a estas pueden corresponder también a este grupo al presentar los mismos resultados en sus respectivas pruebas.

Para finalizar este apartado, comentar que se han aislado los tipos de microorganismos bacterianos que eran de esperar en cada medio atendiendo a las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, diremos que el medio TSA contiene un sustrato muy general, que puede ser utilizado por gran cantidad de microorganismos bacterianos para su crecimiento. Aun así, tras observar nuestras colonias, podemos clarificar que al menos tres de ellas podrían pertenecer al género *Staphylococcus* al presentar

caracteres propios del mismo, mientras que las restantes no entrarían en este grupo al mostrarse como cocos que no se agrupan en racimos.

El medio KAA es indicado para el aislamiento de estreptococos pertenecientes al grupo D de Lancefield, siendo estos principalmente del género *Enterococcus*. Así pues, podemos apreciar cómo en nuestras muestras hallamos cocos Gram + que, en teoría, pertenecen a este grupo, asumiendo así que su aparición es correcta.

En cuanto al medio EMB, favorece el crecimiento de coliformes, grupo bacteriano entre los que podemos encontrar los géneros *Escherichia* o *Enterobacter*. Nuestros resultados podrían incluirse dentro de este grupo debido a sus características, aunque eso sí, excluyendo la presencia de *Escherichia coli*, ya que ninguna de las colonias presentaba el color verde brillante característico de este género.

Por otro lado, el medio de cultivo MRS es apropiado para la detección de lactobacilos, lactococos y otras bacterias del ácido láctico. Por ello, y como en casos anteriores, presuponemos que efectivamente aparecieron los microorganismos indicados en las instrucciones del fabricante para este medio al observar nuestros resultados, ya que encontramos colonias Gram + propias de estos géneros.

Por último, el medio V-J es apropiado principalmente para la identificación y aislamiento de estafilococos. De esta manera y observando nuestras colonias bacterianas y sus características, podremos asumir casi con total seguridad que pertenecen a este género.

6.3 Antibiograma

Finalmente, pasadas 24 horas desde que pusimos nuestras placas con los discos de antibiótico en la estufa, comentaremos los resultados obtenidos tras la realización del antibiograma.

Para evaluar los resultados se ha realizado una clasificación en tres grupos con halos de hasta 14 milímetros (más resistentes), comprendidos entre 16 y 22 milímetros (sensibilidad intermedia) y mayores de 22 milímetros (muy sensibles).

Cepa aislada/Medio de Origen	Gentamicina	Eritromicina	Ampicilina
1/TSA	20	22	2
2/TSA	10	26	0
3/TSA	16	26	10
4/TSA	16	10	12
5/MRS	20	8	14
6/V-J	18	6	10
7/V-J	26	24	4
8/V-J	8	24	6
9/V-J	28	24	8
10/MRS	26	10	14
11/MRS	14	12	8
12/EMB	16	6	10
13/EMB	16	24	4
14/EMB	10	22	4
15/KAA	22	24	8
16/KAA	24	8	14
17/KAA	18	10	14
18/KAA	12	6	12

Tabla 6 Halos de inhibición de crecimiento en mm obtenidos tras incubar las cepas aisladas con los discos de antibióticos.

Así pues, las mayores resistencias se han encontrado frente a ampicilina, un antibiótico que pertenece al grupo de los beta-lactámicos y frente al que solo mostraron una sensibilidad considerable las cepas número 5 y 10, ambas aisladas en el medio MRS, así como las cepas 16 y 17, aisladas de medio KAA. Este resultado era de esperar, puesto que la producción de enzimas capaces de degradar este tipo de antibióticos está ampliamente extendida en diversos géneros bacterianos como pueden ser *E. coli* (Caveney *et al.*, 2019) y *Streptococcus pneumoniae* (Hakenbeck *et al.*, 2012).

Por otro lado, en el caso de la gentamicina, nos encontramos con las mayores tasas de sensibilidad de los tres antimicrobianos estudiados. En este antibiótico, incluido en el grupo de los aminoglucósidos, podemos detectar numerosas cepas que presentan una sensibilidad alta o intermedia al mismo, como pueden ser las número 1, 3 y 4, aisladas en medio TSA, las número 5 y 10, las número 6,7 y 9, identificadas en medio V-J, las cepas 12 y 13, aisladas en medio EMB y las cepas 15, 16 y 17, crecidas en el medio KAA. Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, también existen mecanismos enzimáticos plasmídicos de inactivación y modificación que confieren resistencia microbiana a este grupo de antibióticos, así como

mecanismos relacionados con mutaciones cromosómicas, modificaciones en la permeabilidad de membrana y bombas de eflujo o exporte (Daza., 1998) (Ramirez *et al.*, 2010) (Doi *et al.*, 2016), que parecen no estar desarrollados en las cepas aisladas.

