

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**



*Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral
para la obtención del grado académico de
Especialización en Ciencia y Tecnología de la Leche y Productos Lácteos*

**“DEFECTOS GASÓGENOS EN QUESOS PROVOCADOS POR
MICROORGANISMOS”**

Tesista:

Apellido y Nombre: Fontaneto Apoca, Adrián Roque

Título: Ingeñero Químico

Tutora:

Apellido y Nombre: Binetti, Ana G.

Título: Doctora en Química

Lugar de trabajo:

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) (UNL-CONICET)

Índice

I. Introducción	5
II. Objetivos generales	5
III. Desarrollo	6
1. Principales grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos	7
2. Caracterización de los diferentes ojos producidos por microorganismos	8
3. Fenómenos que ocurren durante la formación de ojos	9
4. Factores que afectan la formación de ojos en el queso	10
5. Tipos de defectos gasógenos en quesos	13
5.1 Generación de gas temprano (Hinchazón Precoz)	14
5.2 Generación de gas tardío (Hinchazón Tardía)	14
6. Posibles vías de ingreso de microorganismos a la leche en el tambo	15
6.1 Contenido de bacterias en la leche antes de la secreción	17
6.2 Contaminación postsecretoria	17
7. Microorganismos causantes del defecto de Hinchazón Precoz	18
7.1 Bacterias coliformes	18
7.1.1 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón precoz causado por bacterias coliformes	19
7.2 Levaduras	20
7.2.1 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón precoz causado por levaduras	21
8. Microorganismos causantes del defecto de Hinchazón Tardía	22
8.1 Bacterias Propiónicas	22
8.1.1 Fermentación propiónica	23
8.2 NSLAB (Non Starter Lactic Bacteria)	24
8.2.1 <i>Leuconostoc</i>	26
8.2.2 Lactobacilos heterofermentantes	27
8.2.2.1 Actividad bioquímica	27
8.2.2.2 Metabolismo del citrato	28
8.2.2.3 Metabolismo de la lactosa y el lactato	29
8.2.3 Origen de las NSLAB en el queso	30
8.2.4 Factores que influyen en la velocidad de crecimiento, el recuento final y la actividad bioquímica de las NSLAB durante la maduración del queso	31
8.2.4.1 Fermento primario o de acidificación	31

8.2.4.2 Factores ambientales	32
8.2.4.3 Sal en la humedad	32
8.2.4.4 Contenido de humedad	33
8.2.4.5 Fuente de energía	33
8.2.5 Desarrollo de NSLAB en el queso	35
8.2.6 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón tardía causado por NSLAB	37
8.2.6.1 Adición de antibióticos	38
8.2.6.2 Empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas	39
8.2.6.3 Modificaciones de temperatura de maduración	40
8.2.6.4 Microfiltración o pasteurización de la leche	41
8.3 Bacilos esporulados aerobios (<i>Bacillus</i>)	42
8.3.1 Generalidades del género <i>Bacillus</i>	42
8.3.2 Contaminación de la leche destinada a elaboración de queso con esporos de <i>Bacillus</i>	45
8.3.3 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón tardía causado por <i>Bacillus</i>	46
8.3.3.1 Control y remoción de biopelículas	48
8.3.3.2 Reducción en el contenido de esporos de <i>Bacillus</i> en la leche destinada a elaboraciones casearias	49
8.3.3.2.1 Bactofugación	49
8.3.3.2.2 Microfiltración	50
8.4 Bacilos esporulados anaerobios (<i>Clostridium</i>)	51
8.4.1 Generalidades del género <i>Clostridium</i>	51
8.4.2 Actividad fermentativa	51
8.4.3 Contaminación de la leche destinada a elaboraciones de quesos con esporos de clostridios	53
8.4.4 Los clostridios y el ensilaje	54
8.4.4.1 Henificación	54
8.4.4.2 Henolaje	54
8.4.4.3 Silaje	55
8.4.5 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón tardía causado por <i>Clostridium</i>	57
8.4.5.1 Ensilaje	57
8.4.5.2 Ordeño	57
8.4.6 Control del desarrollo de bacterias butíricas en queso de pastas semiduro y duro	58

8.4.6.1 Nitrato y control de temperatura de maduración	58
8.4.6.2 Agua oxigenada	60
8.4.6.3 Lisozima	60
8.4.6.4 Formaldehído	60
8.4.6.5 Bactofugación	60
8.4.6.6 Desnatado estático	61
8.4.6.7 Microfiltración	61
8.4.6.8 Empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas	61
8.5 Otras bacterias que pueden causar defectos gasógenos en quesos	65
9. Detección de problemas de defectos gasógenos en quesos de la región	66
10. Posible fuentes de ingreso de microorganismos a las plantas queseras	69
10.1 Calidad del agua utilizada en el proceso	69
10.2 Calidad de aire en sala de elaboración	70
10.3 Higiene de las superficies de los equipos	71
10.4 Higiene en las plantas queseras	71
11. Criterios para diseño sanitario de salas de proceso con el objetivo de minimizar la contaminación microbiológica de los quesos	72
11.1 Estructura interna de las instalaciones	72
10.2 Tratamiento de Aire	74
12. Pasteurización	75
13. Criterios para el diseño sanitario de equipos de proceso con el objetivo de minimizar la contaminación microbiológica de los quesos	80
14. Conclusiones	82
15. Bibliografía	83

I. Introducción

La producción endógena de gas es el principal defecto microbiano que se presenta en las elaboraciones casearias debido a la imposibilidad de corrección, elevada frecuencia de aparición y gran impacto económico, ya que generalmente afecta grandes volúmenes de producción. Las implicancias de este problema son más graves si se tiene en cuenta que puede afectar a una amplia variedad de quesos. La causa se relaciona con la presencia de diferentes bacterias productoras de gas, principalmente bacterias lácticas (BAL) heterofermentantes pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, propionibacterias, clostridios, *Bacillus* y coliformes (Lodi, 1993; Ottogalli, 1968), así como levaduras (Jakobsen y Narvhus, 1996).

Los microorganismos presentes en la leche utilizada en la elaboración de quesos pueden provocar fermentaciones que causan defectos en el queso que, debido a sus similitudes, son difíciles de clasificar e identificar su causa. Aunque el gas (generalmente H₂ y CO₂) puede ser producido a partir de un amplio rango de compuestos presentes en el queso, la lactosa, el lactato, el citrato y la úrea son los principales sustratos de estos microorganismos.

En Argentina, el país de mayor producción quesera en América del Sur, se han detectado en los últimos años numerosos problemas relacionados con la hinchazón de quesos causados por microorganismos muy diversos, con las consecuentes pérdidas económicas (Industria lechera, 1999). Esta realidad enfatiza la relevancia de investigar cuáles son los principales microorganismos responsables de estas alteraciones en quesos a los fines de reducir sus implicancias. Si bien se conocen en gran parte cuáles son dichos agentes microbianos, hasta el momento no se ha encontrado una única solución que minimice los efectos de su presencia, justamente debido a la gran diversidad de microorganismos y quesos en los que se detectan estas alteraciones (Jakobsen y Narvhus, 1996; Reinheimer y col., 1995). De aquí la importancia de la búsqueda de información actualizada relacionada con esta temática para ser plasmada en el presente Trabajo Final Integrador (TFI).

II. Objetivos generales

Los objetivos del presente TFI son:

- realizar una búsqueda bibliográfica relativa a los defectos gasógenos producidos por los microorganismos en quesos;
- comparar resultados informados por distintos autores;

- analizar las posibles estrategias para minimizar los defectos y proponer posibles aplicaciones en la industria láctea para mejorar esta situación.

III. Desarrollo

En la Figura 1 se ilustra, a modo de resumen, la tipología de los defectos que se pueden encontrar en los quesos.

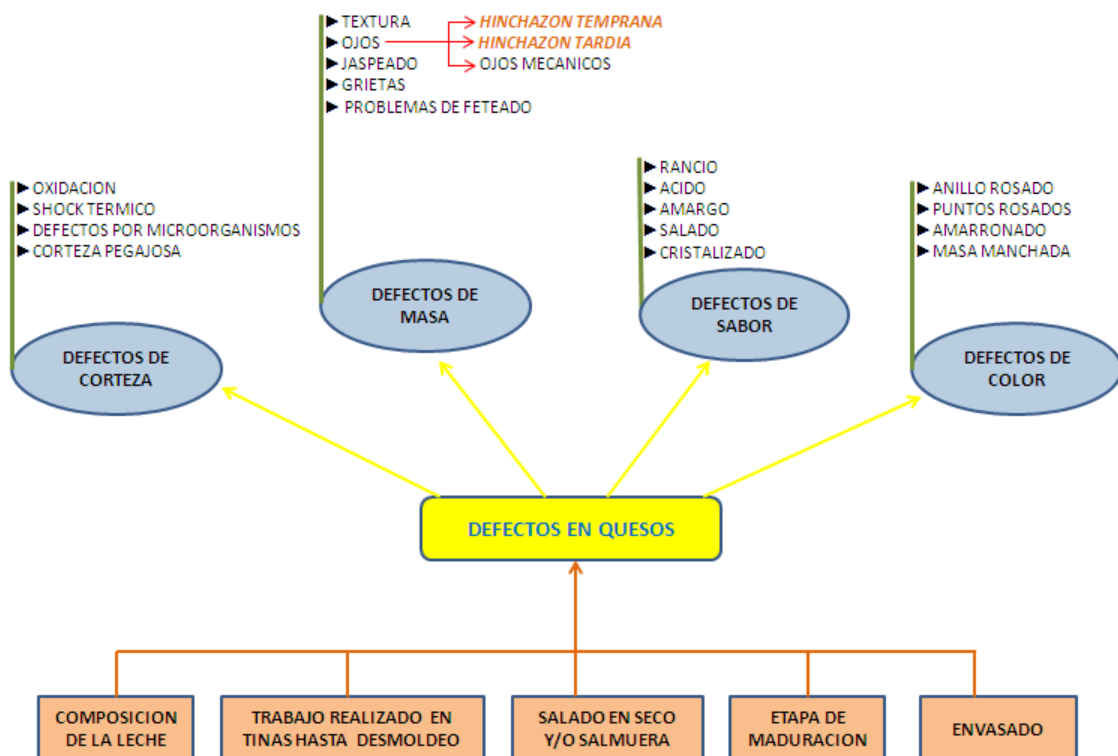


Figura 1 – Esquema de la tipología de defectos encontrados en quesos.

Si bien son numerosos los tipos de defectos que pueden estar presentes en los quesos así como los factores determinantes de los mismos, este TFI abordará los defectos causados en la masa, responsables de la aparición de ojos como consecuencia de la producción de gas por parte de microorganismos indeseables (hinchazón temprana y tardía).

1. Principales grupos microbianos responsables de la producción de gas en quesos

En la Tabla 1 se resumen los diferentes grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos, así como los sustratos involucrados y los gases producidos en cada caso (Mullan, 2000).

Tabla 1 - Principales grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos.

GRUPO MICROBIANO / ESPECIE	SUSTRATO	TIPO DE DEFECTO SEGÚN EL MOMENTO DE MANIFESTACIÓN	PRODUCTOS GASEOSOS
Coliformes	Lactosa	Hinchazón Precoz	CO ₂ , H ₂
Levaduras	Lactosa	Hinchazón Precoz	CO ₂
Lactobacilos: <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Citrato Lactato	Hinchazón Precoz y Tardía	CO ₂ CO ₂
<i>Leuconostoc</i> : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc dextranicum</i>	Lactosa / Citrato Lactosa / Citrato	Hinchazón Precoz y Tardía	CO ₂ CO ₂
Bacterias Propiónicas: <i>Propionibacterium shermani</i>	Lactato	Hinchazón Tardía	CO ₂
<i>Bacillus</i> : <i>Bacillus subtilis</i>	Lactosa	Hinchazón Tardía	CO ₂ , H ₂
Clostridios: <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Lactato	Hinchazón Tardía	CO ₂ , H ₂
Otras bacterias que, ocasionalmente, pueden causar defectos gasógenos: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Citrato Urea	Hinchazón Precoz y Tardía Hinchazón Tardía	CO ₂

Las actividades bioquímicas (incluyendo la producción de gas) de los lactobacilos heterofermentantes, *Leuconostoc* y bacterias propiónicas son deseables solamente en ciertos tipos de quesos (tipo holandeses: Gouda y Edam; tipo suizos: Gruyere, Fontina; tipo argentino: Pategrás), resultando indeseables en otras variedades o cuando el crecimiento bacteriano se torna exagerado.

El desarrollo de bacterias propiónicas en quesos duros (de larga maduración como Reggianito, Grana, Provolone, etc.) puede ser el origen de hinchazón tardía. *Clostridium tyrobutyricum* es el principal responsable de defectos de hinchazón tardía en quesos holandeses (Gouda y Edam) y quesos duros italianos (Grana y Parmigiano) (Ingham y col., 1998). Las levaduras pueden ocasionar defectos en leches fermentadas y quesos, produciendo gas, aromas frutados, decoloraciones y cambios en la textura. Asimismo, elevadas concentraciones de levaduras en cultivos naturales de suero han sido vinculadas con problemas de hinchazón precoz en quesos duros argentinos (Reinheimer y col., 1995).

2. Caracterización de los diferentes ojos producidos por microorganismos

El tipo de ojos presentes en la pasta de un queso es una característica indicativa tanto de la calidad microbiológica de la leche de partida como de la tecnología aplicada en la elaboración del queso (Figura 1). En el primer caso el origen es el gas producido durante las fermentaciones de determinados tipos de microorganismos y, en general, estos ojos suelen ser redondeados, lisos y de diferentes dimensiones (desde el tamaño de una cabeza de alfiler con humedad en su interior, en el caso de las bacterias coliformes, hasta el de un garbanzo, propio de bacterias termófilas). En el caso de los ojos producto del desarrollo de levaduras, los tamaños rondan entre 2 y 4 mm de diámetro y su interior es brillante y liso, y presentan aromas frutales característicos. Cuando los ojos son causados por bacterias heterofermentantes, los tamaños son de 1 mm o mayores, presentan forma redondeada y el interior es liso y brillante sin presencia de humedad.

Además, en la masa del queso se pueden presentar grietas más o menos profundas producidas por bacterias del género *Clostridium*, con generación de olores y sabores desagradables. Por su parte, los ojos producidos mecánicamente por el tipo de elaboración suelen aparecer por un exceso de calentamiento de los granos de cuajada o un insuficiente prensado de los mismos, impidiendo la correcta compactación de la pasta. Por ello, se producen pequeñas cámaras de aire en el interior del queso que son aberturas redondeadas, de borde o superficie irregular, que se denominan “ojos mecánicos”. También se pueden producir grietas profundas, verticales u horizontales en número escaso, que resultan de un enfriamiento de la cuajada durante el moldeo y/o una incorrecta maduración o conservación del producto. Por otro lado, si la distribución de los granos de cuajada en los moldes se hace en presencia de suero, se pueden formar “burbujas” que luego se transformaran en ojos redondeados causados por acumulación de CO₂. Si la distribución de la cuajada en los

moldes se hace sin suero, en los intersticios queda aire que resulta en la formación de agujeros de formas y tamaños irregulares.

La pasta de un queso elaborado con leche pasteurizada a la que no se le han adicionado microorganismos para la producción de ojos debe ser cerrada, puede haber algunos orificios pequeños de contorno irregular que serían de origen mecánico, obtenidos como consecuencia del trabajo con la cuajada y el prensado, a diferencia de los ojos de origen microbiano que son de contorno uniforme. Existirán aberturas (ojos) cuando la fase acuosa del queso esté saturada en CO₂, y la producción de CO₂ sea superior a la difusión hacia el exterior del queso. Dicha contribución del CO₂ a la apertura de los quesos dependerá de los siguientes factores:

- velocidad de formación;
- solubilidad dentro de la pasta del queso en función de la temperatura (el CO₂ es 50% más soluble a 10 °C que a 20 °C y 100% más soluble a pH 4,8 que a 5,2);
- tasa de difusión hacia el exterior del queso.

3. Fenómenos que ocurren durante la formación de ojos

El proceso de generación gaseosa en los quesos depende de varios factores como ser: tipo de fermento iniciador, tipo de fermento adjunto, pH, tratamiento térmico de la cuajada, salado, temperatura de maduración, etc., pudiendo todos ellos influir en la formación, tamaño y distribución de los ojos.

A continuación se muestran las diferentes fermentaciones que dan lugar a la formación de gas y pueden ocurrir durante las etapas de maduración en un queso:

Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris

Lactosa \longrightarrow CO₂ + Lactato + Alcohol

Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris

Citrato \longrightarrow CO₂ + Ácido acético + Acetoína

Lactobacilos heterofermentantes

Lactosa \longrightarrow CO₂ + Lactato, etc.

Coliformes

Lactosa \longrightarrow CO₂ + Lactato + Ácido acético, etc.

Bacterias propiónicas (BAP)

Lactato \longrightarrow CO₂ + Ácido propiónico + Ácido acético, etc.

Clostridium tyrobutyricum

Lactato \longrightarrow CO₂ + H₂ + Ácido butírico, etc.

Lactobacillus casei

Lactato + O₂ \longrightarrow CO₂ + Lactato, etc.

Levaduras

Glucosa \longrightarrow CO₂ + Alcohol

Streptococcus thermophilus

Úrea \longrightarrow CO₂ + NH₃

4. Factores que afectan la formación de ojos en el queso

La formación de los ojos depende de: el tiempo, la cantidad, la intensidad y velocidad de producción de CO₂ y/o H₂, la cantidad y distribución de los puntos débiles en la estructura casearia, ya sea provocados por microestructuras sólidas o pequeñas aberturas mecánicas (Steffen y col., 1993).

La formación física de burbujas de gas y la solubilidad determinan el nivel en el que el CO₂ y/o H₂ se disocian de la solución que forman con el agua contenida en la estructura casearia. Tomando como ejemplo para nuestro estudio el CO₂, esta disociación se produce a una concentración de CO₂ considerablemente inferior a la concentración teórica de saturación dentro de queso (36 mmol/kg), y este hecho

explica por qué la formación de los ojos en quesos tipo Emmental y Gouda se inicia con concentraciones de CO₂ del orden de 18 mmol/kg (Kosikowski y col., 1997).

En relación a la presión de CO₂ y su velocidad de difusión, la presión de gas será superior a la saturación. El pH y la temperatura de maduración tienen un efecto significativo en la saturación. Además, la velocidad de generación de CO₂ determina si el gas evolucionará de la solución como una pequeña burbuja o pasará a formar parte de otra burbuja para ampliar el tamaño (Kosikowski y col., 1997)

El cuerpo y textura del queso están en estrecha relación con el pH de la cuajada (Figura 2), el contenido de humedad y grasa, la quimosina residual, etc. Además, el pH del queso juega un papel importante en la determinación de la flora predominante y su actividad (Lawrence y col., 1983).

La nucleación determina predominantemente el número de agujeros y la consistencia del queso determina su forma; ambas dependen de la velocidad de producción de gas. Cuando la generación de CO₂ es demasiado rápida, el gas no alcanza a migrar a un lugar favorable (una burbuja existente, por ejemplo) y se crean, por lo tanto, muchos agujeros pequeños. De lo contrario, velocidades más lentas de generación de CO₂ combinado con la consistencia del queso, que permite un flujo viscoso de su estructura, da origen al desarrollo de grandes agujeros esféricos (ojos).

	15 → 10 mm		10 → 5 mm		5 → 3 mm		Tamaño de las submicelas				
Tamaño y forma de las micelas	Crecimiento de las micelas de cuajo										
	Globular				Hebras o cadenas						
Pérdida de minerales	Bajo					Alto					
pH (en drenaje de suero)	5,5	5,4	5,3	5,2	5,1	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6	
Textura (a los 14 días)	Elástica		Tipo Cheddar Plástica			Harinoso		Seco		No cohesivo	
Ejemplos de quesos	Gouda Emmental		Cheddar			Cheshire Feta		Stilton			

Figura 2 – Representación esquemática del efecto de pH en la microestructura y textura del queso (Lawrence y col., 1993).

La Figura 3 ilustra las diferentes causas que provocan apertura mecánica en la masa de los quesos. Si bien este defecto no es el objetivo de estudio del presente trabajo, resulta interesante ilustrarlo para diferenciarlo de los defectos de origen microbiano.

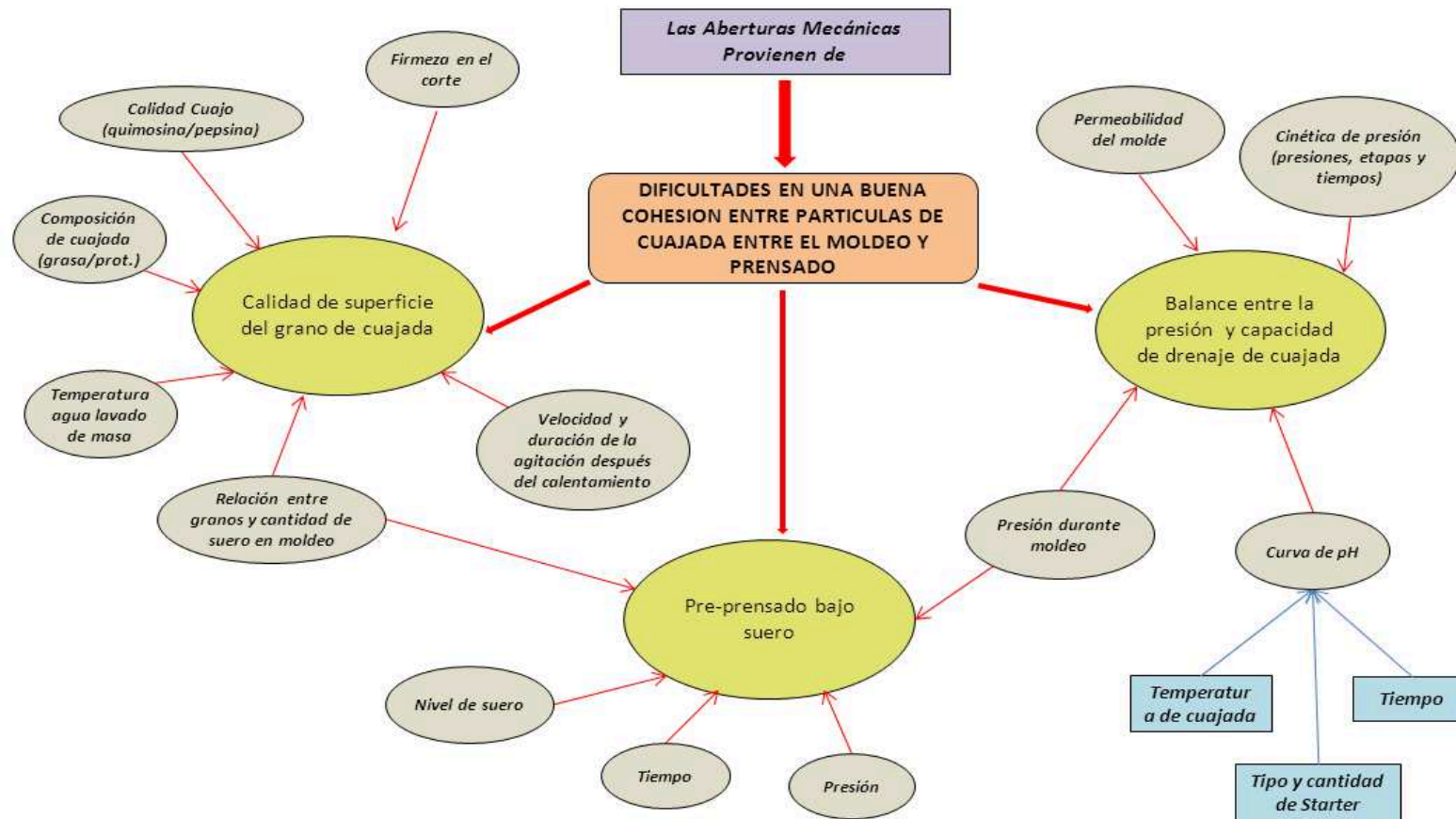


Figura 3 – Factores que influyen en la formación de ojos mecánicos en quesos.

5. Tipos de defectos gasógenos en quesos

Como ya se indicó, el desarrollo de gas causado por microorganismos no deseados en las elaboraciones casearias se evidencia por la aparición de los ojos, grietas, hendiduras, fisuras y agujeros en la masa del queso y por la acumulación de gas dentro del embalaje en aquellos quesos madurados sin corteza. El número, tamaño, forma y distribución de agujeros producidos por fermentaciones gasógenas dentro de la estructura del queso dependen del tipo de gas producido (CO_2 o H_2); el H_2 tiene la particularidad de tener una baja solubilidad en la fase acuosa de queso.

Los defectos por generación de gases pueden surgir en las primeras horas dentro del proceso de elaboración o maduración del queso, dando lugar al defecto denominado **hinchazón precoz** (primeras 72 horas), o pueden manifestarse durante las etapas de maduración del queso, fenómeno conocido como **hinchazón tardía**.

La Figura 4 ilustra los principales sustratos y productos de las fermentaciones producidas por los microorganismos indeseables durante el proceso de maduración de los quesos.

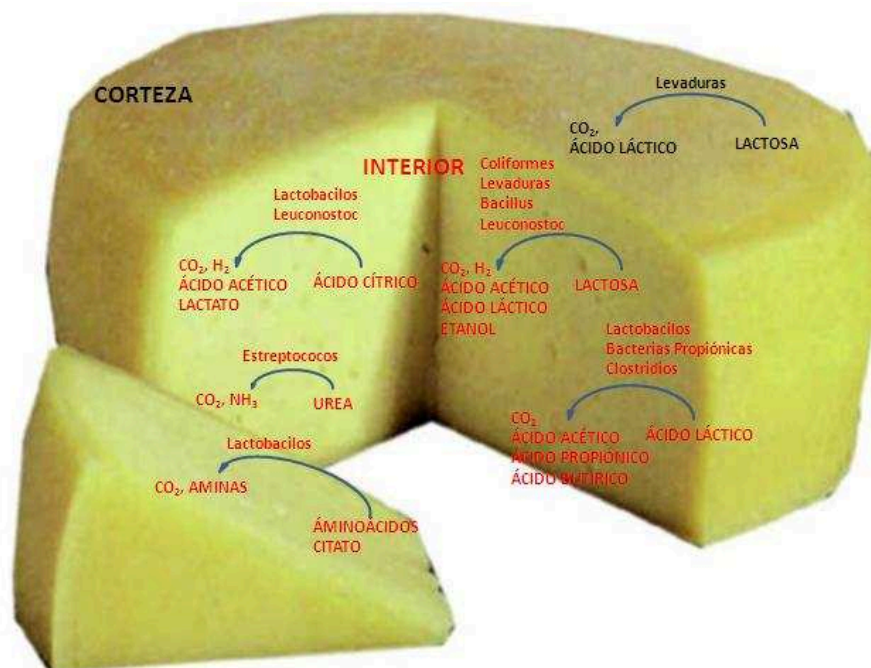


Figura 4 – Esquema de los principales sustratos utilizados por microorganismos contaminantes de un queso y sus metabolitos.

5.1. Generación de gas temprano (Hinchazón Precoz)

La generación temprana de gas es debida a la presencia de bacterias coliformes o levaduras (Hill y Kethireddipalli, 2013; Sheelan, 2007). En ciertos casos, también puede ser causada por bacterias lácticas no pertenecientes al starter o NSLAB (por su sigla en inglés, Non Starter Lactic Acid Bacteria). Este grupo está integrado por géneros citrato-positivo, como *Leuconostoc* y algunas integrantes del género *Lactobacillus* que pueden producir CO₂ (Hill y Kethireddipalli, 2013; Sheelan, 2007). En el presente trabajo, analizaremos los defectos causados por NSLAB dentro del grupo de microorganismos que generan defectos de hinchazón tardía ya que principalmente suelen ser responsables de este tipo de fenómeno.

Este defecto es común en quesos blandos y semiduros debido a su alta actividad acuosa (aw), en relación a otro tipo de quesos.

5.2. Generación de gas tardío (Hinchazón Tardía)

En el caso de defecto de hinchazón tardía, la generación de gas se produce en los estadíos más avanzados de la maduración, por ejemplo en queso tipo Cheddar, por bacterias pertenecientes al grupo NSLAB como *Lb. brevis* y *Lb. fermentum*, que pueden ingresar al circuito productivo por la contaminación de la leche y producir gas a partir de la fermentación de lactosa residual y galactosa, generando CO₂; o por bacterias citrato-positivo como *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, que pueden producir CO₂ a partir de citrato (Hill y Kethireddipalli, 2013; Sheelan, 2007).

Quesos de mediana y baja humedad, salados en salmuera, pueden sufrir las consecuencias de la germinación de esporos del genero *Clostridium*, como por ejemplo *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. butyricum*, que fermentan el lactato y lactosa, respectivamente, y producen CO₂ y H₂.

Algunos quesos de larga maduración, mayor a 14 meses, como el Parmigiano Reggiano o el Grana Padano, se ven afectados por la fermentación butírica y ocasionalmente, por fermentación propiónica. (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2004). Tres especies de clostridios son señalados como los responsables principales de defectos tardíos en quesos de pasta dura de larga maduración: *Cl. butyricum*, que generalmente crece en las primeras etapas de maduración, cuando aún hay lactosa residual que utiliza como fuente de carbono; *Cl. tyrobutyricum*, que tiene capacidad de crecimiento en etapas tardías de maduración (mayor a un año) y especialmente cuando el pH se vuelve favorable, debido a la utilización de ácido láctico y lactato como fuente de carbono; y *Cl. sporogenes*, que crece después del año de maduración del queso, es muy proteolítico y utiliza aminoácidos como fuente de carbono.

El desarrollo de bacterias propiónicas (BAP) es poco frecuente, ya que son necesarias condiciones particulares, como desarrollo de acidez débil en la cuajada o nivel de salado bajo (Bottazzi, 1993).

Cuando la contaminación se produce después de la pasteurización, es aconsejable mejorar las rutinas de limpieza y sanitización de paredes, pisos, cielorrasos, equipamientos, cañerías y superficies en contacto con el producto.

Entre los factores que influyen en la aparición de este tipo de defectos podemos listar:

- 1- alimentación del ganado con ensilados;
- 2- baja calidad de la leche (alto contenido de esporos de clostridios);
- 3- condiciones deficientes de higiene edilicia y de equipos;
- 4- uso de un fermento iniciador con poca fuerza.

6. Posibles vías de ingreso de microorganismos a la leche en el tambo

Parte de la información incluida en esta sección del TFI fue adaptada de un trabajo realizado por el Dr. Heer Gerónimo de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL (2007).

La Figura 5 muestra las posibles fuentes y vías de ingreso de los diferentes microorganismos causantes de defectos de hinchazón en quesos.

Una vez que la leche ha atravesado el canal del pezón tiene un determinado número de bacterias. Es importante diferenciar y conocer el contenido de bacterias antes y después de la secreción. Es fundamental obtener leche con un bajo recuento inicial de bacterias y refrigerarla inmediatamente a 4 – 6°C. Si se cumple esta premisa, desde el punto de vista microbiológico, la leche será una excelente materia prima. Para lograr una leche de buena calidad bacteriológica, es fundamental la participación y la autogestión de los tamberos.



Figura 5 – Posibles fuentes de contaminaciones microbianas causantes de hinchazón en quesos y sus posibles vías de ingreso.

6.1. Contenido de bacterias en la leche antes de la secreción

Infecciones de la ubre: en el caso de infecciones agudas, el contenido de bacterias en los cuartos individuales al comienzo del ordeño puede superar 10^6 UFC/ml (por ejemplo, por mastitis debida a *Streptococcus agalactiae*). La leche de los cuartos con infecciones subclínicas causadas por estreptococos y estafilococos contienen alrededor de 10^4 UFC/ml en la leche mezcla de los cuartos. Infecciones latentes debida a estafilococos y estreptococos contienen alrededor de 10^4 UFC/ml en el comienzo del ordeño y cerca de 10^3 UFC/ml en la leche mezcla de los cuartos.

Canal del pezón: tiene una flora muy variada, entre la que podemos citar *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos, *Micrococcaceae*, *Corinebacterium* (especialmente *C. bovis*) y estreptococos no patógenos. Aún cuando para tomar una muestra de leche se desinfeste bien el pezón (durante 20 segundos con alcohol al 80%), no es posible eliminar esta microflora. Algunos trabajos de investigación han demostrado que la única forma de evitarlo es obtener la muestra de leche mediante punción de la cisterna de la ubre o del pezón. También se ha demostrado que no todas las bacterias que viven sobre la piel son capaces de desarrollar en el canal del pezón. Por ejemplo, en la piel predominan los micrococos y no así en el canal del pezón, a diferencia de los estafilococos, presentes en ambos nichos.

6.2. Contaminación postsecretoria

Piel de los pezones: aquí se encuentra una amplia variedad de bacterias que pueden multiplicarse en los restos de la leche (cuando quedan restos de leche en los equipos por limpieza deficiente). No obstante, estas bacterias no influyen demasiado (son bacterias que aún no están adaptadas a leche) en el recuento total de bacterias. La proporción de bacterias provenientes de la piel de los pezones puede ser significativa cuando se ordeñan pezones sucios con barro o materia fecal, por el "efecto de lavado de los pezones" (*teat washing effect*). Esta denominación proviene del hecho de si se ordeñan pezones sucios, al retirar las unidades de ordeño los mismos se "lavan".

Las bacterias provenientes de la materia fecal (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Listeria*) tienen un rol muy importante (como se verá más adelante) en la calidad de la leche y los subproductos. Estas bacterias pueden detectarse mediante cultivos en medios y condiciones específicas. En el recuento total de bacterias pueden no aparecer, pero como se dijo, tienen mucha influencia sobre la calidad de los productos terminados (rutina de ordeño).

Ambiente: con las actuales instalaciones y sistemas de ordeño, es escasa la contaminación del ambiente. Se debe fundamentalmente a las pasturas, al polvo de

los alimentos concentrados y materia fecal de los pisos que contaminan las pezoneras, cuando éstas se caen. Las bacterias implicadas más comúnmente pertenecen a *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, etc.

El aire puede estar cargado de levaduras y esporos de *Bacillus*.

En relación al equipamiento de ordeño y tanques de frío, cuando no están suficientemente higienizados, sin duda son la fuente más importante de contaminación. La importancia aquí es doble:

- por un lado los equipos de ordeño y de frío tienen una enorme superficie que está en contacto con toda la leche;

- por otro lado, esas bacterias en presencia de restos de leche “se adaptan” y se reproducen entre los tiempos de ordeño. Como consecuencia, las superficies pueden tener una gran cantidad de bacterias “adaptadas” a leche. Hay trabajos que demuestran que, cuando la leche del tanque tiene más de 10^5 UFC/ml, se puede asegurar una higiene deficiente del equipamiento.

Agua: el equipamiento de ordeño y los utensilios de ordeño deben enjuagarse con agua potable. El agua potable, en 100 ml, no debe contener bacterias coliformes y no más de 100 bacterias saprófitas totales. Las bacterias contaminantes más comunes del agua son *Pseudomonas*, pero pueden suelen estar presentes coliformes. Cuando el agua está contaminada, con el enjuague las bacterias contaminan el equipamiento y éste a la leche. No existen datos ni relevamientos, pero la contaminación de los pozos de agua en los tambos es alta. La solución más común es clorar el agua, que consiste en agregar hipoclorito de sodio al agua contenida en un recipiente y cuya concentración de cloro activo debe ser igual o mayor a 0,25 ppm.

En resumen, la carga microbiana de la leche se puede agrupar según su origen, de la siguiente forma:

- bacterias provenientes del aire100 – 1.500 UFC/ml
- bacterias de la ubre.....300 – 4.000 UFC/ml
- bacterias de la piel de los pezones.....500 – 15.000 UFC/ml
- Infecciones de la ubre300 – 25.000 UFC/ml
- bacterias provenientes de equipamientomiles a millones de UFC/ml

7. Microorganismos causantes del defecto de Hinchazón Precoz

7.1. Bacteras coliformes

El grupo de bacterias coliformes es indicador de condiciones de higiene deficiente, pudiendo asociarse a la posible presencia de patógenos del intestino

(*Salmonella*, *Shigella*, que no crecen en las condiciones de determinación de coliformes). Incluye bacterias Gram-negativas, oxidasa-negativas, no-formadoras de esporos, aeróbicas o anaeróbicas facultativas, que crecen en presencia de sales biliares y fermentan la lactosa para producir ácido y gas dentro de las 48 h a 37°C. Dentro del grupo llamado coliformes se encuentran los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter* (Donnelly, 2007). Estas bacterias pueden llegar a contaminar el queso cuando se utiliza para su elaboración leche sin tratamiento térmico o, por contaminación cruzada, si se utiliza leche tratada térmicamente, pudiendo ingresar por alguna rotura de las placas o juntas del intercambiador, a partir de la leche sin tratar. Otras causas de contaminación son la higiene y el saneamiento deficientes de la planta quesera o rutinas deficientes de higiene personal por parte de los operarios.

Estas bacterias requieren lactosa para el crecimiento, ya que no pueden metabolizar lactato y, por lo tanto, el rápido crecimiento se produce durante las primeras etapas de la fabricación del queso (con disponibilidad de lactosa) y, en particular, cuando la temperatura y el pH son favorables. Durante las primeras etapas de elaboración y, en presencia de coliformes, después de la formación de la cuajada y durante la sinéresis, se concentran en la cuajada y por lo tanto, el nivel de coliformes puede incrementarse significativamente después del desuerado. Cuando se produce un desarrollo excesivo, los quesos presentan desviaciones organolépticas que se traducen en olores y sabores muy desagradables (a “sucio”), acompañando el fenómeno de hinchazón del queso por formación de CO₂ y H₂ (Alichanidis, 2007; Hill y Kethireddipalli, 2013). Tales defectos de gas se evidencian cuando alcanzan niveles de concentración cercanos a 10⁷ UFC/g.

7.1.1. Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón precoz causado por bacterias coliformes

- 1) Implementar rutinas de higiene y sanitización en el tambo, como lavar y desinfectar las ubres del animal antes de conectar las pezoneras, lavar y sanitizar la máquina de ordeño y los equipos para conservar fría la leche.
- 2) Enfriar rápidamente la leche después del ordeño.
- 3) Implementar prácticas efectivas de higiene y sanitización en los equipos, utensilios y salas empleadas en la elaboración de quesos.
- 4) Implementar prácticas efectivas de higiene personal de los operarios.
- 5) Elaborar quesos con leche pasteurizada. Adecuar el equipo pasteurizador con válvula diversora, sobrepresión del lado de la leche pasteurizada e implementar un programa de mantenimiento preventivo.

- 6) Enfriar rápidamente la leche pasteurizada, hasta la temperatura de inoculación del fermento. Utilizar fermentos *starter* activos para colonizar el medio y generar acidez, de modo de metabolizar rápidamente la lactosa. De este modo, la escasez de una fuente de carbono (lactosa) y el rápido descenso de pH restringe el desarrollo de coliformes, que son sensibles a la acidez. Por tal motivo es importante evitar accidentes con fagos en los fermentos iniciadores y no utilizar leches que contengan antibióticos (como penicilina, por ejemplo) debido a que las bacterias coliformes no son inhibidas y sí lo son las bacterias del ácido láctico.
- 7) Salar los quesos, lo que disminuye la actividad acuosa (a_w), reduciendo también la posibilidad del desarrollo de coliformes.
- 8) Agregar sales oxidantes (nitrato de sodio o potasio) durante la fabricación de queso, cuando la legislación lo permite. Estas sales actúan sobre el sistema enzimático que produce hidrógeno, pero no se inhibe la producción de dióxido de carbono y la generación de sabores y olores indeseables, ya que no evitan el crecimiento de los coliformes.
- 9) Utilizar desinfectantes como hipoclorito de sodio al terminar de lavar los equipos, cañerías, paredes y pisos. Las bacterias coliformes son sensibles a algunos desinfectantes químicos.

En la Figura 6 se pueden observar las características y distribución de ojos causados por bacterias coliformes en una horma de queso.

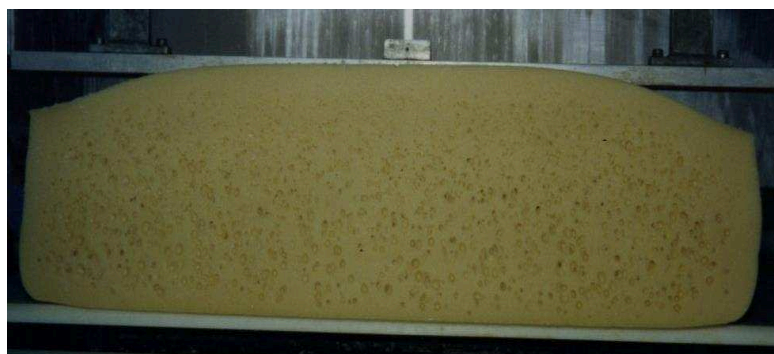


Figura 6 – Defecto de hinchazón precoz causado por bacterias coliformes en una horma de queso.

7.2. Levaduras

Las levaduras son consideradas hongos unicelulares (pertenecen al reino *Fungi*) que se reproducen por gemación o fisión e incluyen, entre los principales contaminantes de lácteos, los géneros *Candida* y *Kluyveromyces*. El desarrollo de

levaduras en los quesos se ve favorecida por su gran capacidad para adaptarse a diferentes condiciones como bajas temperaturas, bajos valores de pH, baja actividad acuosa, altas concentraciones de sal, presencia de productos de limpieza y desinfectantes, etc.

No es frecuente que las levaduras causen defectos o accidentes de hinchazón precoz en la producción de quesos y, cuando se presentan, suele ser debido al género *Kluyveromyces* y sus formas imperfectas, que poseen la capacidad de fermentar la lactosa para producir CO₂.

Las fuentes de contaminación en las elaboraciones casearias por levaduras son variadas, ya que pueden ingresar al proceso a partir de la leche cruda sin tratamiento térmico, por, falta de higiene en equipos y utensilios empleados en la elaboración, falta de higiene en el edificio, contaminación del aire que circula por la sala de elaboración, contaminación cruzada de leche pasteurizada con leche cruda, altas concentraciones de levaduras (> 10⁵ ufc/ml) en fermentos de suero de quesería que se emplean artesanalmente en la elaboración de quesos de pasta dura, entre otras.

7.2.1. Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón precoz causado por levaduras

- 1) Implementar rutinas de higiene y sanitización en el tambo, como lavar y desinfectar las ubres del animal antes de conectar las pezoneras, lavar y sanitizar la máquina de ordeño y los equipos para conservar fría la leche.
- 2) Enfriar rápidamente la leche después del ordeño.
- 3) Implementar prácticas efectivas de higiene y sanitización en de equipos, utensilios y salas empleadas en la elaboración de quesos.
- 4) Elaborar quesos con leche pasteurizada. Adecuar el equipo pasteurizador con válvula diversora, sobrepresión del lado de la leche pasteurizada e implementar un programa de mantenimiento preventivo.
- 5) Cuando se elaboran quesos de masa lavada, monitorear la calidad microbiológica del agua empleada para evitar que se convierta en una fuente de contaminación.
- 6) Cuando se emplea suero de leche como fermento, controlar que la concentración de levaduras no supere 10⁵ UFC/ml. Si se supera ese valor, cambiar de fermento o preparar uno nuevo.
- 7) Controlar la calidad del aire que circula por sala de elaboración, sobre todo en aquellos sectores donde el queso queda expuesto al ambiente. Cuando

sea necesario, implementar sistemas de filtrado de aire de calidad microbiológica para eliminar levaduras.

En la Figura 7 se muestran las características y distribución de ojos causados por levaduras.



Figura 7 – Defecto de hinchazón precoz causado por levaduras en una horma de queso.

8. Microorganismos causantes del defecto de Hinchazón Tardía

8.1. Bacterias Propiónicas

Las bacterias del ácido propiónico (BAP) producen ácido propiónico, ácido acético, CO₂ y H₂O a partir de ácido láctico (Di Cagno y Gobbetti, 2007). El agregado de BAP es fundamental para el desarrollo de los ojos característicos y un dulce sabor a nuez en quesos tipo Suizo, pero la aparición de ojos en otros tipos de quesos como los de pasta dura o aquellos de masa cerrada resulta indeseable (Di Cagno y Gobbetti, 2007; Ledenbach y Marschall, 2010; Hill y Kethireddipalli, 2013; Sheelan, 2007), pudiendo causar defectos de hinchazón tardía. Estas bacterias se ven favorecidas en su desarrollo cuando el queso tiene un bajo contenido de sal, baja velocidad de difusión y baja acidez (Bachmann y Frölich-Wyder, 2007; Di Cagno y Gobbetti, 2007; Dusterhöft y Van den Berg, 2007). Además, se favorece su crecimiento con el aumento de temperaturas de maduración.

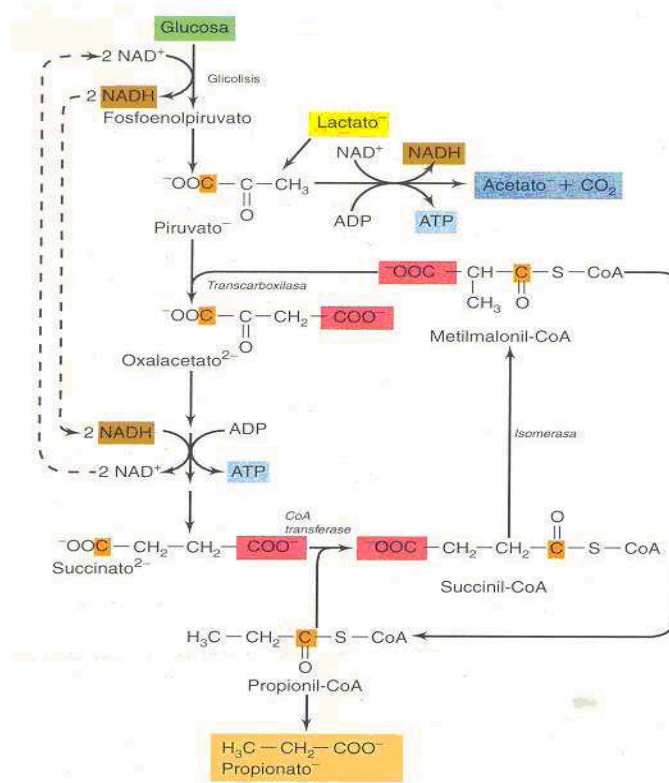
Algunas cepas de BAP tienen una gran capacidad para utilizar el lactato y son muy proteolíticas, pudiendo conducir a alteraciones en la textura del queso, además de generar grandes cantidades de CO₂ por la decarboxilación de aminoácidos que dan origen a grandes ojos de formas irregulares, hasta incluso producir grietas en la horma (Bachmann y Frölich-Wyder, 2007; Sheelan, 2007).

Las estrategias recomendadas para controlar la generación de gas tardío causado por BAP se basan en elaborar quesos con leche pasteurizada y mantener temperaturas de maduración lo más bajo posible, según el tipo de queso elaborado. Es importante en el diseño de las plantas queseras para evitar la contaminación cruzada.

8.1.1. Fermentación propiónica

Según Sordo (1983), los procesos que se desarrollan en el curso de la elaboración del queso dependen de la composición cualitativa y cuantitativa de la microflora acompañante. De acuerdo a Alais (1985), el ácido láctico producido por el metabolismo de las cepas del *starter* puede experimentar la fermentación propiónica, que es la responsable de la formación de ojos en los quesos suizos. Las bacterias que presentan este tipo de fermentación pueden utilizar tanto azúcares como lactato como puntos de partida para el proceso. La ruta es un proceso complejo en el que se genera ácido acético, CO₂ y ácido propiónico como productos finales. Es una fermentación secundaria de los productos de las fermentaciones lácticas primarias.

A continuación (Figura 8) se muestra un esquema de los pasos de la fermentación propiónica.



Estequiometría del lactato:



Figura 8 – Ruta metabólica de la fermentación propiónica.

8.2. NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria)

Las bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento o NSLAB (por sus siglas en inglés) son microorganismos adventicios que se encuentran en los quesos y que no forman parte del fermento primario; por lo tanto, no contribuyen a la producción de ácido láctico durante la elaboración (Beresford, 2003). La flora NSLAB se compone de cuatro grupos principales de bacterias lácticas: lactobacilos mesófilos, pediococos, enterococos, *Leuconostoc* spp. y, eventualmente, lactococos.

Las bacterias del género *Leuconostoc*, especialmente *Ln. mesenteoides*, pueden causar defectos de hinchazón precoz durante la fabricación de queso y en las primeras etapas de maduración mediante la producción de CO₂ a partir del citrato como fuente de carbono.

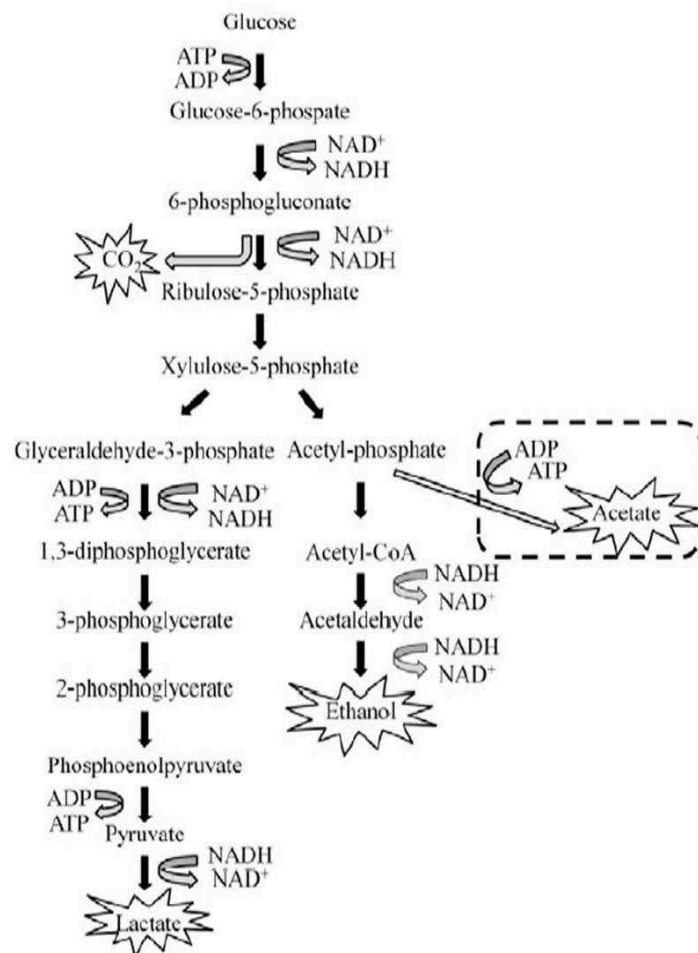
Los lactobacilos heterofermentantes pueden causar defectos gasógenos debido a la generación de CO₂ a partir del metabolismo de la lactosa residual, galactosa, aminoácidos y/o citrato presente en el queso (Ledenbach y Marschall, 2010; Sheelan, 2007). Los lactobacilos mesófilos constituyen el grupo microbiano mejor estudiado y el más frecuentemente encontrado en los quesos como parte de la flora NSLAB (De Angelis y col., 2001; Quiberoni y col., 2008). Los integrantes del género *Lactobacillus* se clasifican en tres grupos en base a su capacidad fermentante: homofermentantes obligados (Grupo I); heterofermentantes facultativos (Grupo II); y heterofermentantes obligados (Grupo III). El Grupo I se compone de lactobacilos que normalmente forman parte de la flora del fermento primario (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* spp.) (Beresford, 2003). Los lactobacilos heterofermentantes facultativos (Grupo II) son los más frecuentemente aislados a partir de quesos, mientras que los miembros del Grupo III, en particular *Lb. brevis* y *Lb. fermentum* son detectados en forma ocasional. Los lactobacilos heterofermentantes obligados y facultativos son los responsables de defectos gasógenos en quesos, y a los que se les prestará mayor atención en esta sección.

La mayoría de las NSLAB no desarrolla bien en leche y, por lo tanto, no contribuyen a la producción de ácido durante el proceso de elaboración. Estas bacterias pueden, sin embargo, crecer en el queso durante la maduración y convertirse en la microflora dominante luego de largos períodos (McSweeney, 2004), causando defectos en el caso de lactobacilos heterofermentantes y especies del género *Leuconostoc*. Otros mesófilos NSLAB han sido aislados a partir de quesos, como *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. curvatus* (Jordan y Cogan, 1993; Depouilly y col., 2004; Dolci y col., 2008; Fitzsimons y col., 1999), pero ninguna de estas especies son los principales responsables de la producción de gas

como metabolito de su desarrollo y, por lo tanto, no suelen causar defectos de hinchazón.

Varias especies del género *Leuconostoc* fueron identificadas como agentes gasógenos en quesos de pasta blanda, lo que sugiere que los contenidos relativos elevados de oxígeno y agua como los presentes en este tipo de queso son las condiciones necesarias para estimular su desarrollo (Cogan y Jordan, 1994; Quiberoni y col., 2008).

En la Figura 9 se ilustran las rutas metabólicas a partir de azúcares como fuentes de carbono para estos microorganismos.



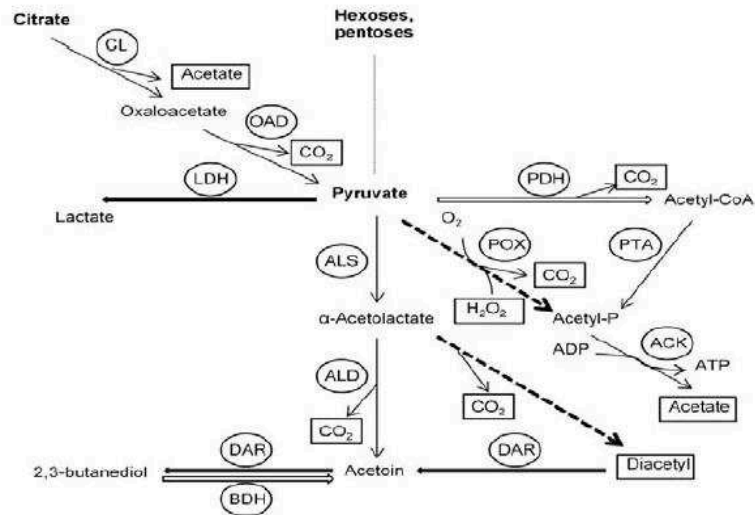


Figura 9 – Posibles rutas metabólicas a partir de azúcares para *Leuconostoc*.