Finalmente, en cuanto a la eritromicina, antibiótico perteneciente a la familia de los macrólidos, pudimos aislar algunas cepas que presentan tanto sensibilidad alta como intermedia a este compuesto, empezando por las cepas 1,2 y 3, las cepas 7,8 y 9, la número 13 y las número 14 y 15. Además, de igual manera que en los dos antibióticos anteriormente vistos, existen mecanismos de resistencia bacteriana a macrólidos descritos en la introducción y bibliografía, entre los que podemos destacar sistemas de exclusión o exporte activos, mutaciones y metilaciones plasmídicas (rechazo de la unión antibiótico-ribosoma 50S) y producción de enzimas transferasa (Daza., 1998) (Massip *et al.*, 2017) (Lee *et al.*, 2017) (Fong *et al.*, 2017). Cabe destacar, que a día de hoy los mecanismos de resistencia a antibióticos desarrollados por algunas bacterias suponen un grave problema de salud pública al proporcionar resistencia frente a un amplio grupo de antibióticos, incluyendo beta-lactámicos (Bush, K., 2018) (Livermore., 1995), aminoglucósidos (Becker *et al.*, 2013) y macrólidos (Kiser *et al.*, 2019), por lo que el estudio de desarrollo de resistencias a antibióticos en bacterias aisladas de alimentos es de gran interés es la consideración de la cadena alimentaria como una posible vía de transmisión de dichas resistencias.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos extraer tras comprobar nuestros resultados son:

1. Se ha detectado crecimiento microbiano en medio no selectivo (TSA) en todas las muestras de alimentos lácteos analizadas, excepto en leche semidesnatada y yogurt.
2. Sólo se ha obtenido crecimiento microbiano en medios selectivos para enterococos (medio KAA) o enterobacterias (medio EMB) en las muestras de queso en barra y queso fresco.
3. En medio selectivo para bacterias lácticas (MRS) se detectó crecimiento para todos los tipos de quesos analizados, así como en la muestra de calostro,

obteniéndose recuentos menores y sólo en algunas de las muestras analizadas en medio selectivo para estafilococos (V-J).

4. La carga y diversidad microbiana fue considerablemente mayor en productos lácteos fermentados que en los no sometidos a fermentación.
5. Tras una identificación preliminar, se concluye que las cepas aisladas en los diferentes medios selectivos empleados corresponden a los grupos de interés alimentario que cabía esperar (enterococos en medio KAA, estafilococos en V-J, enterobacterias en EMB y bacterias lácticas en medio MRS).
6. Los mayores índices de resistencia a antibióticos en las cepas aisladas de alimentos lácteos se detectaron frente a ampicilina, seguida de eritromicina y por último gentamicina, frente a la que se observó la mayor sensibilidad entre las cepas estudiadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, M., & Collins, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* 75 (2): 95-107.
- Al-Gamal, M.S., Ibrahim, G.A., Sharaf, O.M et al. 2019. The protective potential of selected lactic acid bacteria against the most common contaminants in various types of cheese in Egypt. *Heliyon* 5(3): e01362.
- Almena-Aliste M, Mietton B. 2014 Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiol Spectr* 2(1): CM-2012.
- Appel, G.B. 1978. Gentamicin in 1978. *Annals of Internal Medicine* 89(4): 528.
- Ares Cea, J.L. 2002. Calidad de los quesos: Fundamentos y aspectos generales. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 15: 133-159.
- Becker, B & Cooper, M.A. 2013. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol* 8(1): 105-115.
- Boor, K.J., Wiedmann, M., Murphy, S., & Alcaine, S. 2017. A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science* 100 (12): 9933–9951.
- Boza, J. & Sanz Sampelayo, M.R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 10: 109-139.