8.2.1. *Leuconostoc*

El género *Leuconostoc* está integrado por cocos mesófilos heterofermentativos, que producen ácido láctico de tipo D(-) y son incapaces de hidrolizar la arginina. Comprende doce especies, siendo *Ln. mesenteroides* la especie tipo (Endo y Okada, 2008). *Ln. mesenteroides* incluye, a su vez, tres subespecies: *mesenteroides*, *cremoris* y *dextranicum*. *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* son las subespecies aisladas más frecuentemente en quesos elaborados a partir de leche bovina y ovina (Arizcun y col., 1997; Centeno y col., 1996; Centeno y col., 1994).

Se utilizan intencionalmente en la elaboración de algunos tipos de queso cuando se pretende metabolizar el citrato a CO₂ (responsable de la formación de ojos) y diacetilo (principal compuesto de aroma) en quesos frescos tipo Cottage y blandos. El CO₂ se origina también a partir de azúcares, como consecuencia del metabolismo heterofermentativo. En los quesos tipo suizo (Edam y Gouda), es deseable la presencia de ojos pequeños (menor a 1 cm de diámetro) redondos y brillantes. Asimismo se utilizan en quesos madurados con hongos (quesos azules) para generar ojos que permitan al hongo (generalmente, *Penicillium roqueforti*) colonizar fácilmente la masa del queso. Pero cuando ingresan al queso como NSLAB, donde no hay intención de uso, representan un grave problema por los defectos de hinchazón que genera y el detrimento de la calidad. En la Figura 10 se muestra un queso Port Salut que sufrió una alteración del tipo hinchazón tardía causada por una cepa de *Leuconostoc*.



Figura 10 – Defecto de hinchazón tardía causado por *Leuconostoc* en queso Port Salut.

8.2.2. Lactobacilos heterofermentantes

Morfológicamente, los lactobacilos son bastones delgados y largos, inmóviles, microaerófilos o anaerobios, gram positivos y catalasa negativos, capaces de generar ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Los lactobacilos homofermentativos dan lugar a ácido láctico como único producto de fermentación. Este grupo está integrado por especies que forman parte del *starter* en la elaboración de quesos (*Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*) o como adjuntos probióticos (*Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, etc.), entre otros. Los lactobacilos heterofermentativos producen, además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y otros productos volátiles. Entre ellos se encuentran las especies *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. wasatchii*, etc., y son los principales NSLAB responsables, junto a *Leuconostoc*, de la hinchazón tardía en quesos.

Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15; en general, se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso.

8.2.2.1. Actividad bioquímica

Fermentación láctica

En la Figura 11 se esquematiza la ruta de heterofermentación de la Pentosa – Fosfato o Pentosa Fosfocetolasa (PF) característica de los lactobacilos heterofermentantes integrantes del grupo NSLAB en quesos.

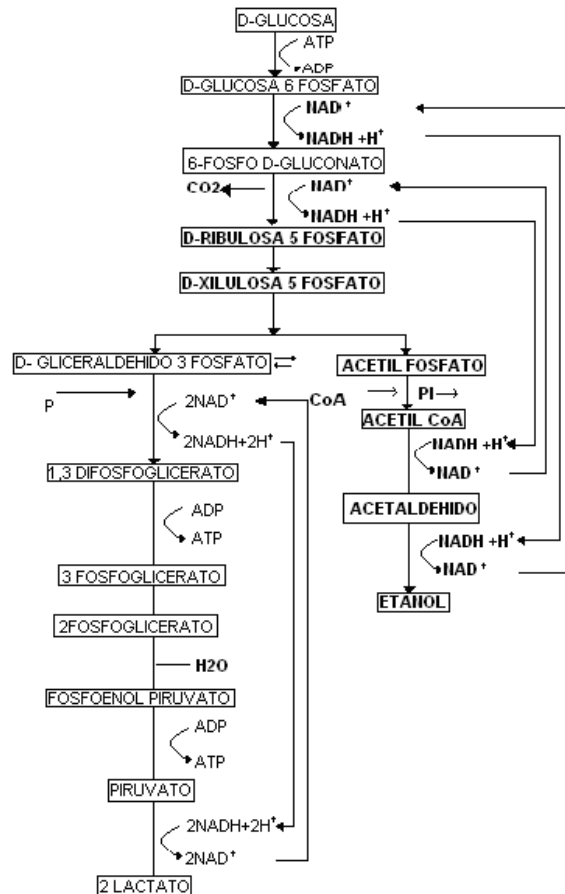


Figura 11 - Ruta metabólica de heterofermentación de la Pentosa – Fosfato o Pentosa Fosfocetolasa (PF).

8.2.2.2. *Metabolismo del citrato*

La leche contiene una baja concentración de citrato (aproximadamente, 8 mM) y la mayor parte del mismo (aproximadamente, 90 %) se pierde en el suero durante la elaboración del queso. Sin embargo, las pequeñas concentraciones de citrato retenidas en la cuajada (10 mmol/kg) son de gran importancia para el desarrollo del *flavor*, dado que el citrato puede ser metabolizado a compuestos volátiles de aroma y sabor por las BAL citrato positivas (Drake y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000). Los principales compuestos de *flavor* derivados del metabolismo del citrato son acetaldehído, etanol, acetato, diacetilo, acetoína y CO₂. La transformación de citrato tiene lugar a pH 5-5,5 (pH óptimo de acción de la enzima inducible citrato permeasa), por lo que tiene lugar después de la fermentación primaria por parte del starter.

En queso Cheddar, por ejemplo, la concentración de citrato decrece desde 0,2 - 0,5 hasta 0,1 % luego de 6 meses de maduración, como consecuencia de la actividad metabólica de algunos lactobacilos mesófilos con actividad citrato positiva, pertenecientes a la flora NSLAB (McSweeney, 2004).

8.2.2.3. Metabolismo de la lactosa y el lactato

Durante la elaboración y en las etapas tempranas de la maduración del queso, el fermento primario metaboliza la lactosa con producción de ácido láctico (principalmente ácido L(+))láctico). En el curso de la elaboración, las NSLAB no contribuyen a esta transformación ya que, en general y como se indicó, muestran un crecimiento lento en la leche y recién comienzan a desarrollarse en la cuajada (Stanley, 1998). En cambio, sí pueden contribuir a la degradación de la lactosa durante las etapas tempranas o avanzadas de la maduración, en caso de una fermentación incompleta de la misma por parte del fermento primario (McSweeney y Fox, 2004).

Por otra parte, el lactato puede ser oxidado en el queso a acetato y CO₂ por algunos miembros de la flora NSLAB (cepas de *Lb. curvatus* y *Lb. sake*) una vez que se ha agotado la fuente de carbohidratos (Figura 12) (Liu, 2003). Esta transformación depende de la población NSLAB y de la disponibilidad de O₂, la que a su vez está determinada por el tamaño del bloque de queso, la permeabilidad al O₂ de la corteza y del material de envasado (McSweeney y Sousa, 2000). El acetato es un compuesto de *flavor* importante en muchas variedades de quesos; sin embargo, es poco probable que esta reacción oxidativa ocurra en una extensión importante dentro del queso, debido a su bajo potencial redox (ca. -250 mV) y a la escasa disponibilidad de O₂ (McSweeney, 2004).

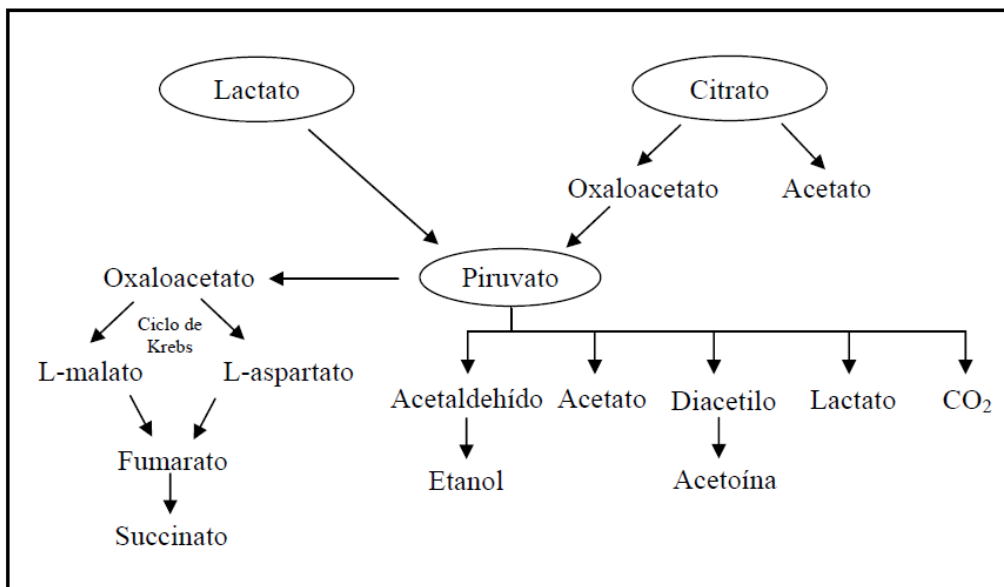


Figura 12 - Rutas metabólicas implicadas en la degradación del citrato y del lactato durante la maduración del queso (Dudley y Steele, 2005; McSweeney y Sousa, 2000).

8.2.3 Origen de las NSLAB en el queso

El origen de las NSLAB en el queso ha sido objeto de debate, dado que estos microorganismos adventicios desarrollan tanto en quesos elaborados con leche cruda, como en quesos elaborados con leche pasteurizada y cultivos primarios definidos, bajo estrictos estándares de inocuidad y calidad.

En los quesos elaborados con leche cruda, la principal fuente de NSLAB es probablemente la leche de elaboración (Beresford, 2003). Diversos autores (Berthier y col., 2001; Casey y col., 2006; Coppola y col., 2000) caracterizaron la composición microbiológica de quesos Parmigiano Reggiano, Comté y Gruyère, respectivamente, y de la leche cruda utilizada en su elaboración, a fin de determinar el origen de la flora NSLAB en los mismos. En todos los casos se observó que muchas de las cepas identificadas en la leche cruda fueron aisladas posteriormente a partir del queso. Un estudio comparativo de la flora NSLAB de quesos elaborados en una misma fábrica a partir de leche cruda proveniente de dos regiones diferentes de Italia demostró que el 83 % de las cepas provenían de la leche cruda, mientras que sólo el 17 % restante podía atribuirse a otros orígenes, tales como equipamiento, medioambiente de la planta láctea o fermento natural de suero (Poznanski y col., 2004).

En los quesos elaborados con leche pasteurizada, las NSLAB están presentes como consecuencia de contaminaciones post-pasteurización por contacto con la superficie de equipos y utensilios, o a través de la flora residente en el medioambiente de la planta láctea (Chapman y Sharpe, 1981; Naylor y Sharpe, 1958). Las NSLAB han sido aisladas a partir de desagües, pisos, tinas, máquina de envasado al vacío, moldes, y biofilms encontrados en diversas superficies en la industria láctea (Somers y col., 2001). Los biofilms son importantes reservorios de microorganismos dado que las bacterias que los conforman se adhieren firmemente a las superficies a través de la producción de exopolisacáridos (característica bastante difundida entre los lactobacilos heterofermentantes y cepas del género *Leuconostoc*; Kulozik, 2002). Estos polisacáridos protegen a los microorganismos al otorgarle mayor resistencia a los agentes antimicrobianos y a las soluciones desinfectantes y de limpieza (Mittelman, 1998), perpetuándose de ese modo en el ambiente de la planta industrial.

En numerosos casos, a pesar del empleo de tinas cerradas y de la implementación de prácticas más higiénicas en la elaboración de quesos, no se logra evitar la contaminación por NSLAB (De Angelis y col., 2004), a partir de lo que se postula que su posible origen en quesos elaborados con leche pasteurizada es la microflora de la leche cruda que sobrevive a la pasteurización (Jordan y Cogan, 1999). Esta hipótesis fue respaldada por McSweeney y col. (1994), quienes no detectaron presencia de lactobacilos mesófilos en la leche luego de la pasteurización, pero

observaron su desarrollo en los quesos Cheddar elaborados con dicha materia prima, bajo condiciones microbiológicas controladas. Hace unos años se consideraba que la contaminación post-pasteurización era la vía de entrada más probable de las NSLAB en quesos elaborados con leche pasteurizada. Sin embargo, gracias al advenimiento de las técnicas moleculares, este concepto ha ido cambiando y en la actualidad se considera que la hipótesis más fuerte es que las NSLAB tienen origen en la leche cruda utilizada en la elaboración de quesos, y que sobreviven a la pasteurización. La resistencia de las bacterias a la temperatura depende de la variación genética entre las especies y cepas, y se ve afectada por el estado fisiológico de las células y por factores medioambientales tales como pH, actividad acuosa, contenido de sal y presencia de conservantes (Casadei y col., 2001; De Angelis y col., 2004).

Sometiendo *Lb. wasatchii* (heterofermentante) a tratamiento térmico HTST (72 °C durante 15 s) resultó en una reducción de aproximadamente 4,5-log, es decir, a partir de un nivel inicial de 6×10^6 UFC/ml, $9,2 \times 10^1$ UFC/ml sobrevivieron después de enfriar a 31 °C. En contraste, no se detectaron colonias de *Lb. wasatchii* cuando se lo sometió a un tratamiento térmico del tipo LTLT (63°C durante 30 min.). El hallazgo de que ciertas cepas de *Lb. wasatchii* pueden soportar HTST indicaría que estas bacterias heterofermentantes podrían ingresar al queso directamente o a través de la formación de biopelículas (biofilms) en el entorno del procesamiento de queso (Beresford y col., 2001; Golnazarian, 2001; Turner y col., 1986).

Por su parte, *Ln. mesenteroides* posee una notable capacidad para sobrevivir en superficies de equipos, utensilios y superficies del pasteurizador por extensos períodos de tiempo, resistiendo a tratamientos térmicos y temperaturas de refrigeración, ya que muchas cepas son capaces de producir exopolisacáridos (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004), lo que lo convierte en un potencial alterante por hinchazón tardía en quesos.

8.2.4 Factores que influyen en la velocidad de crecimiento, el recuento final y la actividad bioquímica de las NSLAB durante la maduración del queso

8.2.4.1 Fermento primario o de acidificación

El género, la especie y cepa de las BAL utilizadas como fermento primario en la elaboración de quesos parecen tener una importante influencia en la velocidad de crecimiento y nivel alcanzado por las NSLAB, como así también en sus actividades bioquímicas durante la maduración del queso (Hynes y col., 2001).

Thomas (1987) demostró que varias cepas de lactobacilos y pediococos aislados de quesos fueron capaces de crecer en suspensiones de células de lactococos sometidas a un tratamiento de purificación y lisis celular, y en base a estos resultados sugirió que los productos de degradación de las células del fermento primario constituyen una fuente de carbono y energía para el crecimiento de las NSLAB. Asimismo, informó que la densidad máxima alcanzada por las cepas de NSLAB estudiadas fue dependiente del fermento primario, lo que indicó que este último puede influir en la microflora adventicia que se desarrolla durante la maduración y, por lo tanto, en una posible alteración del producto final. Crow y col. (1995) reportaron que los fermentos primarios líticos contribuyen a un incremento en el contenido de aminoácidos libres, como consecuencia de la liberación de las peptidasas intracelulares, lo que podría favorecer el crecimiento de las NSLAB. Si bien existe evidencia que sustenta esta hipótesis, varios estudios posteriores han informado resultados contradictorios.

8.2.4.2 Factores ambientales

El queso constituye un medio ambiente hostil para el crecimiento bacteriano dado que posee un pH bajo (4,9 – 5,3), un alto contenido de sal (4 – 6% de sal en la humedad), un contenido de humedad relativamente bajo (< 50%), carece de azúcares fermentables, madura a bajas temperaturas (entre 7 – 15°C) y es anaeróbico (Wouters y col., 2002). Sin embargo, las NSLAB son capaces de crecer bajo estas condiciones adversas, entre ellas *Leuconostoc* y lactobacilos heterofermentantes (Kask y col., 2003).

En relación a la temperatura, se ha demostrado que la disminución de la temperatura de maduración como así también el enfriamiento rápido de la cuajada luego de la etapa de prensado constituyen unos de los factores principales que inhiben el crecimiento de las NSLAB en los quesos (Beresford y col., 2001).

8.2.4.3 Sal en la humedad

La sal en la humedad se define como el contenido de sal que posee un queso referido a la humedad del mismo. Se expresa en porcentaje.

En un estudio desarrollado por Jordan y Cogan (1993) se demostró que los lactobacilos adventicios presentan una elevada tolerancia a la sal, siendo algunas cepas capaces de crecer en presencia de concentraciones de NaCl tan altas como 10%. Lane y col. (1997) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sal en la humedad sobre la velocidad de crecimiento y el nivel final de la población de NSLAB. Estos autores informaron que los valores de sal en la humedad comprendidos entre 2,85 y 5,93 % no influyeron en el crecimiento de las NSLAB durante la maduración. Por el contrario, un contenido de sal en la humedad de 6,09 % disminuyó la velocidad

de crecimiento de las NSLAB hasta los 4 meses, pero no afectó el número alcanzado hacia el final del período de maduración (6 meses). De este modo, y según estas observaciones, el contenido de sal en la humedad no influiría significativamente en el desarrollo de las NSLAB, siempre que los valores estén dentro del rango normal establecido para quesos tipo Cheddar.

8.2.4.4 Contenido de humedad

Lane y col. (1997) reportaron que los valores de humedad comprendidos dentro del rango normal (35 – 39 %) para queso Cheddar no influyen en la velocidad de crecimiento y número final de las NSLAB. Asimismo, informaron que en los quesos con un elevado contenido de humedad, las NSLAB presentaron una fase de latencia más corta, pero luego de esta etapa la velocidad de crecimiento fue independiente de la humedad.

8.2.4.5 Fuente de energía

El hecho de que las NSLAB desarrollan durante la maduración del queso alcanzando niveles elevados, mientras que el nivel de la mayoría de las otras bacterias desciende, ha impulsado la investigación acerca de la fuente de energía que permite su crecimiento en un medio ambiente prácticamente desprovisto de carbohidratos fermentables. Si bien la lactosa es una potencial fuente de energía, su nivel residual en el queso es relativamente bajo en el momento en que las NSLAB se establecen, siendo completamente degradada dentro de los 8 a 20 días, debido a que es metabolizada por el fermento primario (Martley y Crow, 1993). El crecimiento de los lactobacilos adventicios y el mantenimiento de recuentos elevados durante las etapas finales de la maduración, cuando la lactosa ha sido completamente degradada, respaldan la teoría de que la misma no constituye su principal fuente de energía (Banks y Williams, 2004; Fox y col., 1998). Estos autores señalaron que probablemente la lactosa actúa como una importante fuente de energía para las NSLAB en las etapas iniciales de la maduración. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en quesos Cheddar elaborados con distintas concentraciones de lactosa (normal, reducida e incrementada), Shakeel-Ur-Rehman y col. (2004) observaron que la evolución de la población NSLAB fue similar en todos los quesos, y sugirieron que ese compuesto no es necesario para su crecimiento en el queso.

Por otra parte, se ha sugerido que el citrato, que está presente en el queso Cheddar inmaduro en una concentración aproximada de 8 mmol/Kg, es probablemente la fuente de energía para el crecimiento de las NSLAB (Jimeno y col., 1995; Thomas, 1987). En quesos tipo Suizo y Cheddar, donde se utilizan fermentos primarios homofermentantes citrato negativo, la degradación del citrato se ha atribuido a la presencia de NSLAB heterofermentantes facultativas (Fox y col., 2000; Fröhlich-Wyder

y Bachmann, 2004), potencialmente causantes del defecto de hinchazón. Sin embargo, Jordan y Cogan (1993) indican que a pesar de estar presentes en altas concentraciones en quesos Cheddar, las NSLAB producen una escasa o nula degradación del citrato. En los quesos tipo Holanda, que se elaboran con cultivos primarios tipo DL (integrados por cepas de *Leuconostoc* spp. y de lactococos citrato positivo) que metabolizan rápidamente el citrato, las NSLAB se desarrollan rápidamente, alcanzando altos niveles (Adamberg y col., 2005). Si bien numerosos trabajos han demostrado que ciertas especies de NSLAB presentan capacidad para metabolizar citrato, varios investigadores (Adamberg y col., 2005; Kennes y col., 1991; Palles y col., 1998; Williams y col., 2000) coinciden en que el mismo no puede ser considerado una fuente de energía importante para su desarrollo en el queso.

El glicerol también ha sido indicado como posible fuente de carbono para las NSLAB. Sin embargo, las cepas de *Lb. paracasei* estudiadas no fueron capaces de degradar el glicerol (Williams y col., 2000). Se ha demostrado que algunas cepas de lactobacilos mesófilos poseen actividad glicósido hidrolasa (Williams y Banks, 1997) y que por lo tanto, pueden obtener energía de los carbohidratos liberados a partir del caseinomacropéptido de la κ -caseína (galactosa, N-acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico), de las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana del glóbulo graso (galactosa, manosa, mucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico) y de la lisis de las células del fermento primario (ribosa, desoxiribosa N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico).

Thomas (1987) y Rapposch y col. (1999) señalaron que la ribosa proveniente de los ácidos nucleicos de las células del fermento primario representa una importante fuente de carbono para el crecimiento de las NSLAB en el queso. Sin embargo, Westby y col. (1993) informaron que varias cepas de lactobacilos, pediococos y *Leuconostoc* no fueron capaces de crecer en un medio que contenía D-ribosa como única fuente de carbono fermentable, y que esta sí fue metabolizada en presencia de glucosa. Un estudio posterior llevado a cabo por Fitzsimons y col. (1999) indicó que muchas de las NSLAB aisladas a partir de queso Cheddar maduro fueron incapaces de fermentar la ribosa, indicando que otras fuentes de carbono serían utilizadas para su crecimiento en el queso. Williams y col. (2000) informaron que el 58, 48 y 22 % de las NSLAB aisladas a partir de queso Cheddar metabolizaron, respectivamente, ribosa, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico, derivados de los ácidos nucleicos y de la deglicosilación de las caseínas. Posteriormente, Adamberg y col. (2005) señalaron que el 46 % de las cepas aisladas a partir de un queso danés semi-duro fueron capaces de crecer en presencia de ribosa. Asimismo, estos investigadores informaron que las NSLAB metabolizaron los carbohidratos provenientes del

caseínomacropéptido de la κ -caseína, las glicoproteínas de la membrana del glóbulo graso y los peptidoglicanos de las paredes celulares bacterianas. Por otra parte, Rynne y col. (2007) reportaron que la velocidad de crecimiento de las NSLAB en quesos Cheddar reducidos en materia grasa fue más lenta que en aquellos elaborados con leche entera, y atribuyeron este fenómeno al menor contenido de materia grasa en los quesos y, en consecuencia, a una disminución del material de la membrana del glóbulo graso.

Hasta el momento, la fuente de energía utilizada por las NSLAB en el queso no ha sido claramente esclarecida. Los resultados reportados demuestran que son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos y, por lo tanto, es probable que no dependan de una fuente única de energía para lograr su desarrollo en el queso (Beresford, 2003). La lactosa residual, sin embargo, parece jugar un rol importante en el crecimiento de este grupo microbiano en las etapas iniciales de la maduración.

8.2.5 Desarrollo de las NSLAB en el queso

Las bacterias del fermento primario constituyen la microflora dominante durante el proceso de elaboración en todos los tipos de quesos, con recuentos que generalmente alcanzan niveles de 10^8 - 10^9 UFC/g en la cuajada al comienzo de maduración. Sin embargo, la población del fermento primario generalmente declina con el avance de la maduración, debido a factores ambientales tales como disminución del contenido de humedad, del pH y baja temperatura de maduración, junto a una concentración relativamente elevada de sal (Banks y Williams, 2004; McSweeney y col., 1994). La velocidad a la cual las células del fermento primario mueren y sufren lisis es característica de la especie y, principalmente de la cepa, pero normalmente los recuentos de bacterias viables declinan hasta aproximadamente un 1 % de los valores máximos durante el primer mes de maduración, especialmente para los fermentos mesófilos (McSweeney y col., 1994). Simultáneamente, a medida que el nivel de bacterias del fermento declina, la población de las NSLAB comienza a desarrollarse desde recuentos muy bajos (10^1 - 10^4 UFC/g) en la cuajada hasta valores de 10^7 - 10^8 UFC/g de queso luego de las primeras semanas de maduración (McSweeney y col., 1993; Peterson y Marshall, 1990). Los lactobacilos NSLAB desarrollan en todas las variedades de quesos y generalmente dominan la microflora bacteriana viable de los quesos maduros. Si bien los recuentos máximos alcanzados por las NSLAB se mantienen en niveles relativamente estables durante toda la maduración, su composición no es estática sino que se verifican modificaciones en las proporciones de especies y cepas.

Numerosos trabajos de investigación han abordado el estudio de la diversidad y evolución de la flora NSLAB durante la maduración de quesos. El estudio del ecosistema microbiano en el queso resulta de gran utilidad para numerosas aplicaciones, a saber:

- i) diferenciación de quesos;
- ii) estudio de los efectos de parámetros tecnológicos seleccionados sobre las diferencias específicas en la flora microbiana;
- iii) monitoreo de la dinámica de la microflora en fermentaciones donde intervienen poblaciones mixtas;
- iv) evaluación de la contribución real de especies y cepas a la maduración del queso.
- v) presencia de defectos gasógenos asociados a especies bacterianas NSLAB.

En quesos Cheddar maduros elaborados en el Reino Unido, *Lb. paracasei* y *Lb. brevis* (heterofermentante) representaron el 52,7 % y el 25,8 %, respectivamente, de los aislamientos identificados, mientras que *Lb. plantarum* (10,5 %) y *Lb. curvatus* (heterofermentante, 5,6 %) fueron encontrados en menor proporción (Williams y col., 2002).

En quesos españoles Roncal e Irdiazábal, elaborados con leche de oveja, *Lb. casei* (52,6 %) y *Lb. plantarum* (30 %) fueron las especies predominantes (Arizcum y col., 1997), mientras que en tres quesos ovinos italianos *Lb. curvatus* (heterofermentante) fue la especie mayoritaria, seguida de *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* (heterofermentante), *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium* en Pecorino Romano, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *E. faecium* en Fiore Sardo, y *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *Leuconostoc* spp. en Canestrato Pugliese (Di Cagno y col., 2003). Bude-Ugarte y col. (2006) aislaron diversas cepas de lactobacilos de origen NSLAB a partir de quesos argentinos de buena calidad, y las identificaron preliminarmente mediante RAPD-PCR. Los lactobacilos aislados de quesos blandos y semi-duros (Cre moso y Tybo) elaborados con leche pasteurizada fueron identificados como *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* y *Lb. plantarum*. En cambio, en quesos semiduros elaborados con leche cruda se detectó la presencia de *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum* (heterofermentantes), *Lb. plantarum* y *Lb. perolens*.

Por ejemplo, en un queso italiano de pasta hilada (Caciocavallo) la microflora se compuso principalmente por lactobacilos mesófilos, siendo *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum* (heterofermentante) y *Lb. plantarum* las especies más frecuentemente encontradas (Piraino y col., 2005), mientras que *Lb. plantarum* y *Lb. brevis* (heterofermentante) fueron los principales lactobacilos identificados en el queso asturiano Afuega'l Pitu (Cuesta y col., 1996).

Por otra parte, otros factores además de la tecnología de elaboración y el tipo de queso, contribuyen a la diversidad de la población NSLAB, como el tiempo de maduración (Demarigny y col., 1996; Fitzsimons y col., 2001; Veljovic y col., 2007; Williams y col., 2002; Zárate y col., 1997), la región geográfica de elaboración (De Angelis y col., 2001; Mannu y col., 2000), y la fábrica (Henri-Dubernet y col., 2004; Mannu y col., 2000; Sánchez y col., 2005; Williams y col., 2002) o incluso, el lote de procedencia (Mannu y col., 2000; Williams y col., 2002). Las variaciones estacionales también han sido consideradas un importante factor por su influencia en la composición de la flora NSLAB (Mannu y col., 2000).

Un estudio llevado a cabo en queso miniatura tipo suizo elaborado con leche cruda reveló fluctuaciones en el ecosistema microbiano durante la maduración (Demarigny y col., 1996). En este caso, en los quesos inmaduros la población de NSLAB se compuso por especies de *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* (heterofermentante) y *Lb. rhamnosus*, pero sólo dos subespecies de *Lb. paracasei* dominaron la microflora de los quesos luego de 24 semanas de maduración.

Fitzsimons y col. (2001) evaluaron la distribución espacial y la diversidad de las NSLAB dentro y entre bloques de quesos, como así también, la dinámica de la población durante la maduración de queso Cheddar irlandés, informando que las NSLAB se distribuyeron de manera uniforme en toda la masa del queso, dado que se encontraron las mismas cepas bacterianas en las distintas zonas del queso analizadas. *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* y otras cepas no identificadas fueron los microorganismos dominantes hasta los seis meses de maduración; a partir de entonces, sólo cepas de *Lb. paracasei* fueron aisladas del queso.

En síntesis, los aislamientos de NSLAB más frecuentes, especialmente a partir de quesos de pasta semi-dura y dura elaborados con leche pasteurizada, pertenecen a las especies *Lb. casei* y *Lb. paracasei*, pero cuando se hallan presentes *Leuconostoc* o lactobacilos heterofermentantes (*Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, etc.) el queso puede verse alterado por la producción de gas, con las consecuentes pérdidas económicas.

8.2.6 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón tardía causado por NSLAB

En general, se puede controlar o evitar accidentes gasógenos en quesos provocados por NSLAB teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones que son válidas para alteraciones provocadas por otros grupos microbianos:

- 1) utilizar cultivos *starter* muy activos, de modo de acelerar el consumo de lactosa;

- 2) asegurar un nivel de salado adecuado al tipo de queso, reduciendo la actividad acuosa;
- 3) evitar el uso de leche cruda;
- 4) implementar rutinas eficientes de limpieza y sanitización de las instalaciones y equipo utilizado para producción;
- 5) optimizar la higiene del personal afectado a la producción;
- 6) evitar formación de biofilms dentro de los equipos.

Asimismo, existen ciertas estrategias particulares, que combinadas con las generales, pueden contribuir al control del desarrollo de NSLAB durante las elaboraciones. Las mismas se describen a continuación:

8.2.6.1 Adición de antibióticos

Las bacterias del fermento primario metabolizan la lactosa con producción de ácido láctico durante la elaboración del queso, pero su actividad metabólica es inhibida en la etapa de salado. Así, se propuso controlar la población de las NSLAB que desarrollan durante la maduración mediante la adición de antibióticos a la cuajada en la etapa de salado, a fin de no interferir con la actividad acidificante del fermento primario (Beresford, 2003).

Si bien la adición de antibióticos representa una técnica sencilla para reducir el crecimiento y la influencia de las NSLAB, estos compuestos podrían repercutir en el sabor del queso y perder su actividad bactericida durante la maduración (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000a). Otra gran desventaja de esta aplicación se basa en que los antibióticos pueden ser sólo efectivos contra ciertas especies o cepas de NSLAB, e incluso, pueden acelerar la lisis de las células del fermento primario dificultando la interpretación de los resultados. Varios estudios (O'Donovan y col., 1996; Shakeel-Ur-Rehman y col., 1999; Walsh y col., 1996) han abordado el control de las NSLAB mediante el uso de antibióticos y, si bien el recuento de lactobacilos adventicios fue menor en los quesos tratados con antibióticos respecto a los controles, presentaron un mayor contenido de aminoácidos. Algunos autores atribuyeron este hecho a la mayor lisis de las células del fermento primario (Shakeel-Ur-Rehman y col., 1999), mientras que otros autores sugirieron que las NSLAB presentes en los quesos controles utilizaron los aminoácidos como sustratos de crecimiento, reduciendo su concentración en estos quesos (O'Donovan y col., 1996).

8.2.6.2 Empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas

Una alternativa al uso de antibióticos exógenos para controlar el crecimiento de las NSLAB es la adición, ya sea como fermento primario o como adjunto, de cultivos de BAL productoras de bacteriocinas. Se han realizado varios estudios en los que se utilizaron distintas cepas de lactococos productoras de bacteriocinas, con el objeto de controlar el crecimiento de las NSLAB, pero a su vez, de incrementar la lisis de las células del fermento primario, a fin de acelerar el proceso de maduración e incrementar el aroma y sabor de los quesos (Martínez-Cuesta, 1998; Morgan y col., 2002; Oumer y col., 2001; O'Sullivan y col., 2003). Sin embargo, para abordar el estudio de las NSLAB en la calidad del queso, es necesario que los fermentos productores de bacteriocinas que se adicionan como adjuntos no interfieran con la sobrevida del cultivo primario. Se ha informado que esta estrategia puede retardar el crecimiento del fermento primario y, en consecuencia, la producción de ácido láctico, afectando las características sensoriales del queso (Morgan y col., 1997; Oumer y col., 2001). A este hecho se suma que la presencia de varios fermentos en el ecosistema suele dificultar la interpretación de los resultados.

Morgan y col. (1997) utilizaron una cepa de productora de bacteriocina (*L. lactis* subsp. *lactis* DPC3286) como adjunto en elaboraciones de queso Cheddar, empleando como fermento primario *L. lactis* subsp. *cremoris* HP, demostrando que la cepa DPC3286 no previno el desarrollo de las NSLAB durante la maduración, pero indujo la lisis del fermento primario. En cambio, Ryan y col. (1996) informaron que la adición de *L. lactis* productora de lacticina 3147 – una bacteriocina de amplio espectro – disminuyó significativamente los recuentos de las NSLAB durante la maduración de queso Cheddar. En otro estudio desarrollado por Fenelon y col. (1999) se elaboraron quesos Cheddar reducidos en materia grasa empleando como fermento primario la misma cepa caracterizada por Ryan y col. (1996), a fin de inhibir el crecimiento de las NSLAB. El recuento de los lactobacilos adventicios en los quesos elaborados con fermento productor de lacticina 3147 fue 5 órdenes log menor que en los quesos controles elaborados sólo con el fermento primario, lo que confirmó la eficiencia de la lacticina 3147 en el control de la flora NSLAB, en las condiciones de estudio.

Una ventaja que presentan estos fermentos productores de bacteriocinas respecto a los antibióticos es que pueden ser utilizados comercialmente para controlar la proliferación de las NSLAB. Sin embargo, pueden producir alteraciones durante el proceso de elaboración, tales como una disminución de la velocidad de acidificación de la cuajada con un concomitante incremento de la lactosa residual, en el caso de ejercer un efecto inhibitorio sobre el fermento primario (Oumer y col., 2001; O'Sullivan,

2003); o por el contrario, cambios en la composición química del queso si contribuyen a la producción de ácido durante la elaboración, especialmente cuando se adicionan como adjuntos con el fermento primario y no exhiben antagonismo alguno con dicha población bacteriana.

8.2.6.3 Modificaciones de la temperatura de maduración

La temperatura es el principal factor que controla el crecimiento bacteriano en todos los tipos de quesos, tanto durante la etapa de elaboración como durante el proceso de maduración. Martley y Crow (1993), estudiaron el efecto de tres temperaturas de maduración diferentes (5, 10 o 15°C) sobre el crecimiento de las NSLAB en quesos Colby (una variedad similar al Cheddar que incluye lavado de la cuajada y salado en seco). El recuento inicial de las NSLAB en todos los quesos fue inferior a 10^2 UFC/g. En los quesos madurados a 15°C, las NSLAB crecieron rápidamente alcanzando niveles de 10^7 UFC/g luego de 2 meses de maduración. Este aumento fue más lento en los quesos madurados a 10°C (10^6 UFC/g a los 2 meses, 10^7 UFC/g luego de 3 meses), mientras que en los quesos madurados a 5°C, las NSLAB permanecieron por debajo de 10^5 UFC/g luego de 4 meses de maduración. En un estudio similar pero llevado a cabo en queso Cheddar, se comparó el efecto de diferentes temperaturas de maduración (8, 15, 17,5 o 20°C) sobre el desarrollo de las NSLAB (Cromie y col., 1987). Estos autores informaron que el recuento de las NSLAB se incrementó rápidamente durante las primeras 4 semanas de maduración a 15, 17,5 o 20°C, mostrando luego un aumento más lento hasta alcanzar valores de 10^8 UFC/g. En cambio, en los quesos madurados a 8°C la velocidad de crecimiento de las NSLAB fue menor, y estos microorganismos alcanzaron recuentos de, aproximadamente, 10^7 UFC/g luego de 32 semanas de maduración. Utilizando un enfoque diferente, Shakeel-Ur-Rehman y col. (2000b, 2000c) evaluaron el efecto de dos temperaturas de maduración (1 y 8°C) sobre el crecimiento de las NSLAB en quesos Cheddar elaborados con leche cruda o pasteurizada, a fin de determinar la influencia de la flora adventicia en la proteólisis, lipólisis y características sensoriales. En los quesos madurados a 1°C, el recuento de las NSLAB luego de 4 y 6 meses de maduración fue aproximadamente 3 y 2 órdenes log menor, respectivamente, que en los quesos madurados a 8°C. La maduración a 1°C disminuyó notablemente la velocidad de crecimiento y número final de las NSLAB en el queso. Por otro lado, Fox y col. (1993) informaron que la velocidad de enfriamiento de la cuajada luego de la etapa del prensado es el factor que influye más marcadamente sobre el crecimiento de las NSLAB en el queso. Folkertsma y col. (1996) estudiaron el efecto de la velocidad de enfriamiento de la cuajada, rápida (15 h) o lenta (8 días), y de la maduración a tres

temperaturas (8, 12 o 16°C), sobre los perfiles proteolíticos, lipolíticos y las características sensoriales de queso Cheddar comercial. Estos autores encontraron que la combinación de enfriamiento rápido de la cuajada y maduración a 8°C disminuyó notablemente la velocidad de crecimiento de las NSLAB, pero tuvo una influencia menor en el recuento final alcanzado por estos microorganismos adventicios hacia el final de la maduración (9 meses).

Si bien la reducción en la temperatura de maduración constituye un medio eficaz para controlar el crecimiento de las NSLAB, presenta la desventaja de que todos los fenómenos bioquímicos se lentifican, provocando un alargamiento del tiempo de maduración. Por esta razón, esta estrategia para mantener los quesos libres de NSLAB resulta interesante desde el punto de vista científico, no así desde el punto de vista de su aplicación industrial.

8.2.6.4 Microfiltración o pasteurización de la leche

Varios estudios han abordado la influencia de la materia prima sobre la población NSLAB en quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada, encontrando notables diferencias entre ambos productos (Bullock y Irvine, 1956; Kosikowski y Scarpellino, 1962; Lau y col., 1990). Sin embargo, las razones de las diferencias no son claras, dado que la leche cruda presenta gran variabilidad en su composición microbiana, y no aparece como un modelo adecuado para estudiar la flora no fermento de ecosistemas más controlados, como los quesos obtenidos en la industria. Por otra parte, el tratamiento térmico tiene influencia sobre las proteínas, los minerales y las enzimas nativas de la leche, lo que dificulta el estudio de la contribución de las NSLAB a la calidad del queso.

Una forma de evitar estos efectos secundarios del tratamiento térmico es implementar la microfiltración, una técnica de separación por membrana que permite la eliminación de microorganismos de la leche descremada, sin producir los cambios inducidos por el calor que resultan del proceso de pasteurización. La microfiltración permite reducir en un 99,9 % la carga microbiana de la leche cruda pero, a diferencia de la pasteurización, no es selectiva frente a los microorganismos patógenos, lo que representa una desventaja si no se parte de leche cruda de excelente calidad. Otra limitación que presenta esta técnica es que se requiere de equipamiento especializado. McSweeney y col. (1993) elaboraron quesos Cheddar a partir de leche cruda, pasteurizada o microfiltrada, a fin de evaluar la importancia de las NSLAB en el proceso de maduración. Estos investigadores reportaron que los quesos elaborados con leche cruda presentaron un mayor recuento de NSLAB y una mayor heterogeneidad de cepas de lactobacilos que los quesos elaborados a partir de leche

pasteurizada o microfiltrada. Los recuentos alcanzados por las NSLAB en estos dos últimos tipos de quesos fueron similares, indicando que la microfiltración, en este caso en particular, fue equivalente a la pasteurización en la reducción del número de lactobacilos adventicios. Skeie y Ardö (2000) estudiaron la influencia de la microflora de la leche cruda sobre la bioquímica de la maduración de un queso semiduro con ojos. Para ello, elaboraron quesos a partir de leche descremada cruda, pasteurizada o microfiltrada en combinaciones con crema cruda o pasteurizada, e informaron que el recuento de las NSLAB fue mayor en los quesos elaborados con leche o crema cruda.

8.3 Bacilos esporulados aerobios (*Bacillus*)

8.3.1 Generalidades del género *Bacillus*

El género *Bacillus* está formado por bacterias (bacilos) aerobias, Gram-positivas, formadoras de esporos. Los esporos son estructuras de supervivencia que les permiten resistir en ambientes hostiles. Su hábitat normal es el suelo, la vegetación, las heces, el agua y el aire.

Los bacilos esporulados sufren durante su desarrollo una serie de cambios tanto estructurales como metabólicos, que culminan con la formación de esporos. La secuencia de eventos morfológicos que ocurren en la formación de un espora libre consta de siete estadios y se muestra en la Figura 13 (Grossman, 1995).

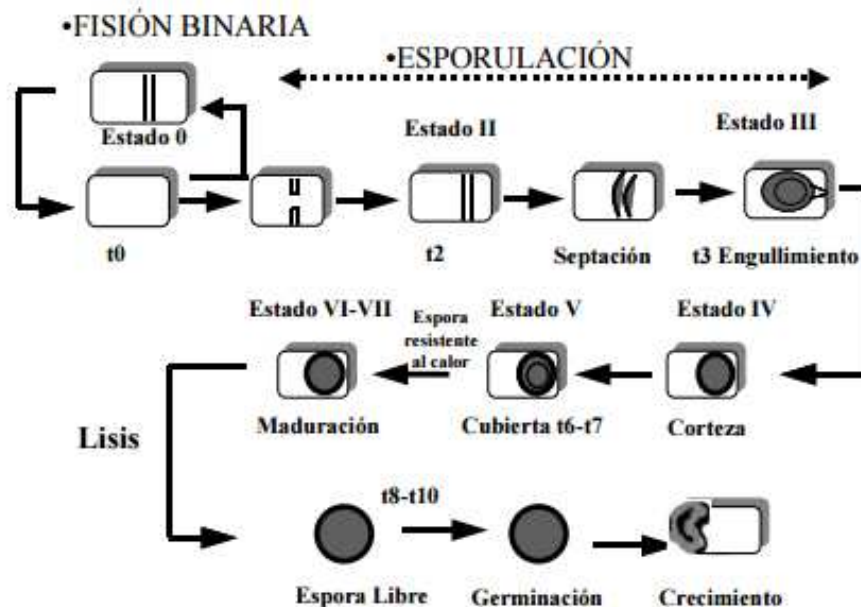


Figura 13 – Esquema representativo de los diferentes estadios comprendidos en el ciclo de esporulación de *Bacillus subtilis*.

El estadio cero se inicia como respuesta al agotamiento de nutrientes y a la producción de péptidos que sensan y responden a una alta concentración celular (Schneider y col., 2002). En el estadio II se producen enzimas hidrolíticas, como las proteasas y amilasas, y culmina con la formación de un septo en un polo de la célula. En el estadio III ocurre el engullimiento del pre-esporo, y los estadios IV al VII corresponden a la formación de la corteza, formación de la cubierta, maduración y lisis (Errington, 1993). La duración de cada etapa es de, aproximadamente, una hora (Errington, 1993). Durante esta serie de eventos se forman dos células dentro de un mismo cuerpo, la célula madre y el pre-esporo, los cuales mantienen una comunicación para poder formar el esporo conjuntamente y en un forma metabólica ordenada. La transición de un estado al otro es gobernada por seis proteínas reguladoras llamadas factores sigma, que se unen a la ARN polimerasa y determina qué promotores se reconocerán (Losick y Stragier, 1992; Stragier, 1992).

En la Figura 14 se muestra el metabolismo de *B. subtilis* como un microorganismo anaerobio facultativo, que puede utilizar tanto nitrato como oxígeno como aceptores finales de electrones.

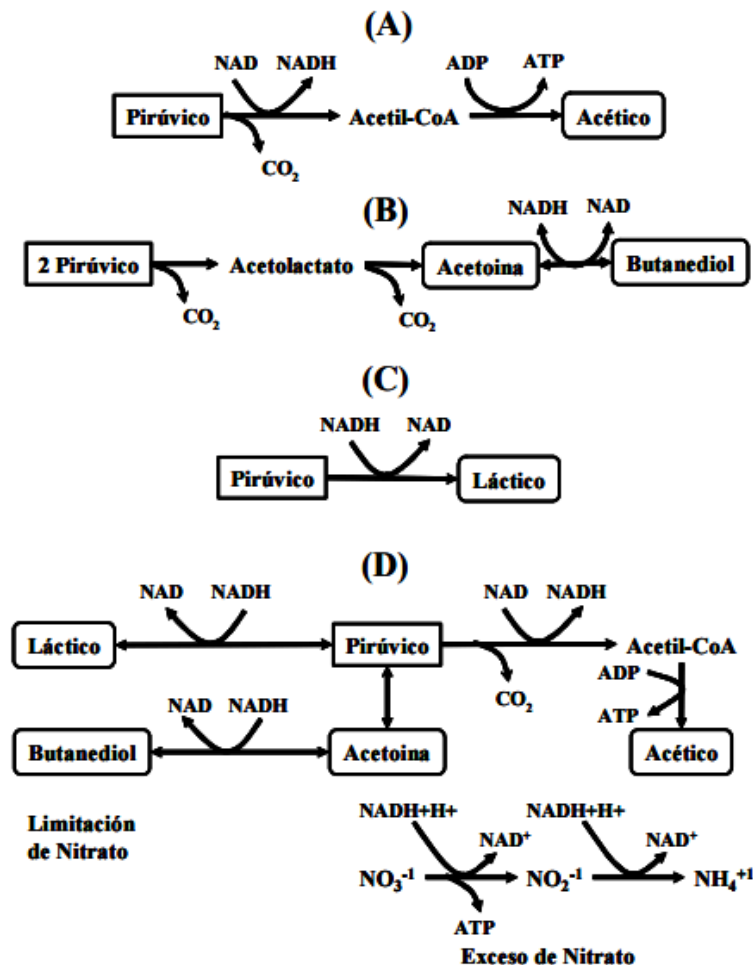


Figura 14 – Metabolismo de *B. subtilis* a partir de glucosa en condiciones aerobias (A), microaerofílicas (limitación de oxígeno) (B), fermentativas (C) y de respiración de nitratos (D).

En anaerobiosis, los productos finales del metabolismo son ácido acético, ácido láctico, acetoína y butanodiol. Cuando hay una limitación de nitrato, se produce ácido láctico, de lo contrario, se producen ácido acético y butanodiol y, frente a una limitación incipiente de nitrato, se acumula acetoína en lugar de butanodiol. El nitrato es convertido a nitrito y, después de su acumulación, se induce la expresión de la enzima nitrito-reductasa, que convierte el nitrito a amonio. Cuando se consumen el nitrato y la glucosa, no se presenta una fase estacionaria como la observada en condiciones aerobias, motivo por el cual tanto la formación de esporos, como la actividad de galactosidasa son prácticamente inexistentes.

8.3.2 Contaminación de la leche destinada a elaboración de queso con esporos de *Bacillus*

La contaminación de la leche con esporos de *Bacillus* se puede producir en los tambos (Van Heddeghem y Vlaemynck, 1993) o puede tener lugar en el ambiente de la industria láctea. Stadhouders y Spoelstra (1989) describieron la siguiente cadena de contaminación:

suelo ► forraje ► tracto digestivo ► estiércol ► ubre ► pezones ► leche
suelo ► ubre ► pezones ► leche

Es de esperar que, además del suelo, los alimentos para el ganado también jueguen un papel importante como fuente primaria de contaminación a nivel de explotación. Los esporos pueden sobrevivir en el alimento, en el tracto digestivo y, posteriormente estar presente en las heces.

Los ingredientes o concentrados empleados para suplementar las dietas del ganado suelen estar compuestos de diferentes granos o cereales (maíz y cebada), pulpa de cítricos, harina de soja, expeler de soja, etc., que se incorporan para satisfacer las necesidades energéticas de las vacas lecheras. Como contrapartida, representan una vía de ingreso frecuente de esporos de *Bacillus* (Slaghuis y col., 1997).

A continuación (Figura 15) se esquematizan las posibles vías de contaminación de la leche por esporos de *Bacillus* (Heyndrickx, 2011).



Figura 15 – Esquema de las posibles vías de contaminación en una planta quesera por esporos de *Bacillus*.

Una de las fuentes más importante por la cual se contamina la leche e ingresa a la planta es a través de la suciedad de la ubre y los pezones de los animales (Coorevits y col., 2008). La contaminación y persistencia de los esporos de *Bacillus* en los productos lácteos constituyen una preocupación real para la industria, a pesar de la constante implementación de prácticas higiénicas (Bariel y col., 2012), ya que los esporos soportan la pasteurización (HTST) comúnmente usada en las elaboraciones casearias (Ranieri y col., 2009).

8.3.3 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón tardía causado por *Bacillus*

La presencia de las especies del género *Bacillus* en las plantas lácteas es un indicador de higiene inadecuada en toda la cadena de producción primaria. Estas bacterias tienen la capacidad de fijarse a la superficie de los equipos de producción dando origen a biofilms (Flint y col., 1997). De este modo, estas bacterias pueden crecer en la zona regenerativa del pasteurizador dando lugar al desarrollo de esporos que luego pueden germinar en el queso para generar defectos gasógenos (Scott y col., 2007; Warnecke, 2001).

A continuación (Figura 16) se esquematiza la dinámica de formación de un biofilm.

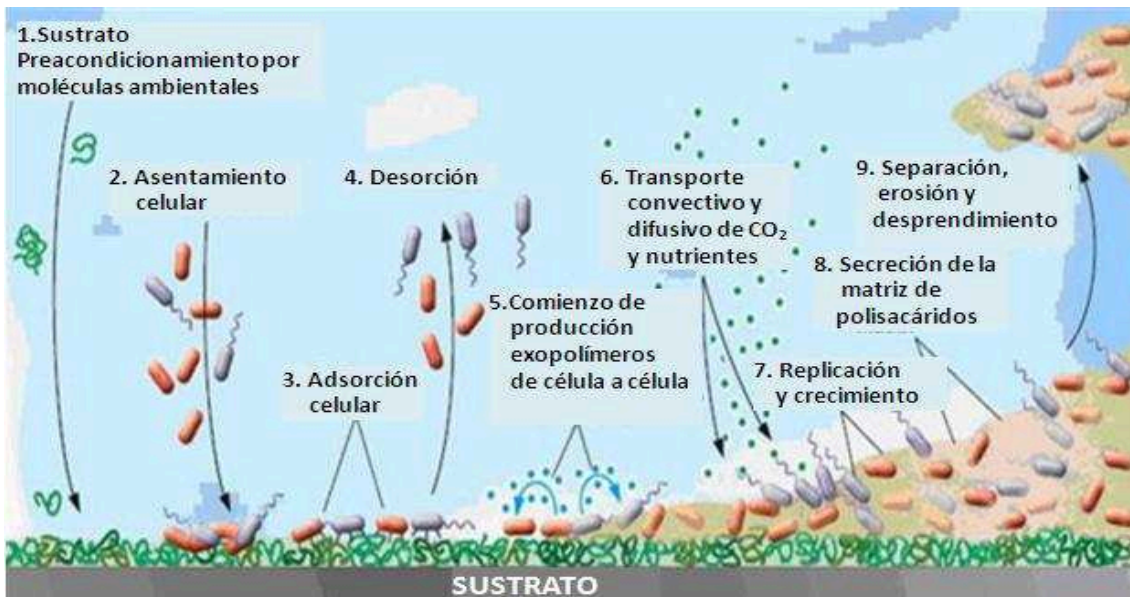


Figura 16 – Esquema simplificado de la dinámica de formación de un biofilm.

El proceso de formación del biofilm se inicia con la adherencia de células a la superficie, formando microcolonias, con la producción de exopolisacáridos y una subsecuente maduración de la biopelícula. El mecanismo de adhesión al sustrato puede ser activo o pasivo dependiendo de la movilidad de las células. Una adhesión pasiva se da por la gravedad, difusión y dinámica del fluido. En una adhesión activa la superficie de la célula bacteriana facilita el proceso. Los flagelos (presentes en ciertas bacterias, como *Bacillus*) permiten la movilidad de las células hasta el sitio específico de adhesión, luego actúan proteínas de adhesión, cápsulas y cargas electrostáticas de las superficies, facilitando el proceso de agregación y adhesión (Chmielewski y col., 2003).

Costerton y col. (1999) observaron, por medio de microscopía de contraste de fases, que antes de la adhesión, las células bacterianas exploran el área donde se van a fijar, y generalmente se localizan donde se encuentran células de la misma especie, si las hay, formando monocapas de células sobre la superficie colonizada. Estas observaciones demuestran que las mismas pueden percibir su proximidad a la superficie. Iniciando su estado de adhesión y formación de biopelícula, luego deben producir nuevo material (exopolisacáridos) para consolidar su adhesión a la superficie y a otras células bacterianas.

En la fase inicial de adhesión existe un estado reversible, que involucra fuerzas físicas como las electrostáticas y estéricas, Van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Garrett y col., 2008). En la segunda fase, un número de células adsorbidas reversiblemente permanecen inmovilizadas y se adsorben irreversiblemente por los apéndices físicos de la bacteria (flagelos, pili y fimbrias) que superan las fuerzas

físicas repulsivas de la doble capa eléctrica. Además, el contacto de los apéndices estimula las reacciones químicas de oxidación e hidratación, permitiendo la formación de enlaces con la superficie (Kumar y Anand, 1998). Consecuentemente, se requiere un mayor esfuerzo para remover la bacteria por la formación de fibrillas poliméricas, las cuales forman un puente entre la célula bacteriana y el sustrato. Este tipo de uniones toman entre 20 minutos hasta cuatro horas para formarse, a una temperatura de 20 °C (Chmielewski y col., 2003) y son tan fuertes que impiden la remoción de estas colonias ya formadas. Por esta razón se requieren tratamientos químicos fuertes, aplicación de enzimas, detergentes, sanitizantes, surfactantes y/o condiciones de calor extremas para removerlas. En fase estacionaria, las células se dividen (división binaria), y las células hijas cubren el exterior e interior del punto de adhesión hasta formar un grupo. Tales interacciones permiten el paso de nutrientes hasta el interior de la biopelícula. Después de iniciar la fase de adaptación, se presenta un rápido incremento de la población, correspondiente al crecimiento en fase exponencial. Esto ocurre por el aprovechamiento de los nutrientes del fluido o del sustrato. En este estado la liberación de polisacáridos de adhesión intercelular y la presencia de cationes divalentes, permiten una fuerte interacción entre las células. La fase de crecimiento estacionaria describe la fase donde la velocidad de división es igual a la velocidad de muerte celular. Finalmente, la fase de muerte se relaciona con el desprendimiento de la biopelícula. Las enzimas son producidas por los mismos microorganismos, para la ruptura de los polisacáridos de la biopelícula, activando el desprendimiento de la superficie de la bacteria para la colonización de sustrato fresco (Hall-Stoodley y Stoodley, 2002).