- Brittain, D.C. 1987. Erythromycin. *Medical Clinics of North America* 71(6): 1147–1154.
- Bush, K. 2018. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(10): e01076-18.
- Cassidy, P.K., Brackett, R.E., Beuchat, L.R. 1989. Evaluation of three newly developed direct plating media to enumerate *Listeria monocytogenes* in foods. *Appl Environ Microbiol* 55(6): 1645-1648.
- Caveney, N.A., Caballero, G., Voedts, H et al. 2019. Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Nat Commun* 10(1): 1849.
- Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C., & Vila, J. 2009. Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(7): 412-418.
- Davies, M., Morgan, J.R., & Anand, C. 1975. Interactions of Carbenicillin and Ticarcillin with Gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7(4): 431–434.
- Daza, R.M.1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 22: 57-67
- Deng, M.Q., & Cliver, D.O. 1999. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. *International Journal of Food Microbiology.* 46(2): 113–121.
- De Oliveira, T.M.L., Guedes, M.I.M.C., Rehfeld, I. S., Matos, A.C.D., Rivetti Júnior, A.V., da Cunha, A.F., & Lobato, Z.I.P. 2017. Vaccinia virus detection in dairy products made with milk from experimentally infected cows. *Transboundary and Emerging Diseases* 65(1): 40–47.
- Doi, Y., Wachino, J.I., & Arakawa, Y. 2016. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 30(2): 523-537.
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K & Cocolin, L. 2008. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 25(2): 392-399.
- Ebringer, L., Ferenčík, M., & Krajčovič, J. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. Review. *Folia Microbiologica* 53(5): 378–394.
- Fisberg, M., & Machado, R. 2015. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews* 73(suppl 1): 4–7.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H. 2017. *Fundamentals of Cheese Science*. Springer. pp. 1-30.

- Fong, D.H., Burk, D.L., Blanchet, J., Yan, A.Y., & Berghuis, A.M. 2017. Structural Basis for Kinase-Mediated Macrolide Antibiotic Resistance. *Structure* 25(5): 750-761.e5.
- Gómez, A., Divier A., & Bedoya Mejía, O. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación* 2(1): 38-42.
- Goulding, A., Rockell, J.E.P., Black, R.E., Grant, A.M., Jones, I.E., & Williams, S.M. 2004. Children who avoid drinking cow's milk are at increased risk for prepubertal bone fractures. *Journal of the American Dietetic Association* 104 (2): 250–253.
- Gribble, M.J., & Chow, A.W. 1982. Erythromycin. *Medical Clinics of North America* 66(1): 79–89.
- Haastrup, M.K., Johansen, P., Malskaer, A.H et al. 2018. Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *Int J Food Microbiol* 285: 173-187.
- Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D & Maurer, P. 2012. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol* 7(3): 395-410.
- Kiser, T.H., Reynolds, P.M., Moss, M et al. 2019. Impact of Macrolide Antibiotics on Hospital Readmissions and Other Clinically Important Outcomes in Critically Ill Patients with Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Propensity Score-Matched Cohort Study. *Pharmacotherapy* 39(3): 242-252.
- Lee, H., Yun, K.W., Lee, H.J., & Choi, E.H. 2017. Antimicrobial therapy of macrolide-resistant. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 16(1): 23–34.
- Livermore, D.M. 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8(4): 557-584.
- Massip, C., Descours, G., Ginevra, C., Doublet, P., Jarraud, S & Gilbert, C. 2017. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump. *J Antimicrob Chemother* 72(5): 1327-1333.
- McLaughlin, J.E., & Reeves, D. S. 1971. Clinical and laboratory evidence for inactivation of gentamicin by carbenicillin. *The Lancet* 297(7693): 261–264.
- Mercogliano, R., & Santonicola, S. 2018. Investigation on bisphenol A levels in human milk and dairy supply chain: A review. *Food and Chemical Toxicology* 114: 98–107.

- Rafailidis, P.I., Ioannidou, E.N., & Falagas, M.E. 2007. Ampicilin/Sulbactam. *Drugs* 67: 1829-1849.
- Ramirez, M.S., & Tolmasky M.E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13(6):151-171.
- Sarasola, P., & McKellar, Q.A. 1994. Ampicillin and its congener prodrugs in the horse. *British Veterinary Journal* 150(2): 173–187.
- Tunick, M.H., & Van Hekken, D.L. 2014. Dairy Products and Health: Recent Insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(43): 9381-9388.
- Turck, D. 2013. Cow's Milk and Goat's Milk. *Evidence-Based Research in Pediatric Nutrition* 108: 56–62.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L et al. 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst Appl Microbiol* 29(6): 487-495.

8.1 Normativa consultada

- Orden PRE/1313/2002, de 3 de junio, por la que se modifica la norma de calidad para el yogur o yoghurt destinado al mercado interior, aprobada por Orden de 1 de julio de 1987.
- Real Decreto 179/2003, por el que se aprueba la norma de calidad para el yogur o yoghurt (Boletín Oficial del Estado núm. 42, de 18/02/2003).
- 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.
- ISO 11133:2014. Microbiology of food animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO/TS 22964 (2006) Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*.
- ISO STANDARD 21150 (2006) Cosmetics. Microbiology – Detection of *Escherichia coli*.
- ISO norma 22718 (2006) Cosmetics. Detection of *Staphylococcus aureus*.

- CLSI (2006) Document M6-A2. Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton Agar. Approved Standard. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania. USA.
- CLSI (2006) Document M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved Standard. 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania. USA.