8.3.3.1 Control y remoción de biopelículas

Los nutrientes, el agua limitante, el diseño de equipos y el control de temperatura son aspectos importantes en el control de biofilms. Es muy frecuente que las variables mencionadas anteriormente no se puedan modificar, por lo tanto el control de la biopelícula queda reducido a la efectividad de la limpieza que se realice sobre las áreas y equipos de proceso. La limpieza puede estar acompañada por el uso de químicos o la combinación de efectos físicos y químicos. Los agentes químicos de limpieza suspenden y disuelven residuos de los alimentos por la disminución de la tensión superficial, emulsificación de grasas y peptización de las proteínas (Serra, 2003).

En la mayoría de las plantas de elaboración de alimentos, las superficies de contacto con los alimentos se lavan y sanitizan diariamente. En el caso de biofilms producidos por *Bacillus*, su remoción se ve afectada por la velocidad de flujo, el

tiempo, la temperatura de limpieza y el uso de agentes alcalinos y quelantes (especialmente EDTA). Estos últimos han mostrado ser más efectivos que el tratamiento con agentes ácidos. Otros tratamientos como la esterilización con vapor son también útiles en este aspecto; se ha reportado que la exposición a vapor (125°C por 30 min) de material contaminado con biopelículas es un método de limpieza altamente efectivo (Wirtanen y col., 1996). Sin embargo, el uso de vapor tiene muchas limitaciones al momento de ser aplicado a una línea de producción casearia.

La formación de biofilms, además de representar un reservorio de microorganismos contaminantes implica serios inconvenientes en las diferentes operaciones del procesamiento lácteo. La formación de depósitos en intercambiadores de calor causa una reducción en la eficiencia y un aumento en la caída de presión.

Al ser la leche un fluido biológico complejo, las respuestas térmicas de sus constituyentes difieren de una muestra a otra, generando depósitos en los equipos que se clasifican según su composición: los depósitos clase A corresponden mayoritariamente a proteínas y se producen a temperaturas entre 75 -110°C, son blancos, suaves, esponjosos y su composición es de 50-70 % proteínas, 30-40 % minerales y 4-8 % grasa; los depósitos clase B, corresponden a minerales y se forman a temperaturas superiores de 110°C, los mismos son duros y de color gris, y su composición es de 70-80 % minerales, 15-20 % proteínas y 4-8 % grasa (Bansal y Chen, 2006). Su formación promueve la adhesión de microorganismos a la superficie de la transferencia de calor, formándose una bioincrustación, con los consecuentes inconvenientes en la calidad del producto y del proceso.

Otros mecanismos de remoción de estas biopelículas consisten en aplicar ozono, agua electrolizada y lavado hidráulico, entre otros.

El interés en el ozono como alternativa al cloro y otros desinfectantes químicos en operaciones de limpieza y desinfección se basa en su alto poder biocida, amplio espectro microbiano, ausencia de productos que pueden causar daño a la salud y su posibilidad para uso *in situ*. Puede aplicarse como gas o como agua ozonizada en diferentes superficies y materiales, entre los que se encuentra el acero inoxidable, ampliamente utilizado en construcción de equipos de proceso en la industria láctea.

Por su parte, el agua electrolizada es una solución acuosa electrolizada fuertemente ácida y es un agente antimicrobiano relativamente nuevo que ha sido usado en Japón por varios años, y que tiene aplicación sobre gran variedad de microorganismos. La misma se obtiene por el paso de una solución salina diluida a través de una celda electrolítica, dentro de la cual el ánodo y el cátodo están separados por una membrana.

Finalmente, el lavado hidráulico se lleva a cabo a velocidades de aproximadamente 1,8 m/s, las cuales pueden ser adecuadas para el retiro de la biopelícula y de los productos de la corrosión y otros desechos unidos a las paredes de la tubería.

8.3.3.2 Reducción en el contenido de esporos de *Bacillus* en la leche destinada a elaboraciones casearias

El contenido de esporos en la leche destinada a elaboración de queso se puede reducir a valores aceptables utilizando bacterofugación o microfiltración.

8.3.3.2.1 Bactofugación

La bacterofugación es un proceso de separación mecánica de esporos bacterianos por centrifugación a altas velocidades que utiliza, aproximadamente, 9000 g y cuyo principio de separación se basa en la diferencia de densidad de los componentes a separar. Puede reducir sustancialmente el número de hongos y levaduras, bacterias anaeróbicas, bacterias formadoras de esporos y esporos aeróbicos y anaeróbicos presentes en la leche. Esta operación se lleva a cabo a temperaturas de 55-60°C. De esta forma se inactivan las aglutininas, inmunoglobulinas con capacidad aglutinante, disminuyendo además la viscosidad de la leche. Este proceso elimina aproximadamente entre el 80 y 90% de bacterias totales y 98 a 99,5% de esporos de *Clostridium* y *Bacillus*. El descarte del equipo que contiene alta concentración de bacterias y esporos representa aproximadamente el 0,15 a 0,2% de la alimentación, dependiendo del volumen generado. Puede descartarse o esterilizarse (120 °C durante 60 s o 140°C durante 3-4 s) para ser mezclado con leche destinada a la elaboración de algún producto o dulce de leche.

Este proceso de bacterofugación, además, va acompañado de una ligera pérdida de ingredientes lácteos, en particular proteínas (micelas de caseínas de mayor tamaño), lo que se puede traducir en una disminución del rendimiento. De cualquier forma, ante el problema de hinchazón tardía en los quesos, es un método alternativo a tener en cuenta si se compara con el agregado de sustancias inhibitorias en altas concentraciones como es el nitrato o nitrito, cuyo uso está prohibido en algunos países.

Debido a la eliminación de células sin destrucción, no se incrementa el contenido de enzimas en el sistema caseario, lo que representa una ventaja importante.

A continuación (Figura 16) se muestra esquemáticamente la ubicación de un sistema con dos equipos de bacterofugación instalados en serie para el tratamiento de la leche destinada a quesería.

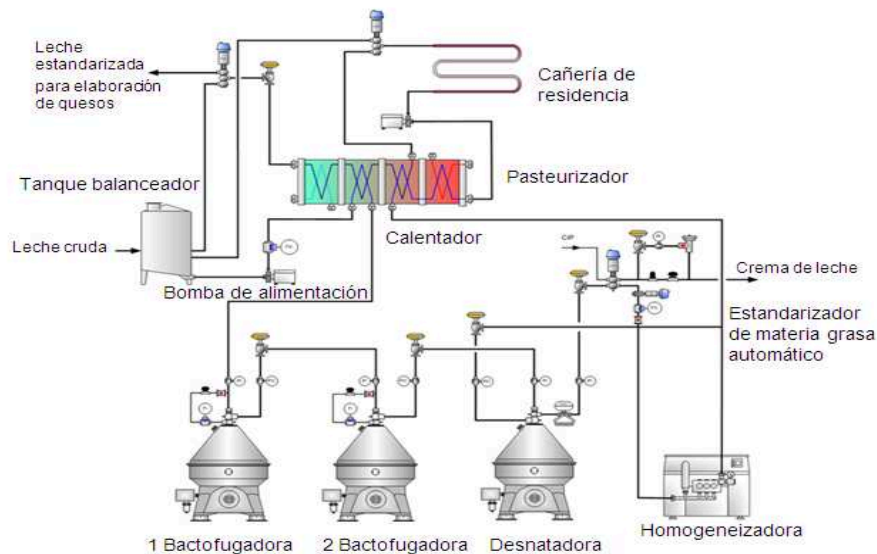


Figura 16 – Esquema de una planta de tratamiento de leche destinada a quesería.

8.3.3.2 Microfiltración

Otro proceso para remover esporos consiste en la utilización de membranas de microfiltración, si bien previamente se debe descremar la leche para luego alimentar el equipo con leche descremada. Los tamaños de poros de la membrana oscilan entre 0,8 y 1,4 micrones. El retenido o concentrado representa aproximadamente el 5 % de la alimentación y posee alto contenido de esporos y bacterias, que se puede mezclar con la crema antes de realizar un proceso térmico tipo UHT (Ultra High Temperature) a 120°C, de modo de inactivar células vegetativas y esporos.

La otra corriente que sale de la membrana, que representa el 95 % de la alimentación, se llama permeado y contiene un bajo o casi nulo contenido de bacterias y esporos de *Bacillus* y *Clostridium*. Es leche descremada destinada a elaboraciones casearias.

8.4 Bacilos esporulados anaerobios (*Clostridium*)

8.4.1 Generalidades del género *Clostridium*

El género *Clostridium* pertenece a la familia *Bacillaceae*, son bacilos esporulados, generalmente Gram+, móviles (ocasionalmente no móviles), anaerobios obligados o aerotolerantes y catalasa negativos. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 10 y los 70°C, ya que existen especies psicrófilas, mesófilas y termófilas. El rango de pH óptimo de crecimiento oscila entre 6,5 y 7. El nicho ecológico es el suelo, el intestino de los animales y del hombre.

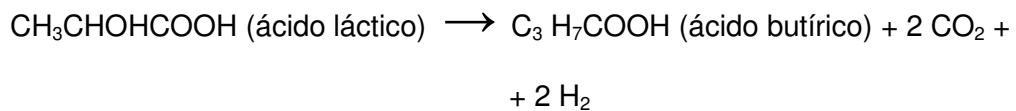
Se clasifican en grupos según las siguientes características:

- I. Esporo subterminal:

- a. No hidrolizan gelatina: Grupo I
- b. Hidrolizan gelatina: Grupo II
- II. Esporo terminal:
 - a. No hidrolizan gelatina: Grupo III
 - b. Hidrolizan gelatina: Grupo IV
- III. Especies con requerimientos especiales de crecimiento: Grupo V

8.4.2 Actividad fermentativa

Algunas especies fermentan azúcares y ácidos orgánicos, como se indica a continuación:



Los clostridios gasógenos utilizan azúcares y ácidos orgánicos, produciendo ácido butírico y gases. Es un grupo heterogéneo, las especies que se incluyen por excelencia en esta categoría son *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. butyricum*, ambos pertenecientes al grupo I.

En la Figura 17 se muestra el ciclo de vida de los clostridios. Las células vegetativas son anaerobias estrictas y las responsables de producir fermentación butírica. Por tal razón, para resistir a las condiciones de aerobiosis, esporulan. Los esporos son particularmente termorresistentes (se activan con tratamientos de 15 min a 83 °C). Cuando encuentran condiciones favorables (pH y temperatura), germinan y se multiplican.

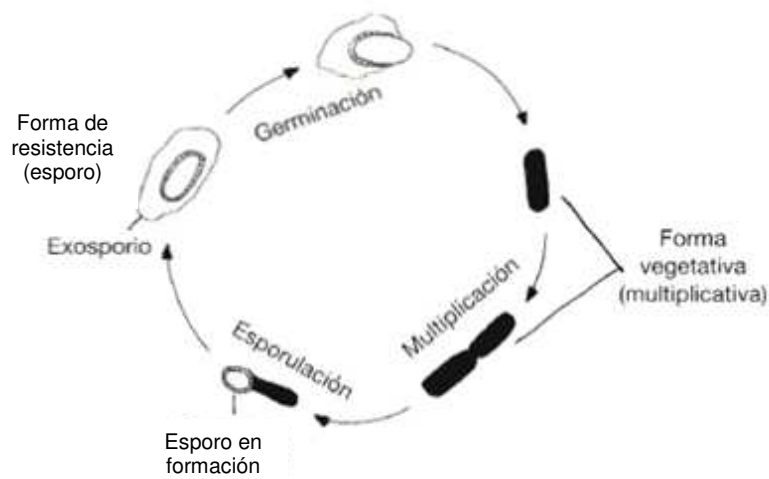


Figura 17- Ciclo de vida de los clostridios.

C. sporogenes (grupo II) es proteolítico y, frecuentemente, la formación de ácido a partir de carbohidratos está enmascarada por la formación de amoníaco procedente de la desaminación de los aminoácidos. El principal producto de la fermentación de lactosa es ácido butírico. Su desarrollo óptimo es a temperaturas entre 30°C y 40°C.

C. thermosaccharolyticum (grupo III) se ha aislado de leche esterilizada, si bien, al tratarse de un termófilo anaerobio, sólo es capaz de crecer y producir alteraciones en circunstancias excepcionales (a temperaturas elevadas). Produce fermentación sacarolítica, originando ácido acético y butírico. Fermenta la lactosa y coagula la leche. La temperatura óptima de crecimiento es 55°C.

En las elaboraciones casearias *C. tyrobutyricum* es la especie más perjudicial, ya que utiliza lactato para producir ácido butírico. Se requieren tratamientos de 3 horas a 80°C o 15 minutos a 90°C para lograr una reducción decimal de sus esporos. Debido a esta notable resistencia térmica de los esporos, se hace prácticamente imposible eliminarlos por tratamiento térmico (por ejemplo, pasteurización) durante las elaboraciones casearias. La producción de gas endógena tardía en la maduración de los quesos es el resultado de la fermentación del lactato de calcio, con producción de ácidos (butírico y acético) y gases (anhídrido carbónico e hidrógeno). La contaminación es frecuente y tiene, generalmente, origen fecal. Sin embargo, los accidentes no se producen en todos los tipos de quesos madurados sino principalmente en los de larga maduración (de pasta semidura y dura).

8.4.3 Contaminación de la leche destinada a elaboración de quesos con esporos de clostridios

El nivel de contaminación de la leche por clostridios depende del número de esporos presente en el forraje usado en la alimentación del ganado, del medio ambiente que rodea la sala de ordeño y de las condiciones de higiene durante el ordeño. Los esporos ingeridos por el animal con el alimento se eliminan con las heces, que constituyen una de las principales fuentes de contaminación de la leche.

A continuación (Figura 18) se muestra un esquema del ciclo de contaminación butírica.

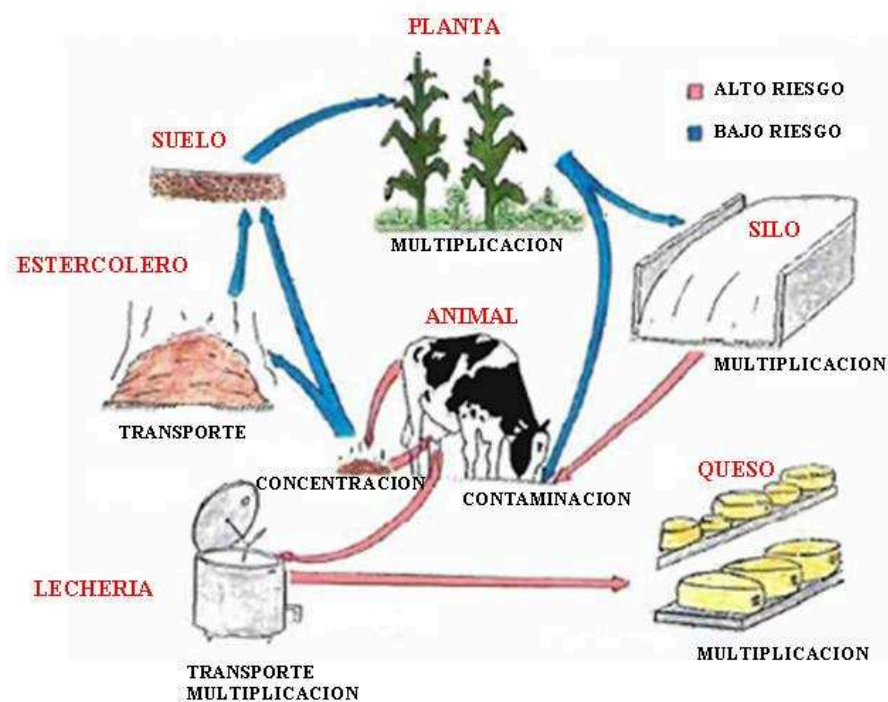


Figura 18 – Esquema del ciclo de contaminación de la leche destinada a quesería con esporos de clostridios.

El contenido de esporos en el forraje fresco suele ser bajo. El proceso del ensilado, si no se realiza adecuadamente, favorece su aumento de manera importante; su paso por el tracto digestivo y aparición en las heces no hace aumentar su número, pero sí su concentración; la aplicación del estiércol al suelo cierra el ciclo.

8.4.4 Los clostridios y el ensilaje

La conservación del forraje por fermentación acidificante constituye una modalidad muy recomendable. Las especies disponibles y el clima son importantes para decidir el método de conservación a utilizar en una región en particular. Existen

distintos tipos de forrajes conservados, dependiendo del proceso utilizado para su preservación en el tiempo: henificación, henolaje y ensilaje.

8.4.4.1 Henificación

La henificación es un método de conservación de forraje seco producida por una rápida evaporación del agua contenida en los tejidos de la planta. El contenido de humedad varía entre 15 y 20 %. La calidad está determinada por la pastura que le da origen. El correcto manejo desde que se inicia la confección del heno hasta que se lo suministra a los animales ayuda a minimizar la contaminación con microorganismos indeseables y su posterior multiplicación.

8.4.4.2 Henolaje

El henolaje o empaquetado de rollos húmedos es una técnica de conservación de reservas forrajeras que consiste en cortar el forraje y someterlo a un secado bajo la acción de los agentes atmosféricos hasta lograr un contenido de materia seca aproximado de 50 %. El tiempo de secado varía según la especie vegetal y las condiciones ambientales y tiene por objeto aumentar la concentración de azúcares, que juegan un papel fundamental en los procesos fermentativos. Una vez alcanzado el nivel de materia seca, se procede al enrollado del pasto, luego los rollos son envueltos por una máquina empaquetadora que utiliza un film de polietileno que posee la propiedad de contraerse. Una vez iniciados los procesos de fermentación y respiración del material cortado, el oxígeno se irá consumiendo rápidamente, originándose un ambiente de anaerobiosis en el que desarrollan las BAL autóctonas, presentes naturalmente en el material. Éstas fermentan los azúcares de la planta y los transforman en ácido láctico, con lo que va disminuyendo el pH hasta valores de aproximadamente 4,5 a 5,0. De este modo, se obtiene un henolaje de baja humedad.

Naturalmente, en el suelo y el forraje se encuentran BAL, enterobacterias, levaduras y clostridios. Por esta razón, para evitar el desarrollo de los clostridios en el proceso de henolaje es importante un crecimiento rápido de las BAL para acidificar el medio, lo que provoca el descenso de pH y consecuente inhibición del desarrollo de clostridios.

8.4.4.3 Silaje

El silaje es un método de conservación de forrajes o subproductos agrícolas con alto contenido de humedad (60-70 %), mediante la compactación, expulsión del aire y producción de un medio anaeróbico, que permite el desarrollo de bacterias que acidifican el forraje.

Entre las plantas forrajeras, los cereales y las gramíneas son las especies más adecuadas para la confección de ensilaje debido a su alto contenido de carbohidratos fácilmente fermentables y a su baja capacidad tampón, comparado con las

leguminosas que poseen en su estructura escaso contenido de azúcares y alta capacidad tampón. La relación entre el contenido de materia seca, los carbohidratos solubles y la capacidad tampón determinan el tipo de fermentación que ocurre en el ensilado. Por ejemplo, el maíz es una de las mejores plantas para ensilar por su alto contenido de carbohidratos solubles, su baja capacidad tampón y su contenido de materia seca superior al 30 %. Un silaje de calidad se logrará cuando el ácido láctico predomine sobre el resto de los ácidos formados, debido a que la fermentación láctica es la más eficiente, por lo que disminuye el pH del silo con mayor rapidez y de esta manera se logra retener la mayor cantidad de nutrientes. Actualmente está muy difundido en nuestro país el uso de inoculantes en base a bacterias lácticas para mejorar y preservar la calidad de los silos.

A continuación se describen las fases que ocurren durante el proceso fermentativo:

Fase I: es la etapa aeróbica de la fermentación comienza con el picado de los vegetales y continúa hasta que el oxígeno es desplazado del silo, es un período muy corto. Los azúcares de la planta se descomponen en dióxido de carbono y agua, liberando calor. Los microorganismos aeróbicos presentes en el forraje utilizan también el azúcar del vegetal como principal fuente de carbono. Esta fase debe ser lo más corta posible (preferentemente, no mayor a 2 horas) para evitar el deterioro de la calidad proteica de los vegetales.

Fase II: comienza la fase anaeróbica. Durante esta fase las diferentes poblaciones de bacterias fermentan los azúcares que son convertidos principalmente a ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono y algunos otros productos. La producción de ácidos reduce el pH del material ensilado, lo que inhibe el desarrollo de otros microorganismos indeseables, como clostridios. Esta fase, en condiciones normales, dura de uno a tres días.

Fase III: es una fase de transición donde las bacterias acéticas dan lugar a las productoras de ácido láctico, que siguen multiplicándose y, por consiguiente, bajando el pH del medio. Cuando el silaje es consumido por los animales, el ácido láctico es utilizado como fuente de energía.

Fase IV: el pH final dependerá fundamentalmente de tipo de forraje ensilado y de las condiciones de confección y almacenamiento. Por ejemplo, el silo de pastura puede alcanzar y estabilizarse con valores de pH de 4,5 y el de maíz, cercano a 4,0. Los forrajes ensilados con contenidos de humedad superiores al 70 % pueden caracterizarse por una Fase III diferente a la descrita, ya que en lugar de desarrollarse bacterias lácticas crecerán poblaciones del género *Clostridium*,

presentes en la tierra, que producen ácido butírico, con un pH final cercano a 5,0. Esta fase es la más larga.

Fase V: comprende los procesos respiratorios y de degradación que ocurren durante el suministro, ya sea en los comederos o en las superficies expuestas del silo.

La Figura 19 muestra las variaciones de pH, oxígeno y concentración de ácido láctico en las diferentes fases del silaje.

1. Fase aeróbica o de respiración
2. Fase de comienzo de la acidificación por bacterias acéticas
3. Fase de fermentación láctica
4. Fase de estabilización
5. Fase de suministro

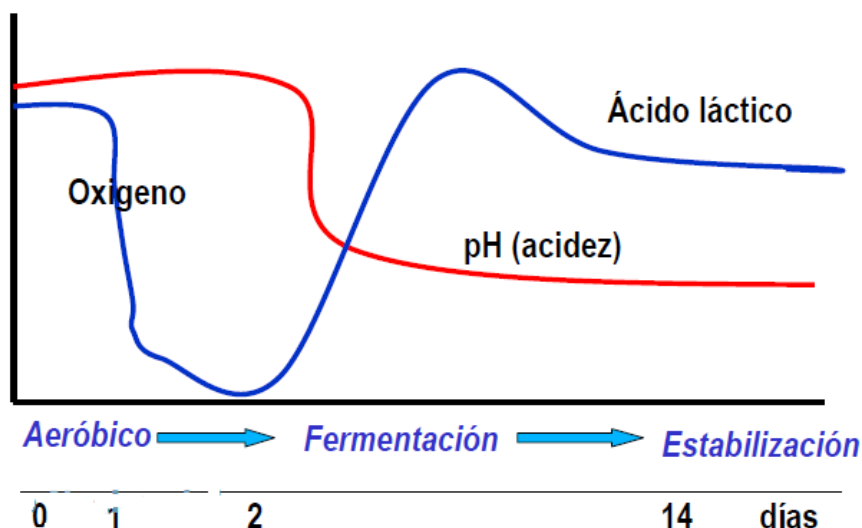


Figura 19 - Principio de conservación del silo y evolución del contenido de ácido láctico, pH y oxígeno en las diferentes fases del proceso de silaje.

8.4.5 Estrategias a utilizar para prevenir el defecto de hinchazón tardía causado por Clostridium

La mejor forma de combatir la contaminación butírica es prevenirla en su lugar de origen. Para ello son recomendables el uso de las buenas prácticas del ensilaje y el estricto mantenimiento higiénico de las instalaciones de ordeño.

8.4.5.1 Ensilaje

En el ensilaje ya se han descrito los factores que influyen en la consecución de una buena o mala fermentación y, por lo tanto, en un mayor o menor desarrollo de

clostridios. De todo ello se deducen las siguientes normas generales para la obtención de un buen ensilado:

- 1º) Ensilar forraje de calidad. Ello implica utilizar cereales y gramíneas, debido a su alto contenido de carbohidratos fácilmente fermentables y a su baja capacidad tampón.
- 2º) Presecar el forraje mediante un prehenificado, si el tiempo lo permite, o utilizando máquinas acondicionadoras.
- 3º) Evitar la contaminación de la hierba con tierra y regular la altura del corte (que no sea inferior a 7 cm para la hierba). Si el pisado se realiza con tractor, hay que cuidar que sus ruedas estén limpias.
- 4º) Limpiar adecuadamente el silo antes de empezar a llenarlo.
- 5º) Ensilar en poco tiempo, nunca más de siete días; pisar bien el forraje, de forma uniforme, cerrar rápida y herméticamente el silo, evitando que se formen bolsas de aire en su interior.
- 6º) Utilizar un aditivo, especialmente si el presecado ha sido deficiente y el forraje está muy húmedo (lluvia, hierba muy tierna, etc.). Los aditivos pueden ser químicos (inorgánicos u orgánicos, principalmente ácidos y sus sales derivadas, y además, pulpas y melazas) y biológicos (fermentos lácticos y enzimas).

8.4.5.2 Ordeño

La limpieza de los animales, de las instalaciones y utensilios utilizados son rutinas muy importantes para minimizar el riesgo de contaminación por esporos de *Clostridium* y *Bacillus*. Durante la etapa de ordeño es cuando la leche se contamina con los microorganismos, entre ellos las bacterias butíricas que se encuentran en los pezones de los animales. Es indispensable contar con una sala de ordeño que contemple diseño y terminaciones sanitarias (paredes azulejadas o de otro material impermeable y fácilmente lavable, desagüe con arqueta sifonada, buena ventilación e iluminación, suelo antideslizante, uniones redondeadas, equipos de ordeño sanitario, etc.). Otras normas generales a tener en cuenta son:

- 1º) Higiene del ordeñador, manos y ropas, etc.
- 2º) Lavado de la sala de ordeño y de la sala de espera.
- 3º) Separación de las vacas con posibles infecciones dejándolas para ordeñar al final o con otro equipo.
- 4º) Lavado individualizado de pezones para impedir la contaminación cruzada entre los cuartos de la glándula mamaria de una misma vaca.
- 5º) Secado con papel absorbente de cada pezón. Es fundamental secarlos una vez lavados para eliminar físicamente los esporos por arrastre.

- 6° Eliminación de un primer volumen de leche en un recipiente, para detectar las posibles mastitis y eliminar microorganismos del canal del pezón.
- 7° Colocación de las pezoneras con movimientos rápidos pero suaves.
- 8° Retirada de las pezoneras inmediatamente después de finalizado el ordeño, cortando el vacío y tirando con suavidad de una de ellas.
- 9° Baño desinfectante de los pezones con una solución que no irrite la piel, generalmente solución clorada o yodada.
- 10° Limpieza de la sala de ordeño con agua a presión.
- 11° Limpieza de la máquina de ordeño, según las indicaciones de los fabricantes. En general, se recomienda lavar las pezoneras exteriormente con agua fría y frotando con las manos e interiormente con agua caliente con detergente y un cepillo de cerda de plástico.

Otro punto importante a considerar es la rápida eliminación de las heces de la sala de ordeño y sala de espera del ganado para evitar el contacto.

8.4.6 Control del desarrollo de bacterias butíricas en quesos de pasta semidura y dura

8.4.6.1 Nitrato y control de temperatura de maduración

El número crítico de esporos de bacterias ácido butíricas (BAB) en la leche para que se presente el defecto en el queso es variable. Según IDF/FIL (1987) son necesarias 5 a 10 esporos/l de leche; en cambio, Fryer y Halligan (1976) señalan que la presencia de 1 esporo/ml es suficiente para que se produzca el defecto en quesos tipo Gouda madurados a 12°C. Una medida muy eficaz para prevenir la hinchazón tardía en quesos es adicionar nitrato de potasio o nitrato de sodio; la concentración máxima recomendada oscila entre 20 y 30 g/100 l de leche (Scott, 1991). Un exceso de nitrato puede inhibir el desarrollo de los fermentos lácticos y detener el proceso de maduración, generándose sabores desagradables y una coloración rojiza en el queso. En Argentina, el Código Alimentario Argentino (CAA) permite utilizar, en quesos de mediana y baja humedad, un máximo de 50 mg/kg de queso de nitrato de sodio. El nitrato presente en el queso es reducido a nitrito por acción de las enzimas de la leche o por nitrato reductasas provenientes de algunos microorganismos. La acción antimicrobiana del nitrito se atribuye al ácido nitroso y los óxidos que se forman a partir de él (Gloria y col., 1997; Spahr y Url, 1994). Durante la maduración, los valores de nitrato se reducen en el queso, proceso que es variable y dependiente de la tecnología utilizada en la elaboración del mismo (Molina y col., 1999).

La tendencia a nivel mundial es reducir el consumo de nitratos y nitritos debido a un posible efecto carcinogénico del nitrito y sus derivados. Es así como en Francia, Grecia e Italia no se permite la adición de nitrato a la leche para la elaboración de queso, mientras que en Alemania y Holanda el máximo permitido es de 15 g de nitrato de potasio/100 kg de leche (Burt y col., 1997).

Schöbitz y col. (2005) estudiaron el efecto de la temperatura de maduración y la concentración de nitrato sobre el desarrollo de las BAB en queso tipo Gouda. Se elaboraron quesos con cuatro concentraciones de nitrato (0, 0,015, 0,020 y 0,030 %), los cuales se almacenaron a tres temperaturas (4, 10 y 16°C), durante 6, 12 o 18 semanas. Para cada tiempo y temperatura de maduración se elaboraron tres quesos, en tres fechas diferentes. Se determinó el Número Más Probable (NMP) de BAB utilizando la técnica de Fryer y Halligan modificada (Fyer y Halligan, 1976). Se encontró un bajo número inicial de esporos de BAB en la leche, sin embargo, a las seis semanas ya se observó el desarrollo de estas bacterias en los quesos sin nitrato. La maduración a 16°C fue favorable para el crecimiento de BAB, detectándose para los tratamientos sin nitrato valores de NMP superiores a 1,1/g, en cambio a las demás temperaturas solo en algunas muestras hubo desarrollo de BAB. El nitrato fue efectivo para inhibir el desarrollo de BAB, incluso a 16°C, no encontrándose diferencias en el nivel de inhibición entre las tres concentraciones estudiadas. Esto probablemente se debió al bajo número inicial de esporos en la leche. La identificación de las BAB mostró una mayor presencia de *C. tyrobutyricum* en relación a *C. butyricum* y *C. sporogenes*. En este trabajo se concluyó que la maduración de queso tipo Gouda a temperaturas inferiores a 10°C es una barrera efectiva para inhibir el crecimiento de BAB, incluso sin la adición de nitrato. A 16°C las BAB también fueron inhibidas en presencia de nitrato, sin embargo, hubo un desarrollo significativo en el tratamiento sin este compuesto.

8.4.6.2 Agua oxigenada

El agua oxigenada o peróxido de hidrógeno (H₂O₂) oxida algunos compuestos esenciales para el crecimiento microbiano, por lo que inhibe el desarrollo de los clostridios. El efecto del agua oxigenada depende de la concentración de uso, su distribución, el grado de contaminación microbiana y la presencia de células somáticas. Se recomienda una concentración de 0,1 % (130 volúmenes) durante 24 horas a 28°C. Sin embargo, para leches muy contaminadas la dosis efectiva puede ser del orden de 10 veces superior. Tras el tratamiento se adiciona catalasa; si bien esta

enzima descompone el agua oxigenada en compuestos inocuos para la salud (agua y oxígeno), provoca la oxidación de algunos componentes lácteos, así como la hidrólisis de ciertos enlaces de las caseínas, dando lugar a una cuajada más blanda y a un incremento del tiempo de coagulación, lo que representa una verdadera desventaja.

8.4.6.3 Lisozima

Las lisozimas son glucosaminidasas o muramididasas que provocan la hidrólisis del polisacárido que constituye la pared celular de ciertas bacterias, causando su destrucción. Los polisacáridos están constituidos por un encadenamiento de glucosamina y ácido murámico, al cual están ligados los péptidos. Estas enzimas están muy difundidas en los reinos animal y vegetal. Desde el punto de vista químico son péptidos básicos de bajo peso molecular (14000 a 18000 Da), muy estables al calor. La leche de vaca normal no contiene lisozima en cantidades apreciables.

La lisozima inhibe las fermentaciones butíricas, por esta razón se la utiliza en la elaboración de algunos tipos de quesos de pasta dura o semidura para evitar los accidentes de fermentaciones tardías provocados por los clostridios. El CAA permite la utilización de un máximo de 25 mg/l de leche en elaboraciones de quesos de mediana y baja humedad.

8.4.6.4 Formaldehído

La legislación italiana ha permitido el empleo de 25 ppm de formaldehído para prevenir la hinchazón tardía del queso Grana Padano y del Provolone. En nuestro país, el CAA no permite la utilización de este conservante en las elaboraciones casearias.

8.4.6.5 Bactofugación

Este método físico de eliminación de esporos se aplica para minimizar el riesgo por contaminación por *Clostridium*, como se indicó cuando se describió su aplicación para eliminar esporos del género *Bacillus*.

8.4.6.6 Desnatado estático

Consiste en un simple proceso de desnatado por gravedad (afloramiento), por el que se obtienen finalmente dos fracciones, una fracción no grasa (70 % p/v) del total y una fracción grasa donde se localizan los esporos. Esta última fracción, una vez separada, se puede someter a un proceso de bactofugación o a un tratamiento térmico UHT para la eliminación de los esporos. Esta nata así tratada se adiciona después al resto de la leche para su estandarización.

Como en el caso de la bacto-fugación, la eliminación de esporos, aún en las mejores condiciones, no es del 100 %, por lo que en casos de contaminación importante, sólo debe constituir un método complementario.

8.4.6.7 Microfiltración

Como se indicó anteriormente, el método de microfiltración consiste en el pasaje de fracción no grasa de la leche (obtenida mediante desnatado estático o con una desnatadora) a través de una membrana de diámetro de poro de 1,4 µm. Las proteínas, los azúcares, las sales minerales y los pequeños glóbulos de grasa son permeables y atraviesan el microfiltro. En la membrana quedan retenidas al menos el 99,5 % de los esporos y bacterias presentes.

8.4.6.8 Empleo de fermentos primarios productores de bacteriocinas

De un modo similar al descrito para la problemática causada por las NSLAB, las bacteriocinas son compuestos peptídicos sintetizados por algunas bacterias (entre ellas, ciertas BAL) que presentan un amplio potencial como conservantes, ya que inhiben el crecimiento de otros microorganismos similares. En particular, las producidas por BAL resultan de gran interés para la industria alimentaria debido a que son comúnmente sintetizadas por BAL comerciales (lactococos, lactobacilos, pediococos, etc.), son consideradas seguras para el consumo, no son tóxicas para las células eucariotas y presentan un espectro de inhibición más amplio en relación a compuestos similares sintetizados por bacterias Gram-negativas. Algunos ejemplos de estas sustancias incluyen pediocinas, lactocinas, enterocinas, nisinas, etc.

Existen numerosos trabajos publicados que demuestran el beneficio de utilizar bacterias productoras de bacteriocinas para inhibir el desarrollo de los clostridios. Las principales condiciones que deben reunir las bacterias utilizadas con este fin son:

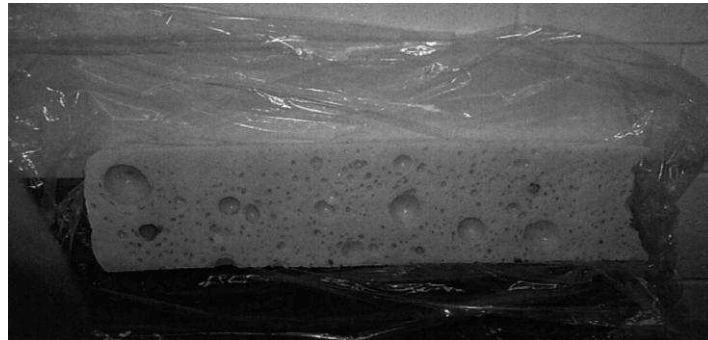
- a- no debe inhibir a las bacterias que constituyen el fermento primario;
- b- deben ser seguras para el consumidor (*Generally Regarded as Safe* o GRAS);
- c- no deben acidificar.

Por ejemplo, Matijasic y col. (2007) demostraron la inhibición en el desarrollo de esporos de *C. tyrobutyricum* en elaboraciones de queso semiduro, utilizando la cepas de *Lb. gasserii* productoras de acidocina. En este caso, la bacteria adicionada sobrevivió a la tecnología de elaboración y luego de 8 semanas de maduración se confirmó su presencia y, asimismo, su potencial efectividad frente a los esporos.

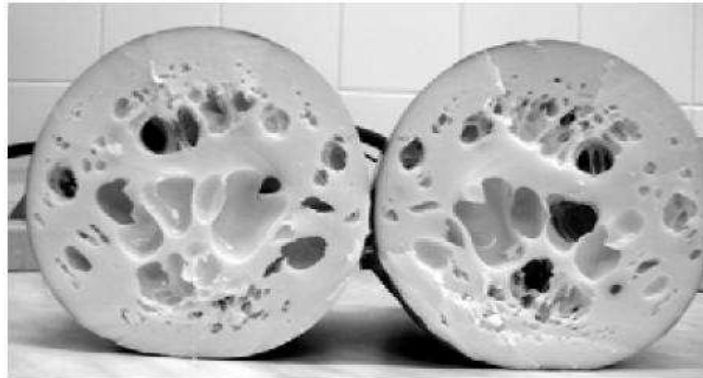
En un trabajo más reciente (Garde y col., 2011) se evaluó el uso como *starter* de la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415, productora de Nisina Z, para el control de *C. beijerinckii* INIA 63 en un queso modelo contaminado artificialmente. Se observó, luego de 120 días de maduración, una minimización del defecto de hinchazón tardía en los quesos, sin alterar sus características sensoriales.

De un modo similar, Martínez-Cuesta y col. (2010) demostraron que la laticina 3147, una bacteriocina de dos péptidos producida por *L. lactis* IFPL 3593, puede actuar como biopreservante frente a la contaminación con esporos de clostridios en quesos semiduros, observando reducciones de 5 órdenes log, minimizando así los defectos de hinchazón.

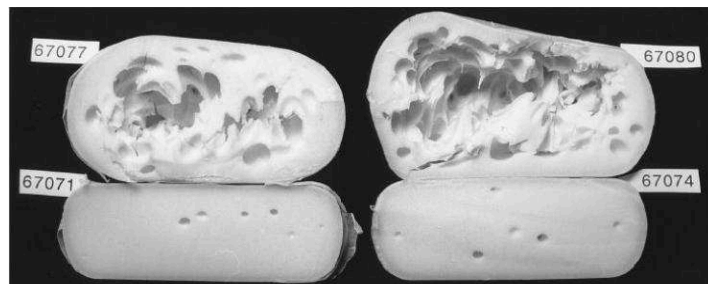
En la Figura 19 se observan imágenes de diferentes tipos de quesos con problemas de hinchazón tardía causada por *Clostridium*.



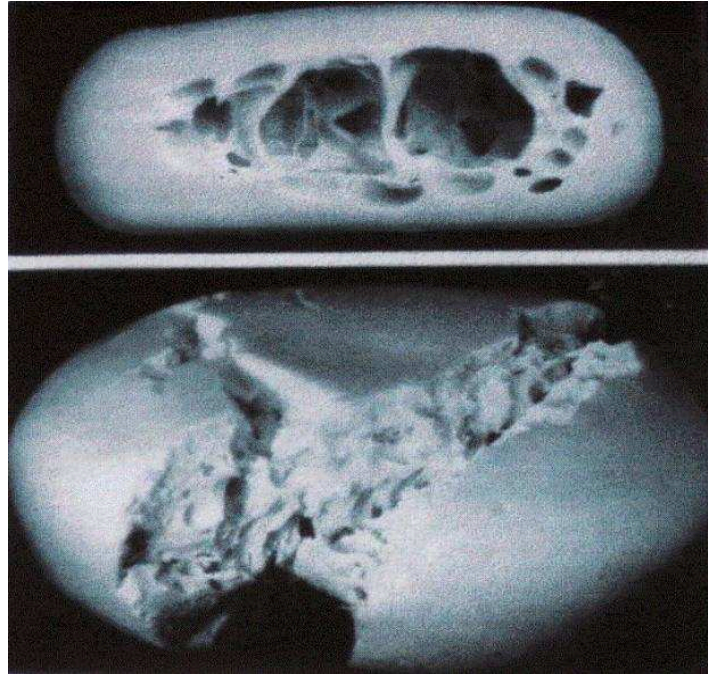
A



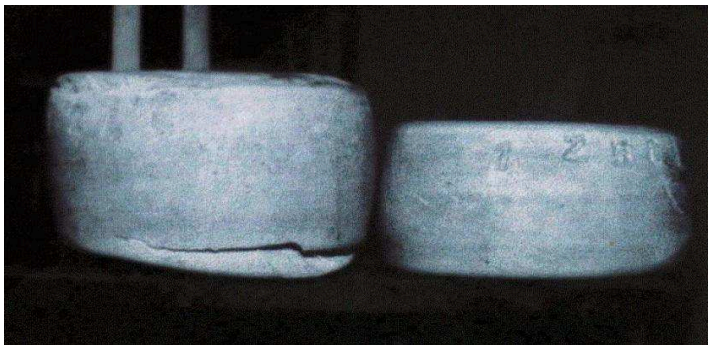
B



C



D



E

Figura 20 – Defectos de hinchazón tardía causados por esporas de *Clostridium* en quesos: A, queso tipo suizo contaminado con *Cl. tyrobutiricum*; B, queso Edam contaminado con *Clostridium* sp.; C, quesos tipo suizo con fermentación butírica (identificados como 67077 y 67080) y sin fermentación butírica (67071 y 67074); D, queso Gouda contaminado con *Cl. tyrobutiricum*; E, queso Grana contaminado con *Clostridium* sp.

Las Figuras 21, 22 y 23 muestran criterios en la valoración establecidos en Italia y Francia para los niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en diferentes ambientes (heces, ensilajes y leche) (Gaggiotti, 2000).

Criterios de aceptación para heces en función del número de esporos de clostridios gasógenos presentes, utilizados en Italia y Francia.

Niveles de contaminación (esporos/g)	Italia	Francia
	Valoración (calidad leche)	
<10.000		poco contaminada
10.000 a 40.000		contaminada
>40.000		muy contaminada

Figura 21 – Valoración de niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en heces utilizados en Italia y Francia.

Criterios de aceptación para ensilajes en función del número de esporos de clostridios gasógenos presentes, utilizado en Italia y Francia

Niveles de contaminación en silajes (esporos/g)	Italia	Francia
	Valoración (calidad forraje)	
<100	óptima	muy buena
100 a 1.000	buena	buena
1.000 a 5.000	mala	mediocre
5.000 a 10.000	mala	mala
>10.000	pésima	muy mala

Figura 22 – Valoración de niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en silajes presentados en Italia y Francia.

Niveles de contaminación en leche en función del número de esporos de clostridios gasógenos presentes, utilizados en Italia y Francia		
Niveles de contaminación (esporos/l)	Italia	Francia
	Valoración	
	(quesos)	(calidad de leche)
<200	ausencia de hinchazón	
<400		excelente
200 a 1.000	algunos casos de hinchazón	
400 a 1.000		poco contaminada
1.000 a 4.000	hinchazón muy difundida	contaminada
4.000 a 10.000		muy contaminada
>10.000		pésima

Figura 23 – Valoración de niveles de contaminación en leche con esporos de clostridios gasógenos utilizados en Italia y Francia.

8.5 Otras bacterias que pueden causar defectos gasógenos en quesos

En el presente TFI, cabe mencionar a modo de un breve comentario, dos especies bacterianas que pueden generar defectos gasógenos en ciertos casos particulares: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus* (ureasa +).

St. thermophilus (ureasa +), a través del metabolismo de la urea de la leche (aproximadamente 250 mg/l), produce dióxido de carbono (CO₂) y amoníaco NH₃ (Juillard y col, 1988; Miller y Kandler, 1967; Tinson y col., 1982), dando lugar a defectos de hinchazón tardía. Cuando está presente en la leche cruda, puede desarrollarse a temperaturas de 45°C y, además, es capaz de sobrevivir a un tratamiento térmico como la pasteurización HTST (72°C durante 15 s). Se recomienda no usar los intercambiadores de calor de placas durante períodos de tiempos demasiado largos sin intercalar ciclos de limpieza porque favorece el desarrollo de *St. thermophilus*, pudiendo llegar a concentraciones de 10⁶ UFC/ml. Luego, en las primeras etapas de elaboración, puede desarrollar alcanzando concentraciones de 10⁸ UFC/g de queso.

L. lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* utiliza citrato para producir compuestos aromáticos tales como acetoína, diacetilo y CO₂, lo que también puede causar defectos de hinchazón en los quesos.

9. Detección de problemas de defectos gasógenos en quesos de la región

En la Argentina, el país productor de leche más importante de América del Sur, se producen anualmente 9300 millones de litros de leche. De éstos, 3100 millones de litros están destinados a la elaboración de quesos (1730 millones de litros para quesos blandos y 1370 millones de litros para quesos semi-duros) (Industria lechera, 1999), siendo la región del Centro Este la principal área argentina de producción de queso. Varias plantas industriales queseras importantes fueron gravemente afectadas por fenómenos gasógenos indeseables en los últimos años, asociados siempre a pérdidas económicas importantes.

Tomando en cuenta los criterios de valoración de niveles de esporos de clostridios establecidos en Francia e Italia, en la cuenca lechera santafesina y el noreste de la provincia de Córdoba se determinaron los niveles de contaminación en leche cruda (Figuras 24 y 25; Gaggiotti, 2000). Como puede observarse:

- 48% del volumen total de leche tuvo un nivel de contaminación que podría provocar hinchazón generalizada en quesos (según el criterio italiano);
- 8% del volumen total de leche resultó muy contaminada y 22% de calidad pésima para la elaboración de quesos (según el criterio francés).

Cabe remarcar que en este relevamiento no se evidenció una marcada incidencia del período del año en el nivel de contaminación por esporos de clostridios.



Figura 24 – Niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en leche cruda, según criterio de evaluación italiano.

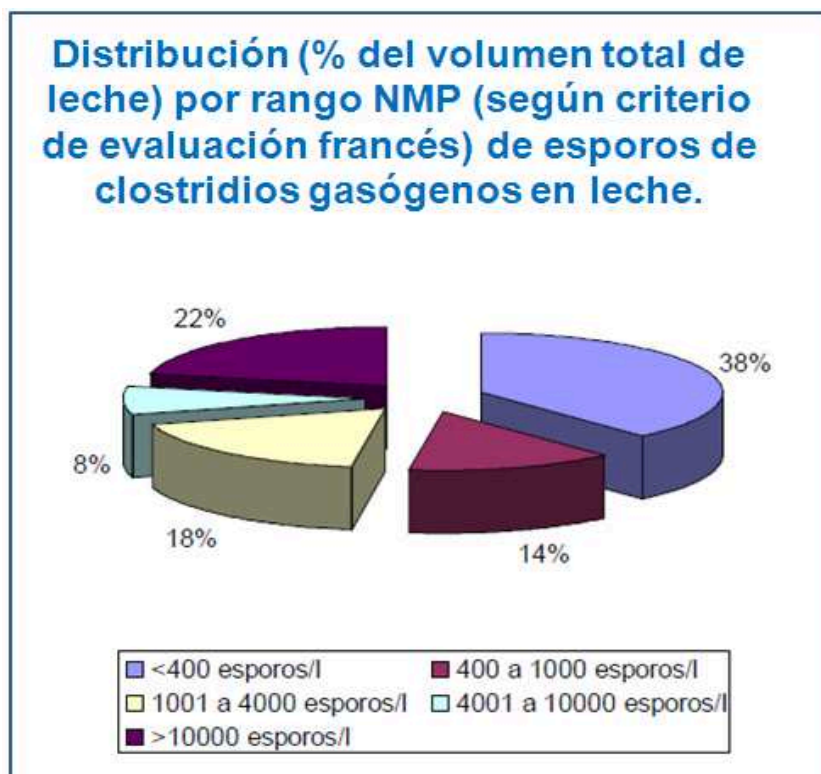


Figura 25 – Niveles de contaminación con esporos de clostridios gasógenos en leche cruda, según criterio de evaluación italiano.

En un relevamiento realizado en el Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET) con diferentes quesos Argentinos con problemas de hinchazón, y evaluados durante 5 años de muestreo (1999-2003; Tabla 2; Quiberoni y col., 2008), las muestras de queso cremoso (6 del total) fueron afectadas por bacterias heterofermentativas (*Leuconostoc*, 5 casos y *Lactobacillus*, 1 caso) y bacterias aeróbicas formadoras de esporos (*B. polymyxa*, 1 caso); en los quesos mozzarella se detectaron bacterias aeróbicas formadoras de esporos (*B. polymyxa*, 2 casos y *B. macerans*, 1 caso); los quesos semiduros (7 del total) mostraron deterioro derivado de una combinación de bacterias aeróbicas y anaeróbicas formadoras de esporos (*B. macerans* y *Cl. tyrobutyricum*) o una combinación de *Cl. tyrobutyricum* con un crecimiento excesivo de *Propionibacterium* (3 casos); en quesos Fontina (2 casos), se detectaron propionibacterias junto a lactobacilos heterofermentativos (*Lb. fermentum*); en una única muestra de queso Danbo, la única bacteria productora de gas detectada fue *Lb. fermentum*.

Cuando se analizaron muestras de quesos elaborados con leche pasteurizada (provenientes de la planta identificada como B), se encontró una muy baja incidencia de bacterias productoras de gas viables, ya que sólo 3 de ellas (7% de las muestras analizadas) contenían clostridios, mientras que en 2 casos (4%) se detectó la presencia de *Bacillus*.

En los quesos elaborados en la planta A se encontró una mayor frecuencia de muestras positivas: 15 (30% de las muestras totales) contenían bacterias viables formadoras de esporos (en 8 se encontraron clostridios; en 4, *Bacillus* y en 3, ambos géneros), 3 muestras contenían leuconostoc (*Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* en 2 muestras y una combinación de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Ln. mesenteroides* ssp. *lactis* en la otra muestra) y 6 muestras con presencia de lactobacilos heterofermentativos (identificados como *Lb. viridescens*).

Por otro lado, en la leche pasteurizada utilizada para la elaboración de queso en dos de las plantas muestreadas se detectaron clostridios, *Bacillus*, *Leuconostoc* y lactobacilos heterofermentativos viables. Este hecho sugiere que: (i) estos organismos estaban presentes en la leche cruda y fueron resistentes a los tratamientos térmicos aplicados a la leche de queso; o que (ii) los organismos estaban asociados al pasteurizador (como biofilms, por ejemplo) y contaminaron la leche después del tratamiento térmico.

Es importante remarcar que este fue el primer trabajo que asoció *Bacillus* a problemas de hinchazón en quesos blandos y semi duros, involucrando especies como *B. polymyxa* (queso Cremoso y Mozzarella) y *B. macerans* (quesos Mozzarella y Taluhet), quedando claramente evidenciado que los quesos de pasta blanda y

semidura pueden sufrir deterioros por defectos gasógenos debido a una gran diversidad de bacterias productoras de gas.

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GAS ASOCIADOS A DEFECTOS GASÓGENOS EN QUESOS DE PASTA BLANDA Y SEMIDOURA EN ARGENTINA

Nº de Muestra (mes/año)	Tipo de Queso/Fermento Iniciador/Planta Quesera	Microorganismo Productor de Gas	Recuento de m.o. productores de gas (ufc/g)
1 (10/1999)	Cre moso/S.thermophilus/D	<i>Bacillus polymyxa</i>	$10^5 - 10^{6d}$
2 (11/2000)	Cre moso/S.thermophilus/D	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.lactis</i>	6.4×10^7
3 (05/2001)	Mozzarella/S.thermophilus/E	<i>Bacillus polymyxa</i>	$10^5 - 10^{6d}$
4 (06/2001)	Mozzarella/S.thermophilus/E	<i>Bacillus polymyxa</i>	$10^5 - 10^{6d}$
5 (06/2001)	Mozzarella/S.thermophilus/E	<i>Bacillus macerans</i>	$10^5 - 10^{6d}$
6 (08/2001)	Taluhet/S.thermophilus/F	<i>Bacillus macerans/Clostridium tyrobutyricum</i>	$10^5 - 10^{6d} / 10^5 - 10^{6d}$
7 (10/2001)	Cre moso/S.thermophilus/A	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.dextranicum</i>	2.5×10^7
8 (10/2001)	Cre moso/S.thermophilus/A	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.dextranicum</i>	1.6×10^7
9 (11/2001)	Fontina/S.thermophilus + L.helveticus/C	<i>Propionibacterium sp./Lactobacillus fermentum</i>	$4.0 \times 10^9 / 10^5 - 10^{6d}$
10 (05/2002)	Colonia/S.thermophilus + L.helveticus/C	<i>Propionibacterium sp./Clostridium tyrobutyricum</i>	$2.5 \times 10^{10} / 10^5 - 10^{6d}$
11 (05/2002)	Colonia/S.thermophilus + L.helveticus/C	<i>Propionibacterium sp./Clostridium tyrobutyricum</i>	$3.5 \times 10^7 / 10^5 - 10^{6d}$
12 (05/2002)	Colonia/S.thermophilus + L.helveticus/C	<i>Propionibacterium sp./Clostridium tyrobutyricum</i>	$5.0 \times 10^7 / 10^5 - 10^{6d}$
13 (10/2002)	Cre moso/S.thermophilus/A	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.dextranicum^b</i>	$10^7 - 10^{6d}$
14 (10/2002)	Cre moso/S.thermophilus/B	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp.dextranicum^c</i>	$> 10^8$
15 (10/2002)	Fontina/S.thermophilus + L.helveticus/A	<i>Propionibacterium sp./Lactobacillus fermentum</i>	$7.0 \times 10^8 / 10^5 - 10^{6d}$
16 (02/2003)	Danbo/S.thermophilus + L.helveticus/A	<i>Lactobacillus fermentum^b</i>	$10^8 - 10^{7d}$

^aUno, ^bdos o ^ctres cepas aisladas. ^dConteos obtenidos en límites de diluciones (rango, número de células por gramo)

Tabla 2 - Microorganismos productores de gas asociados a defectos gasógenos en quesos de pasta blanda y semidura en Argentina (Quiberoni y col., 2008)

10. Posibles fuentes de ingreso de microorganismos a las plantas queseras

10.1. Calidad de agua utilizada en el proceso

El agua utilizada para el lavado de superficies que tendrán contacto con los alimentos debe ser potable y tener una concentración de 1 a 2 ppm de cloro libre residual (IDF/FIL, 1994). Estos valores concuerdan con un estudio realizado por Zhao y col. (2001), quienes encontraron que *E. coli* fue sensible a concentraciones de 1,1 ppm de cloro libre.

Según la normativa chilena (Chile, INN, 1984), el agua potable debe estar exenta de microorganismos indicadores de higiene deficiente y posible contaminación fecal, determinado por la presencia de gérmenes del grupo coliformes. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1964), recomienda para las muestras de agua un NMP de bacterias coliformes inferior a 10/100 ml de agua, señalando que más de dos muestras consecutivas no deben presentar un índice NMP entre 8 y 10 coliformes/100 ml.

Agüero (1987) reportó que la existencia de un alto recuento de bacterias totales y coliformes en agua disminuye la eficiencia de los procesos de higienización y

contribuye a elevar el contenido microbiano de la leche, con los consecuentes problemas tecnológicos. Además, al ocurrir una contaminación fecal del agua, ello implica riesgo de presencia de patógenos, ya que éstos pueden multiplicarse, ya sea en la leche o en la superficie de equipos o estanques mal lavados (Heimlich y Carrillo, 1995). También, Cosentino y Palmas (1997) señalaron que la calidad del agua es la que define la calidad de la limpieza de los equipos.

Por otro lado, el agua es una importante fuente de microorganismos psicrotrofos, que al contaminar la leche pueden causar problemas tecnológicos debido fundamentalmente a la acción de sus enzimas proteolíticas y lipolíticas termoestables, que pueden producir alteraciones en el sabor y olor de la leche y productos lácteos (Cousin, 1982).

10.2. Calidad de aire en sala de elaboración

Según IDF/FIL (1997), la contaminación del aire también es un factor que afecta la calidad del producto, y puede presentar una carga indeseable de microorganismos provenientes de diversas fuentes como es el personal, ya sea por un excesivo tránsito de operarios en las diferentes áreas de procesos, a través de zapatos, vestuario e higiene personal. La contaminación del aire puede tener lugar también en la sala de proceso, ya sea por paredes y suelo sucios o por gotas del condensado que pueden caer de algunas cañerías o del techo. Robinson (1987) indica que la principal fuente de contaminación del aire son los operarios y materiales de empaque, y para proteger el producto de una contaminación microbiana, es esencial implementar mecanismos de ventilación y filtración de aire, principalmente en plantas pequeñas. De esta forma, se elimina la humedad liberada durante el proceso y se previene la condensación y el consecuente enmohecimiento de la superficie de las paredes. Este autor indica también que la humedad de las dependencias de procesado no debe superar el 95 % de humedad relativa, proponiendo una clasificación tentativa para el recuento microbiano del aire de diversas zonas de proceso productivo, de acuerdo a la siguiente tabla (Tabla 3):

Productos de la zona	Recuento total ufc/m ³		Mohos y levaduras ufc/m ³	
	Bueno	Malo	Bueno	Malo
Leche, queso Cottage	1,5x10 ²	1,5 x10 ³	5,0 x10 ¹	1,2 x10 ³
Quesos madurados	3,0 x10 ²	2,0 x10 ³	4,0 x10 ²	2,0 x10 ³

Tabla 3 – Clasificación para el recuento microbiano del aire en diversas áreas de procesamiento de quesos y leche (Robinson, 1987).

10.3. Higiene de las superficies de los equipos

Una buena limpieza se logra cuando no quedan residuos orgánicos sobre la superficie de los equipos que faciliten la propagación de bacterias, ya que con la higienización se reduce o destruye el número de bacterias presentes en éstos (Poblete, 1998). Los sitios de multiplicación de bacterias en la plantas de productos lácteos, principalmente del género *Bacillus*, se encuentran en la sección del pasteurizador y tanques de almacenamiento de la leche previo a la coagulación y adición de los cultivos (Hull y col., 1992). Bachmann y Spahr (1995) indican que los microorganismos pueden multiplicarse en las instalaciones y, a través de la formación de biofilms, dan lugar a una permanente contaminación. Por ejemplo, Lehmann y col. (1992) reportaron recuentos totales de bacterias en leche cruda del orden de 2 a 6×10^6 UFC/ml en cinco silos, pero al pasteurizar la leche, el número de bacterias de la leche sobre la superficie de las placas del pasteurizador se incrementó paulatinamente desde un recuento inicial de 7×10^3 a 2×10^4 UFC/ml, para las primeras 10 horas de operación del pasteurizador a 72°C . Posteriormente, los recuentos aumentaron a mayor velocidad, llegando a 2×10^6 UFC/ml a las 16 horas de operación del equipo. Para solucionar esta problemática, los autores señalan que los niveles de bacterias en leche cruda deben ser minimizados e implementar un procedimiento de lavado del pasteurizador con agua y soluciones alcalinas, aproximadamente cada 6 a 8 horas de uso de este equipo.

El control de la presencia de bacterias sobre los equipos es importante para evaluar la eficiencia del proceso de limpieza y para asegurar las condiciones higiénicas de la planta. Robinson (1987) describió diferentes grados de limpieza, según la contaminación microbiana de las superficies limpias de equipos (Tabla 4).

Grado	Bacterias /100 cm ²	Bacterias /cm ²
Bueno	< 10	< 0,1
Satisfactorio	10 – 50	0,1 – 0,5
No satisfactorio	> 50	> 0,5

Tabla 4 – Clasificación de los tratamientos de higienización, según la presencia de microorganismos en superficies limpias de equipos de procesos lácteos (Robinson, 1987).

10.4. Higiene en las plantas queseras

Según IDF/FIL (1984), el principal objetivo de optimizar la higiene de una planta es asegurar que las superficies no contaminen el producto; sin embargo, si la contaminación ya ha tenido lugar, es posible determinar a través de muestreos en la

línea el lugar donde ha ocurrido la contaminación bacteriológica o química. En la Figura 20 se indican las posibles fuentes de contaminación post pasteurización, señaladas por IDF/FIL (1994).

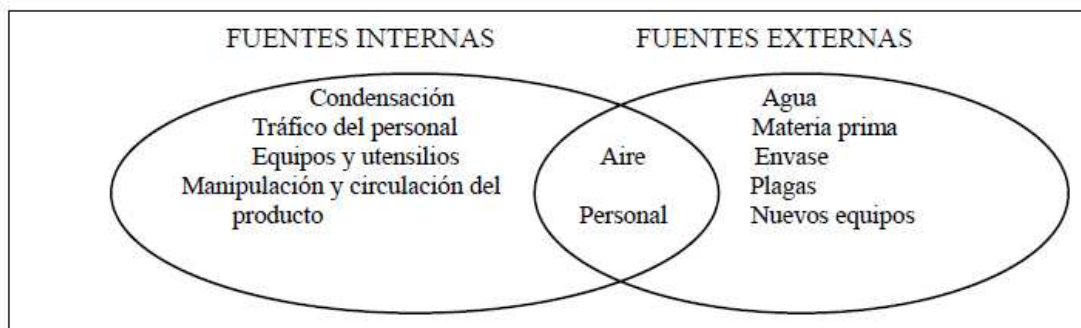


Figura 26 – Fuentes internas y externas de contaminación del producto en la planta procesadora de alimentos (IDF/FIL, 1994).

11. Criterios para el diseño sanitario de salas de proceso con el objetivo de minimizar la contaminación microbiológica de los quesos

Se pueden clasificar las áreas donde los requerimientos de limpieza, desinfección y calidad de aire son diferentes, de acuerdo a si el producto alimenticio (queso) está expuesto al ambiente o no:

Área limpia de trabajo (Zona I): área de trabajo con alto grado de limpieza, donde el producto semielaborado y elaborado están expuestos al ambiente sin ninguna protección externa.

Área semilimpia de trabajo (Zona II): área de trabajo con un grado de limpieza menor al del área limpia de trabajo, por ejemplo sala de pre-tratamiento de materia prima, etc.

Área común de trabajo (Zona III): área de trabajo con un grado de limpieza menor al del área de trabajo semilimpia, por ejemplo sala de recepción de leche, depósito de materia prima, depósito de material de envasado, sala de embalaje externo, depósito de producto terminado, etc.

11.1. Estructura interna de las instalaciones

Cielorrasos

- ✓ Los cielorrasos y los ángulos superiores en las áreas de procesamiento, envasado y almacenamiento deben ser de fácil limpieza para minimizar la acumulación de suciedad, la condensación, la formación de mohos y el desprendimiento de partículas. En las áreas limpias, semilimpias y otros sitios

de exposición de alimentos (salvo la sala de recolección de leche) se deberán instalar cielorrasos lisos y de fácil limpieza; en el caso de estructuras de concreto reforzado, el cielorraso debe ser liso y sin uniones.

- ✓ El cielorraso de la sala debe estar construido con materiales impermeables de color blanco, o colores claros, que no transmitan olores ni sean tóxicos para el uso al que se destinan; cuando sea necesario un recubrimiento de pintura, la pintura debe ser antifúngica, que no produzca desprendimientos y de fácil limpieza.
- ✓ No se deberán instalar los conductos que transportan servicios como vapor, agua o electricidad sobre los sectores en que el producto queda expuesto, ya que pueden ser contaminados por caída de polvo, goteo debido a la condensación o pinchadura de cañerías.

Paredes

- ✓ Las paredes se construirán con materiales no tóxicos, impermeables, lisos, sin olor, de fácil limpieza, de colores claros y anti-corrosivos.
- ✓ En el área limpia y semilimpia de trabajo las esquinas de las paredes, sus uniones y las uniones con el cielorraso deben estar en buen estado de mantenimiento, deben ser curvas, evitando ángulos rectos, de fácil limpieza y desinfección.

Puertas y ventanas

- ✓ Deberán tener una superficie lisa y no absorbente y ser fáciles de limpiar y desinfectar.
- ✓ En la sala de producción y áreas de depósito, las puertas y ventanas deberán estar construidas de modo que se minimice la acumulación de suciedad y, en caso necesario, estar provistas de malla contra insectos, que sean factibles de desmontar y limpiar.
- ✓ Las salidas de las áreas limpia y semilimpia de trabajo deben contar con puertas de cierre automático (tal como auto inductor o cierra puerta) y/o cortina de aire.

Pisos

- ✓ Los pisos deberán ser de materiales resistentes al tránsito, impermeables, no absorbentes, lavables y antideslizantes; no tendrán grietas y serán fáciles de limpiar y desinfectar.
- ✓ El piso de áreas con drenaje o flujo de aguas residuales hacia el piso durante las operaciones, habitualmente ambientes húmedos de trabajo o donde se limpia con agua, debe contar con tratamiento antiácido y antiálcalis y con pendiente y sistema de desagüe.

Sistema de drenaje

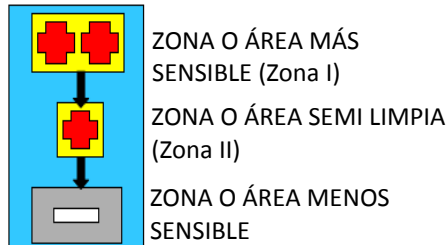
- ✓ Es necesario proveer sistemas de drenaje adecuados y evitar, en el diseño y la construcción, la contaminación de los productos y del agua que se utiliza en la producción. El sistema de drenaje deberá tener cierta inclinación y permanecer sin obstrucciones.
- ✓ En la conexión de ingreso del sistema de drenaje, se deberá instalar un sumidero con tapa para evitar la entrada de desechos sólidos y la salida de olores pestilentes.
- ✓ No se deberá instalar ninguna otra tubería de agua que se utilice para el procesamiento dentro y por debajo del sistema de drenaje.
- ✓ La salida del desagüe deberá contar con un dispositivo que evite la invasión de animales.
- ✓ La dirección de circulación del desagüe interno deberá ser desde las áreas con mayor nivel de limpieza hacia las áreas con menor nivel de limpieza, y se deberá evitar el reflujos de aguas residuales.
- ✓ Todo desagüe interno deberá estar sifonado, con rejillas de fácil limpieza.

11.2. Tratamiento de Aire

Durante el diseño de un sistema de flujo de aire filtrado se deben considerar ciertos criterios, como nunca pasar aire de una zona con requerimientos de limpieza menor a otra con requerimiento de limpieza mayor.

A continuación, en la Figura 21, se muestra un esquema que representa la gestión global de los flujos de aire filtrado.

GESTIÓN GLOBAL de los FLUJOS de AIRE



CLASIFICACIÓN ZONAS

- Por orden que disminuye peligrosidad
- En función de varios parámetros: proceso, dependiendo del recorrido del aire, grados sensibilidad y exposición a las contaminaciones...)

IMPERATIVO PRINCIPAL

- no hay transferencia de aire desde zonas muy contaminadas a zonas menos contaminadas

ORGANIZACIÓN FUNDAMENTAL

- transferencias de aire de los puntos muy sensibles hacia puntos menos sensibles o contaminantes

APLICACIÓN

- sobrepresión en salas muy sensibles
- descompresión en salas menos sensibles
- extracción aire viciado de los lugares muy contaminados (lavadero...)
- control centralizado de todos los componentes de flujo



ESTABLECIMIENTO PLANO DIRECTOR

- generalidades y especificidades de gestión global e higiénico flujo de aire

RECOMENDACIONES

- adaptaciones estructurales locales: esclusa protección, puertas seccionables, materiales hidrófobos lisos, descripción

IMPERATIVOS SATISFECHOS

- Descontaminación (absorción las partículas, de humedad...)
- Nuevo aire (sobrepresión...)
- Higiene global

Figura 27 – Esquema de gestión de flujos de aire filtrado para minimizar el riesgo de contaminación en una planta quesera.

12. Pasteurización

La pasteurización es el tratamiento térmico más ampliamente aplicado a la leche con destino a la elaboración de quesos, con el fin de eliminar microorganismos e inactivar enzimas, a lo que se le suma el efecto negativo de desnaturalizar

parcialmente proteínas de suero (Giffel y Wells-Bennik, 2010; McSweeney, 2007). El tratamiento HTST (alta temperatura / tiempo corto, por su sigla en inglés) es el método más común de pasteurización, por lo general la combinación de tiempo y temperatura más utilizada es de 72°C durante 15 segundos (Heyndrickx y col., 2010; McSweeney 2007). La pasteurización destruye células en estado vegetativo de los microorganismos patógenos, los esporos de mohos, pero no los endoesporos (De Jong, 2008; Ledenbach y Marschall, 2010).

Existen elaboraciones de quesos tradicionales (Grana Padano, por ejemplo) que no incluyen la pasteurización como etapa previa a la elaboración casearia porque el producto obtenido de esta manera posee desarrollo de sabores más intensos y, cumpliendo con los requerimientos de un producto con Denominación de Origen. Este tipo de elaboración requiere una mayor atención con respecto a la higiene general y seguridad (West, 2008), garantizando el uso de leche cruda de excelente calidad microbiológica.

Existen otros tratamientos térmicos como UHT (ultra alta temperatura, por sus sigla en inglés) y la esterilización comercial que inactiva los esporos, pero no se aplica a la leche destinada a elaborar quesos debido al marcado efecto negativo que produce por precipitación de proteínas del suero sobre la superficie de las micelas de caseínas (De Jong, 2008; Heindrickx y col., 2010; McSweeney, 2007; Skeie, 2010).

Por la marcada relevancia que representa esta etapa en el tratamiento de leche para disminuir los accidentes gasógenos en la elaboración de quesos, es crítico optimizar el diseño y funcionamiento del pasteurizador. En particular, para el correcto funcionamiento de un equipo continuo a placas para tratamiento HTST, el diseño debe responder a lo establecido en normas internacionales (Australian Standard AS 3993-2003, 2003; Grade A Pasteurized Milk Ordinance, 2007; ISO 14159:2008, 2008; ISO 12100-2:2004,2004; New Zealand Food Safety Authority, 2009)

Los diferentes componentes de un sistema de pasteurización HTST deben cumplir una serie de requisitos indispensables para su correcto funcionamiento y evitar problemas de contaminación microbiana, como se esquematiza en la Figura 21.

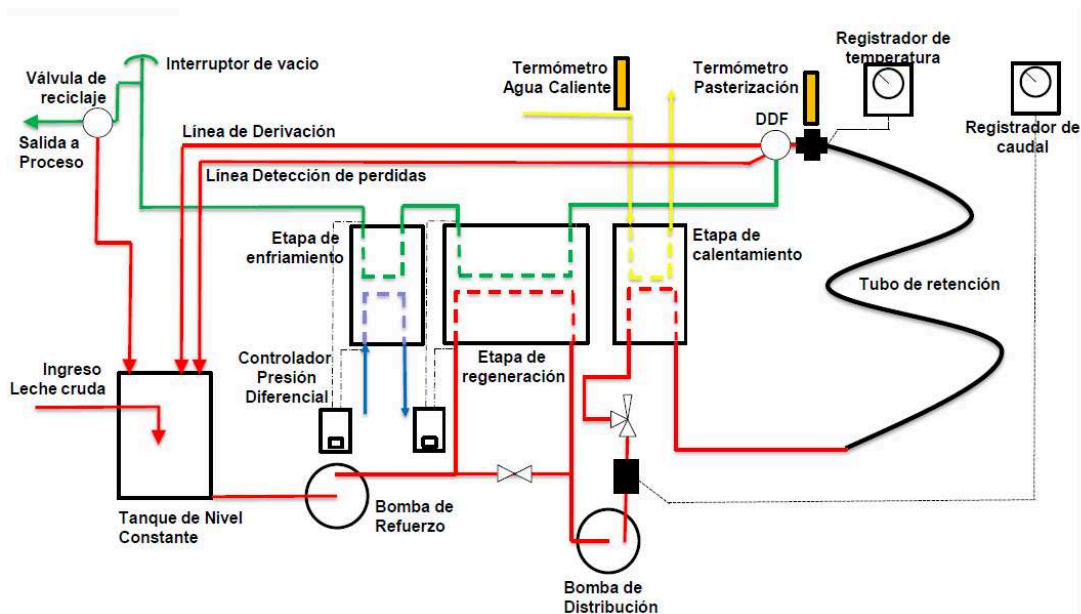


Figura 28 - Esquema de un pasteurizador y sus componentes.

Entre el diseño de los componentes individuales, se deben tener en cuenta una serie de requisitos que se describen brevemente a continuación.

► Tanque de Nivel Constante

El Tanque de Nivel Constante (TNC) es un recipiente que suministra, a presión atmosférica, leche cruda o material lácteo en recirculación hacia el pasteurizador para permitir la operación continua del sistema. Deberá poseer una tapa rebatible o una puerta de inspección de diseño adecuado que permita mantener la presión atmosférica y minimizar el riesgo de contaminación. La tapa tendrá una pendiente hacia uno de los lados, para favorecer el drenaje. Todas las aberturas que posea la tapa deben tener protección para que no ingrese fluido al TNC y estarán cubiertas.

Las conexiones de retorno al TNC, como la cañería de desviación, de detección de pérdidas (si existiera) y de reciclado (si existiera), deben ser fabricadas de forma tal que no permita el retorno de leche cruda por sifón hacia la cañería de leche pasteurizada.

► Bomba de refuerzo

La bomba de refuerzo es utilizada para complementar a la bomba de distribución, impulsando el producto crudo desde el TNC a través de la sección del producto crudo del regenerador. Se deben utilizar bombas de tipo centrífuga y de diseño sanitario y se debe instalar entre el TNC y la entrada del producto crudo a la sección del regenerador.

► Sección de regeneración

La sección de regeneración es aquella parte del pasteurizador HTST en la cual se entibia el producto crudo frío que ingresa al pasteurizador, utilizando el calor que aporta el producto pasteurizado caliente. Debe diseñarse, instalarse y operarse de tal manera que la presión del lado del producto pasteurizado sea superior en 15 kPa a la presión del lado del producto crudo. No deben existir perforaciones, pinchaduras o grietas en las placas.

► Sistema de presión diferencial

En la sección del regenerador, las leches cruda y pasteurizada se encuentran separadas por una delgada placa de metal y un sistema de juntas. El lado de producto crudo del regenerador deberá estar en todo momento a una presión inferior (al menos, 15 kPa) a la del lado de producto pasteurizado. De esta manera, en el caso de producirse pérdidas en las juntas o en las placas, el producto pasteurizado pasará hacia el lado del producto crudo y no viceversa. El mantenimiento de esta relación de presiones deberá garantizarse durante la puesta en marcha y operación.

► Bomba de distribución y dispositivos de control de caudal

El objetivo de la bomba de distribución es proporcionar un caudal estable en el tubo de retención, de forma tal que para cada partícula de material lácteo se respete el tiempo mínimo de pasteurización establecido y, junto a la válvula de contrapresión, se mantenga la relación de presiones especificadas.

Cuando se utiliza un dispositivo de control de caudal, el rango de variación permitido respecto al valor de consigna será de $\pm 5\%$ y, en todos los casos, el material lácteo deberá cumplir con el tiempo de retención correspondiente.

► Control y registro de caudal

En sistemas que posean controladores automáticos de caudal mediante caudalímetro, y exista la posibilidad de que se exceda el caudal máximo de pasteurización, el sistema deberá incluir las siguientes funciones:

- a) registro continuo y visualización del caudal del material lácteo que está siendo pasteurizado;
- b) activar la alarma de sobre caudal, cuando se supere el caudal máximo de pasteurización;
- c) activar la alarma de sobre caudal cuando exista cualquier pérdida de señal desde el caudalímetro hasta el controlador de caudal.

La medición y registro del caudal deberá tener una exactitud de $\pm 5\%$ al máximo caudal de pasteurización. Si el caudal excede el máximo permitido, su efecto sobre el tiempo de retención será inmediato.

► **Sección de calentamiento y enfriamiento**

La sección de calentamiento de un pasteurizador HTST brinda un rápido, uniforme y controlado calentamiento del material lácteo hasta la temperatura de pasteurización.

El medio de enfriamiento puede ser agua microbiológicamente potable o agua microbiológicamente no potable; de utilizar esta última opción, la presión diferencial mínima que debe existir entre el material lácteo y el agua es 15 kPa, siendo mayor la presión del lado de circulación de la leche.

► **Retención**

Esta sección del pasteurizador HTST es la encargada de mantener el producto completamente caliente, al menos durante el tiempo de retención requerido. Está compuesta por un tubo de retención y una cámara de medición. Debe ubicarse entre la salida de la sección de calentamiento y la entrada del dispositivo desviador de flujo (DDF).

► **Dispositivo Desviador de Flujo (DDF)**

La función del DDF es desviar hacia el tanque de nivel constante cualquier material lácteo que no logre cumplir con las condiciones especificadas de pasteurización, o desviar hacia adelante el material lácteo correctamente pasteurizado para su almacenamiento y/o posterior tratamiento.

El DDF y las líneas de retorno hacia el TNC deberán construirse en acero inoxidable y deben estar limpias y en buenas condiciones mecánicas. Válvulas, sellos y "O"-rings también deberán estar limpios y en buenas condiciones mecánicas.

► **Termómetro de indicación**

La indicación del termómetro de pasteurización provee la temperatura más exacta de procesamiento del producto. Este termómetro es necesario para todos los pasteurizadores HTST. El termómetro de producto pasteurizado deberá ubicarse en la cámara de medición junto con el sensor de temperatura del controlador / registrador.

► **Sistema de registro y control**

Para realizar un continuo y permanente registro de los parámetros y eventos que ocurren en el pasteurizador, se debe instalar un sistema de registro de datos con gráfico circular o de tira, o un sistema electrónico de registro.

► **Controlador de presión diferencial**

Debe existir una correcta relación de presiones en el regenerador y/o enfriador para prevenir la contaminación del producto pasteurizado con leche cruda y/o medio de enfriamiento no potabilizado, en caso de que fallen las placas de intercambio o los

sellos. La relación de presión debe asegurarse en el flujo hacia adelante y en el flujo en derivación.

La presión del producto pasteurizado (lado del producto pasteurizado), debe superar como mínimo en 15 kPa a la presión del producto no pasteurizado (lado del producto no pasteurizado).

13. Criterios para el diseño sanitario de equipos de proceso con el objetivo de minimizar la contaminación microbiológica de los quesos

Es muy importante al momento de diseñar equipos y cañerías de proceso para las industrias queseras utilizar criterios sanitarios, con el objetivo de evitar formación de biofilms, lograr eficacia en los programas de higiene y desinfección empleados, evitar acumulación de materia orgánica durante el proceso, minimizar la acumulación de agua, evitar acumulación de suciedad, facilitar la inspección y servicio de mantenimiento, etc. Para alcanzar estos objetivos se deben tener en cuenta una serie de criterios de diseño, que se describen a continuación:

- Las superficies deben ser fácilmente limpiables, continuas, libres de grietas o poros en las que se pueda retener suciedad tras la limpieza. A continuación (Figura 22) se esquematiza una superficie no continua, que posibilita la acumulación de restos orgánicos y microorganismos.

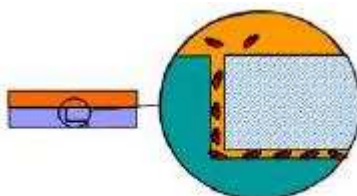


Figura 29 – Esquema de una superficie no continua.

- Las uniones deben ser estancas e higiénicas.
- La maquinaria e instalación debe ser autodrenable.
- Los ángulos internos y rincones deben poder limpiarse con efectividad. Se prefieren curvas en lugar de ángulos rectos.
- Las zonas muertas deben evitarse. Si son inevitables, deben ser drenables, limpiables manualmente, desinfectables y fáciles de inspeccionar visualmente.
- Las superficies en contacto con el producto (zona alimentaria) deben tener una rugosidad $Ra \leq 0.8 \mu m$, de modo de evitar la acumulación de bacterias (Figura 23).

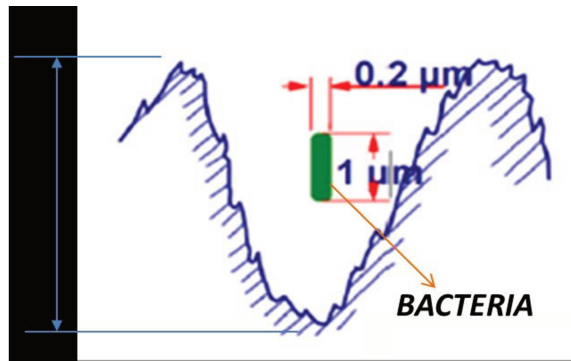


Figura 30 – Esquema de una superficie de la zona alimentaria con elevada rugosidad ($R_a > 0.8 \mu\text{m}$).

- Las uniones deben ser estancas e higiénicas.
- Deben evitarse las uniones metal-metal.
- El alineamiento adecuado de las piezas a unir es fundamental para evitar zonas de limpieza y drenabilidad inadecuadas, como se esquematiza a continuación (Figura 24).

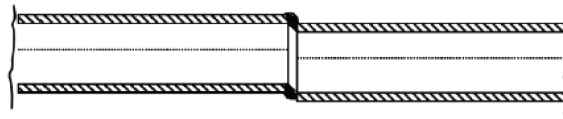


Figura 24 – Esquema del alineamiento de unión de cañerías.

- Son preferibles las uniones permanentes a las desmontables.
- Cuando se utilicen uniones desmontables, deben sellarse con juntas elastómeras.

14. Conclusiones

La problemática de defectos de hinchazón en quesos de origen microbiano es una realidad inevitable, tanto en Argentina como a nivel mundial. Para prevenir y minimizar la incidencia de contaminantes causantes de defectos gasógenos en quesos se debe actuar sobre las distintas etapas implicadas en las elaboraciones casearias:

- asegurar la higiene a nivel del tambo;
- controlar la alimentación y la calidad de agua suministrado al ganado lechero;
- implementar la pasteurización como una etapa inicial al proceso de fabricación de quesos, de modo de eliminar o reducir los niveles de microorganismos, sobre todo los relacionados a hinchazón precoz.
- cumplir con normas sanitarias, como ser BPM (Buenas Prácticas de Manufactura);
- asegurar que los diseños sanitarios de equipos e instalaciones de producción sean adecuados para el control de la contaminación de la leche y/o producto después de la pasteurización.
- aplicar estrategias tecnológicas destinadas a minimizar los defectos gasógenos como: microfiltración, bacto-fugación, uso de peróxido de hidrógeno, lisozima, agregado de bacterias productoras de bacteriocinas, etc.

La adecuada implementación de estas estrategias permitirá garantizar productos de calidad estandarizada, con mínimos inconvenientes por hinchazón de origen microbiano, asegurando la calidad de los quesos obtenidos y minimizando las pérdidas económicas.

15. Bibliografía

Adamberg, K.; Antonsson, M.; Vogensen, F. K.; Nielsen, E. W.; Kask, S.; Møller, P. L. y Ardö, Y. (2005). Fermentation of carbohydrates from cheese sources by non-starter lactic acid bacteria isolated from semi-hard Danish cheese. *Int. Dairy J.* 15: 873-882.

Agüero, E., Pedraza, C. y Godoy, S. (1987). Calidad higiénica del agua y su relación con el contenido microbiano de la leche. *Agricultura Técnica* 47(2): 136-14.

Alais, C. H. (1985). *Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera* (2da. ed.). Barcelona, España: Reverté.

Alichanidis, E. (2007). Cheeses ripened in brine. McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese problems solved*. Cambridge: Woodhead publishing limited, pp. 330-342.

Arizcun, C., Barcina, Y. y Torre, P. (1997). Identification de bacteries lactiques isolees des fromages Roncal et Idiazabal. *Lait* 77: 729-736.

Australian Standard AS 3993-2003 Equipment for the pasteurization of milk and other liquid dairy products – Continuous flow systems.

Bachmann, H. y Spahr, U. (1995). The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheese from raw milk. *J. Dairy Sci.* 78: 476-483.

Bachmann, H. P. y Frölich-Wyder, M. T. (2007). Swiss-cheese. En: McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese problems solved*. (pp. 246-267). Cambridge, Reino Unido: Woodhead publishing limited.

Banks, J. M. y Williams, A. G. (2004). The role of nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 145-152.

Bansal, B. y Chen, X. A. (2006). Critical review of milk fouling in heat exchangers. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 5: 27-47.

Beresford, T. P. (2003). Dairy processing. Improving quality. En: Smit, G. (Ed.). *Cap. 20: Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality* (pp. 448-469). Cambridge, Reino Unido: CRC Press.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. y Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259-274.

Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A. y Grappin, R. (2001). Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species specific primers. *Int. Dairy J.* 11: 293-305.

Bude-Ugarte, M., Guglielmotti, D., Giraffa, G., Reinheimer, J. A. y Hynes, E. (2006). Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard argentinean cheeses: Genetic characterization and resistance to biological barriers.. *J. Food Prot.* 69:2983-2991.

Bullock, D. H. y Irvine, O. R. (1956). A chromatographic study of Cheddar cheese ripening. *J. Dairy. Sci.* 39: 1229-1235.

- Burt, R., Blüthgen, A. y Heeschen, W. H. (1997). Nitrate, nitrite, nitrosamines. In: Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. Bulletin of the International Dairy Federation 970: 74-78.
- Casadei, M. A., Ingram, R., Hitchings, E., Archer, J. y Gaze, J. E. (2001). Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* to pH and ethanol. Int. J. Food Microbiol. 63:125-134.
- Casey, M. G., Häni, J. P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W. y Wechsler, D. (2006). Characterization of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. Lait 86:407-414.
- Centeno, J. A., Menéndez, S. y Rodríguez-Otero, J. L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). Int. J. Food Microbiol. 2-3: 307-313.
- Centeno, J. A., Rodríguez-Otero, J. L. y Cepeda, A. (1994). Microbiological study of Arzúa cheese (NW Spain) throughout cheesemaking and ripening. J. Food Safety 14: 229-241.
- Chapman, H. R. y Sharpe, M. E. (1981). Dairy Microbiology. En: Robinson, R. K. (Ed.). Microbiology of cheese (pp. 157-243). Londres, Reino Unido: Applied Science Publishers.
- Chile INN, Instituto Nacional de Normalización (1984). Norma Chilena, NCh 409/1. Agua potable. Parte 1: Requisitos.
- Chmielewski, R. y Frank, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2: 22-32.
- Código Alimentario Argentino, (CAA). Capítulo VIII - Quesos. Artículo 605 - punto 3 inciso C: Aditivos.
- Cogan, T. y Jordan, K. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. J. Dairy Sci. 77: 2704-2717.
- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P. y Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. Syst. Appl. Microbiol. 31(2): 126-140.
- Coppola, R., Nann, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C. y Razia, L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. Lait 80:479-490.
- Cosentino, S. y Palmas, F. (1997). Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy. J. Food Protect. 60: 283-287.
- Costerton, J. (1999). Introduction to biofilm: Discussion. Int. J. Antimicrob. Ag. 11: 217-221.

- Cousin, M. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy product: A review. *J. Food Protect.* 45: 172–207.
- Cromie, S. J., Giles, J. E. y Dulley, J. R. (1987). Effect of elevated ripening temperature on the microflora of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 54: 69-76.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Goparl, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L. y Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5: 855-875.
- Cuesta, P., Fernández-García, E., González de Llano, D., Montilla, A. y Rodríguez, A. (1996). Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 79: 1693-1698.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M. R. y Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2011-2020.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Huet, C., Crecchio, C., Fox, P. F. y Gobbetti, M. (2004). Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1336-1346.
- De Jong, P. (2008). Thermal processing of milk. En: Britz, T. J. & Robinson, R. K. (Eds). *Advanced dairy science and technology* (pp. 1-31). Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing.
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A. y Duboz, G. (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. I. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait* 76: 371-387.
- Depouilly, A., Dufrene, F., Beuvier, E. y Berthier, F. (2004). Genotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait* 84: 155-67.
- Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2007). Grana-type cheeses and parmesan: What common problems are associated with Grana-type cheeses? En: McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese problems solved* (pp. 210-211). Cambridge, Reino Unido: Woodhead publishing limited.
- Di Cagno, R., Banks, J., Sheehan, L., Fox, P. F., Brechany, E. Y., Corsetti, A. y Gobbetti, M. (2003). Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *Int. Dairy J.* 13: 961-972.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G. y Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 302-311.
- Donnelly, C.W. (2007). Pathogens and food poisoning bacteria: What factors should be considered to reduce coliform counts? En: McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese*

problems solved (pp. 143-144). Cambridge, Reino Unido: Woodhead publishing limited.

Drake, M. A., Karagül-Yüceer, Y., Chen, X. Q. y Cadwallader, K. R. (1999). Characterization of desirable and undesirable lactobacilli from cheese in fermented milk. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 32: 433-439.

Dudley, E. y Steele, J. L. (2005). Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 98:14-23.

Düsterhöft, E. M. y Van den Berg, G. (2007). Dutch-type cheeses. En: McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese problems solved* (pp. 230-245). Cambridge, Reino Unido: Woodhead publishing limited.

Endo, A. y Okada, S. (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(9): 2195-205.

Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57: 1-33.

FDA (2007). Grade A Pasteurized Milk Ordinance. Revision. United State Department of Health and Human Services Public Health Service. Food and Drug Administration.

Fenelon, M. A., Ryan, M. P., Rea, M. C., Guinee, T. P., Ross, R. P., Hill, C. y Harrington, D. (1999). Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar cheese made with or without lactacin 3147 producing starter culture. *J. Dairy. Sci.* 82: 10-22.

Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S. y Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterisation of non starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3418-3426.

Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S. y Beresford, T. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90: 600-608.

Flint, S. H., Bremer, P. y Brooks, J. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns, and methods of control. *Biofouling* 11: 81-97.

Folkertsma, B., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *Int. Dairy J.* 6: 1117-1134.

Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. En: Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. and O'Mahony, J. (Eds.). *Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks*, Cap.10 (pp. 379-436). Londres, Reino Unido: Blackie Academic & Professional.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. y McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. En: Fox, P. F. (Ed.). *Cap. 11: Biochemistry of cheese ripening* (pp. 236-281). Maryland, Estados Unidos: Aspen publishers.

Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H. y Wallace, J. (1993). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects. En: Fox, P. F. (Eds.). Cap. 10: Biochemistry of Cheese Ripening (pp. 389-438). Londres, Reino Unido: Chapman & Hall.

Fröhlich-Wyder M., Bachmann H. (2004). Cheeses with propionic acid fermentation. En: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, M. T. y Guinee T. P. (Eds.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2: Major Cheese Groups, 3rd edn. (pp. 142-156). Amsterdam, Holanda: Elsevier Academic Press.

Fröhlich-Wyder, M. T. y Bachmann, H. P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2: Major Cheese Groups. En: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. y Guinee, T. P. (Eds.). Cheeses with propionic acid fermentation (pp. 141-156). Londres, Reino Unido: Elsevier Academic Press.

Fryer, T. y Halligan, A. (1976). Detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 11:132-137.

Gaggiotti, M. (2000). Niveles de contaminación por clostridios gasógenos en alimentos para el ganado bovino (forrajes conservados) y en leche cruda destinada a industrialización. Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNL).

Garde, S., Arias, R., Gaya, P. y Nuñez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. Int. Dairy J. 21: 272-278.

Garrett, T., Bhakoo, M. y Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Review. Prog. Nat. Sci. 18: 1049-1056.

Giffel, M. C. y Wells-Bennik, M. H. J. (2010). Good hygienic practice in milk production and pro-cessing. En: Griffiths, M. W. (Ed.). Improving the safety and quality of milk. Vol. 1, Milk production and processing (pp. 179-193). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing limited.

Gloria, M., Vale, S., Vargas, O., Barbour, J. y Scanlan, R. (1997). Influence of nitrate levels added to cheese-milk on nitrate, nitrite, and volatile nitrosamine contents in Gruyere cheese. J. Agric. Food Chem. 45: 3577-3579.

Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. Annu. Rev. Genet. 29: 477-508.

Hall-Stoodley, L. y Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms, Curr. Opin. Biotech. 13, 228-233.

Heer Gerónimo (2007). Microbiología de la leche. Facultad de Ciencias Veterinarias - UNL.

Hemme, D. y Foucaud-Sheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*: characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. Review. Int. Dairy J. 14: 467-494.

Henri-Dubernet, S., Desmasures, N. y Guéguen, M. (2004). Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in "Camembert de Normandie" cheese. *Lait* 84: 179-189.

Heyndrickx, M. (2011). Dispersal of aerobic endospore-forming bacteria from soil and agricultural activities to food and feed. En: Logan, N. A. and De Vos, P. (Eds.). *Aerobic, Endospore-forming Soil Bacteria* (pp. 135-156) Berlin, Alemania: Springer-Verlag.

Heyndrickx, M., Marchand, S., De Jonghe, V., Smet, K., Coudijzer, K. y De Block, J. (2010). Understanding and preventing consumer milk microbial spoilage and chemical deterioration. En: Grif-fiths, M. W. (Ed.). *Improving the safety and quality of milk. Vol 2, Improving quality in milk products* (pp. 97-135). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing limited.

Hill, A. R. y Kethireddipalli, P. (2013). Dairy products: cheese and yoghurt. En: Eskin, N. A. M. & Shahidi, F. (Eds.). *Biochemistry of foods* (pp. 319-351). Londres, Reino Unido: Academic Press.

Hull, R., Toyne, S., Haynes, I. y Lehmann, F. (1992). Thermotolerant bacteria: are emerging problem in cheesemaking. *Austral. J. Dairy Technol.* 47(7): 91-94.

Hynes, E., Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2001). Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. *Int. Dairy J.* 11: 587-597.

IDF/FIL, International Dairy Federation (1984). Inspection and sampling procedures for determining the hygienic condition of dairy plant. *Bulletin of the International Dairy Federation* 121: 1- 4.

IDF/FIL, International Dairy Federation (1987). The use of lysozyme in the prevention of late blowing in cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation* 216: 1-16.

IDF/FIL, International Dairy Federation (1994). Prevention of microbial contamination and growth. *Bulletin of the International Dairy Federation* 292: 17-27.

IDF/FIL, International Dairy Federation (1997). Management of production environment air. *Bulletin of the International Dairy Federation* 324: 61-66.

Industria lechera (1999). *Reseña estadística de la lechería argentina y mundial 1989-1998*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. SENASA. Centro de la industria lechera, ed. año LXXX, n° 721.

Ingham, S. C., Hassler, J. R., Tsai, Y. W. e Ingham B. H. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 173-183.

ISO 12100-2:2004. Seguridad de las máquinas. Conceptos generales, principios generales para el diseño.

ISO 14159:2008. Seguridad de las máquinas. Requisitos de higiene para el diseño de las máquinas.

- Jakobsen, M. y Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.* 6: 755-768.
- Jimeno, J., Làzaro, M. J. y Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait* 75: 401-413.
- Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1993). Identification and growth of nonstarter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.* 32: 47-55.
- Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1999). Heat resistance of *Lactobacillus* spp. Isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 136-140.
- Kask, S., Adamberg, K., Orłowski, A., Vogensen, F. K., Møller, P. L., Ardö, P. y Paalme, T. (2003). Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. *Food Res. Int.* 36: 1037-1046.
- Kennes, C., Dubourguier, H. C., Albagnac, G. y Nyns, E. J. (1991). Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 380-384.
- Kosikowski, F. V. y Mistry, V. V. (1997). Cheese and fermented milk foods, 3era. ed., Vol. 1. En: Kosikowski, F.V. (Ed.). *Origins and Principles*. Kosikowski L.L.C., Westport, Estados Unidos: Great Falls.
- Kulozik, U. (2002). Biofilm formations. En: Roginski, H., Fuquay, J. W. and Fox, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 152-156). London, Reino Unido: Elsevier.
- Kumar, G. y Anand, S. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 9-27.
- Lane, C. N., Fox, P. F., Walsh, E. M., Folkertsma, B. y McSweeney, P. L. H. (1997). Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Lait* 77: 561-573.
- Lau, K. Y., Barbano, D. M. y Rasmussen, R. R. (1990). Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and Cheddar cheese yield. *J. Dairy Sci.* 73: 561-570.
- Lawrence, R. C., Gilles, J., Creamer, L. K. (1993). Cheddar cheses and related dry-salted cheese varieties. En: Fox, P. (Ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol2, 2nd ed. (pp. 1-38). London, Reino Unido: Chapman & Hall.
- Lawrence, R. C., Gilles, J. y Creamer, L. K. N. Z. (1983). The relationship between cheese texture and flavor. *J. Dairy Sci. Technol.* 18: 175-190.
- Ledenbach, L. H. y Marshall, R. T. (2010). Microbiological spoilage of dairy products. En: Sperber, W. H. & Doyle, M. P. (Eds.). *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Bever-ages* (pp. 41-67). New York, Estados Unidos: Springer.
- Lehmann, F., Russell, P., Solomon, L. y Murphy, K. (1992). Bacterial growth during continuous milk pasteurization. *Austral. J. Dairy Technol.* 47(1): 28-32.

- Liu, S. Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 115-131.
- Lodi, R. (1993). I defetti. *L'Industria del Latte XXIX* (2), 89-96.
- Losick, R. y Stragier, P. (1992). Crisscross regulation of cell type specific gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Nature* 355: 601-604.
- Mannu, L., Comunian, R. y Scintu, M. F. (2000). Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10: 383-389.
- Martínez-Cuesta, M. C., Fernández de Palencia, P., Requena T. y Peláez C. (1998). Enhancement of proteolysis by a *Lactococcus lactis* bacteriocin producer in a cheese model system. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3863-3867.
- Martínez-Cuesta, M. C., J. Bengoechea, I. Bustos, B. Rodriguez, T. Requena y Pelaez, C. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 347-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *Int. Dairy J.* 20:18-24.
- Martley, F. G. y Crow, V. L. (1993). Interactions between non starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3: 461-483.
- Matijasic, B., Koman, M. y Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium trybutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasserii*. *Int. Dairy J.* 17: 157-166.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects; Cap. 14.1. En: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. y Guinee, T. (Eds.). *Biochemistry of cheese ripening: introduction and verview* (pp. 347-360). Estados Unidos: Academic Press.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects; Cap. 14.2. En: Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. y Guinee, T. (Eds.). *Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate* (pp. 361-371). Estados Unidos: Academic Press.
- McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Lait.* 80: 293-324.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F.; Lucey, J. A.; Jordan, K. N. y Cogan, T. M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 3: 613-634.
- McSweeney, P. L. H.; Walsh, E. M., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D. y Castelo-Gonzalez, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish J. Agric. Food Res.* 33: 183-192.
- McSweeney, P. L. H. (2007). Preparation of cheese milk: What effects does pasteurisation have on cheesemilk? En: McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese problems solved* (pp. 22-23). Cambridge, Reino Unido: Woodhead publishing limited.

- Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.* 81: 2760-2764.
- Molina, L., Gallardo, E., Brito, C., Pinto, M. y Molina, I. (1999). Efecto de la maduración en el contenido de nitratos y nitritos en quesos semiduros. *Agro Sur* 27(2): 112-126.
- Morgan, S. M., O'Sullivan, L., Ross, R. P. y Hill, C. (2002). The design of a three strain starter system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lysis. *Int. Dairy J.* 12: 985-993.
- Morgan, S., Ross, R. P. y Hill, C. (1997). Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *J. Dairy Sci.* 80: 1-10.
- Naylor, J. y Sharpe, M. E. (1958). Lactobacilli in Cheddar cheese. III. The source of lactobacilli in cheese. *J. Dairy Res.* 25: 431-438.
- New Zealand Food Safety Authority (2009). Heat Treatment Code of Practice. Amendment.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. y Hill, C. (2003). A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1235-1241.
- O'Donovan, C. M., Wilkinson, M. G., Guinee, T. P. y Fox, P. F. (1996). An investigation of the autolytic properties of three lactococcal strains during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 6: 1149-1165.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (1964) Serie de Informe Técnico N° 318 - Lucha contra la contaminación del agua.
- Ottogalli, G. (1968). Moderni criteri microbiologici di valutazione dei formaggi. *Rivista della Società Italiana di Scienze Alimentari* 15 (5): 333-338.
- Oumer, A., Gaya, P., Fernández-García, E., Mariaca, R., Garde, S., Medina, M. y Nuñez, M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 68: 117-129.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S. y Cogan, T. M. (1998). Citrate metabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 147-154.
- Peterson, S. D. y Marshall, R. T. (1990). Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: A Review. *J. Dairy Sci.* 73: 1395-1410.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A. y Parente, E. (2005). Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis. *Int. Dairy J.* 15: 1138-1149.
- Poblete, P. (1998). Eficiencia de lavado e higienización de tarros, estanques de leche, en tres centros de acopio lechero de la provincia de Valdivia. Valdivia. Tesis Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Ciencias y Tecnología de la Leche.

- Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F. y Cocconcelli, P. S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 141-151.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. y Reinheimer, J. (2008). Nuevas y clásicas bacterias causantes de defectos gasógenos en quesos blandos. *Rev. Argent. Lactol.* 23: 19-32.
- Ranieri, M. L., Huck, J. R., Sonnen, M., Barbano, D. M. y Boor, K. J. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 92(10): 4823-4832.
- Rapposch, S., Eliskases-Lechner, F. y Ginzinger, W. (1999). Growth of facultatively heterofermentative lactobacilli on starter cell suspensions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5597-5599.
- Reinheimer, J., Suárez, V., Bailo, N. y Zalazar, C. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection* 58 (7): 769-799.
- Robinson, R. (1987). *Microbiología lactológica*. Vol. II. *Microbiología de los productos lácteos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C. y Ross, R. P. (1996). An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 612-619.
- Rynne, N. M., Beresford, T. P., Kelly, A. L. y Guinee, T. P. (2007). Effect of milk pasteurisation temperature on age-related changes in lactose metabolism, pH and the growth of non-starter lactic acid bacteria in half-fat Cheddar cheese. *Food Chem.* 100: 375-382.
- Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J. M., Cabezas, L. y Palop, L. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 355-362.
- Scarpellino, R. y Kosikowski, F. V. (1962). Evolution of volatile compounds in ripening raw and pasteurised milk Cheddar cheese observed by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 45: 343-348.
- Schneider, K. B., Palmer, T. M. y Grossmann, A. D. (2002). Characterization of comQ and ComX, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184: 410-419.
- Schöbitz, R., Uribe, C., Molina, H y Espina, F (2005). Control del desarrollo de bacterias ácido butíricas en queso tipo gouda empleando diferentes concentraciones de nitrato y temperaturas de maduración. *Agro Sur* 33(1): 48-57.
- Scott, R. (1991). *Fabricación de queso*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. R. y Flint, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *Int. J. Dairy Technol.* 60: 109-117.

Serra, G. P. (2003). Estudio del Biofilm: Formación y Consecuencias. Escola de Previsió i Seguretat Integral.

Shakeel-Ur-Rehman, A., Banks, J. M., Brechany, E. Y., Muir, D. D., McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2000a). Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 10: 55-65.

Shakeel-Ur-Rehman, A., Banks, J. M., McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2000b). Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *Int. Dairy J.* 10: 45-53.

Shakeel-Ur-Rehman, A., Waldron, D. y Fox, P. F. (2004). Effect of modifying lactose concentration in cheese curd on proteolysis and in quality of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 14: 591-597.

Shakeel-Ur-Rehman, Pripp, A. H., McSweeney, P.L.H. y Fox, P. F. (1999). Multivariate statistical analysis of peptide profiles and free amino acids to evaluate effects of single-strain starters on proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses. *Int. Dairy J.* 9:473-479.

Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2000c). Methods used to study non-starter microorganisms in cheese: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 53:113-119.

Sheelan, J. J. (2007). The microbiology of cheese ripening: What causes the development of gas during ripening? En: McSweeney, P. L. H. (Ed.). *Cheese problems solved* (pp. 131-132). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing Limited.

Skeie, S. (2010). Milk quality requirements for cheesemaking. En: Griffiths, M. W. (Ed.). *Improving the safety and quality of milk. Vol. 2, Improving quality in milk products* (pp. 433-453). Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing Limited.

Skeie, S. y Ardö, Y. (2000). Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 33:499-505.

Slaghuis, B. A., Giffel, M. C., Beumer, R. R. y Andrea, G. (1997) Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *Int. Dairy J.* 7: 201-205.

Somers, E. B., Johnson, M. E. y Wong, A. C. L. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by non-starter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J.Dairy Sci.* 84: 1926-1936.

Sordo, J. (1983). Hinchazón de los quesos, causas y medios para combatirlos. *Industrias Lácteas Españolas* 51(33): 58 pp.

Spahr, U. y Url, B. (1994). Behaviour of pathogenic bacteria in cheese - A synopsis of experimental data. *Bulletin of the International Dairy Federation* 298: 2-13.

Stadhouders, J. y Spoelstra, S.F. (1989) Prevention of the contamination of raw milk by making a good silage. *Bulletin of the International Dairy Federation* 112: 8-15.

- Stanley, G. (1998). The technology of dairy products. En: Early, R. (Ed.). Microbiology of fermented milk products, Cap. 2 (pp. 50-80). Londres, Reino Unido: Blackie Academic & Professional.
- Steffen C., Eberhard, P., Bosset, J. O. y Rüegg, M. (1993). Swiss-type varieties. En: Fox, P.F. (Ed.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 2 (pp. 83-110). Londres, Reino Unido: Chapman & Hall.
- Stragier, P. (1992). Establishment of forespore-specific gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. En: Mohan, S., Dow, C. and Cole, J. (Eds.). Prokaryotic structure and function: a new perspective (pp. 297-310). Cambridge, Reino Unido: Society for General Microbiology & Cambridge University Press.
- Thomas, T. D. (1987). Cannibalism among bacteria found in cheese. N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 22: 215-219.
- Turner, K. W., Lawrence, R. C. y Lelievre, J. (1986). A microbiological specification for milk for aseptic cheesemaking. N. Z. J. Dairy Sci. Technol. 21: 249-254.
- Van Heddeghem, A. y Vlaemynek, G. (1993). Sources of contamination of milk with *Bacillus cereus* on the farm and in the factory. IDF Bulletin 275: 19-22.
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M. y Topisirovic, L. (2007). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. J. Appl. Microbiol. 103: 2142-2152.
- Walsh, E. M., McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1996). Use of antibiotics to inhibit non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. Int. Dairy J. 6: 425-431.
- Warnecke, F. (2001). The ecology of thermophilic bacilli of milk powder processing plants. MPhil Thesis, University of Waikato, Hamilton, New Zeland.
- West, H. G. (2008). Food fears and raw-milk cheese. Appetite, 51(1): pp 25-29.
- Westby, A., Nuraida, L., Owens, J. D. y Gibbs, P. A. (1993). Inability of *Lactobacillus plantarum* and other lactic acid bacteria to grow on D-ribose as sole source of fermentable carbohydrate. J. Appl. Bacteriol. 75: 168-175.
- Williams, A. G. y Banks, J. M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. Int. Dairy J. 7: 763-774.
- Williams, A. G., Choi, S. C. y Banks, J. M. (2002). Variability of the species and strain phenotype composition of the non-starter lactic acid bacterial population of Cheddar cheese manufactured in a commercial creamery. Food Res. Int. 35: 483-493.
- Williams, A. G., Withers, S. E. y Banks, J. M. (2000). Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. Int. Dairy J. 10:17-23.
- Wirtanen, G., Husmark, U. y Matilla- Sandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food processing systems. J. Food Protect. 59: 727-33.

Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. y Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91-109.

Zárate, V., Belda, F., Pérez, C. y Cardell, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7: 635-641.

Zhao, T., Doyle, M., Zhao, P., Blake, P. y Mau Wu, F. (2001). Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O 157: H7 in water. *J. Food Protect.* 64 (10): 1607-1609.