



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *Estudio sobre el crecimiento de bacterias proteolíticas y lipolíticas en leche y quesos obtenidos a partir de cabras tratadas con Enrofloxacina*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE  
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO: Carlos Inat Trigueros

TUTOR ACADEMICO: Rosa María Montes Estellés

*Curso Académico:2015/2016*

**VALENCIA, Enero 2016**



# ESTUDIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PROTEOLÍTICAS Y LIPOLÍTICAS EN LECHE Y QUESOS OBTENIDOS A PARTIR DE CABRAS TRATADAS CON ENROFLOXACINA

Carlos Inat Trigueros y Rosa María Montes Estellés<sup>1</sup>

## RESUMEN

El presente trabajo pretende abordar la problemática del crecimiento de ciertos géneros bacterianos con metabolismo proteolítico y lipolítico en leche cruda de cabra. Este hecho tiene implicaciones directas en la calidad de la leche almacenada o los productos derivados de esta como pueda ser el queso, en nuestro caso hemos utilizado el queso de Tronchón como producto derivado.

Por ello se busca la posible influencia de la enrofloxacin, antibiótico de uso muy extendido en las explotaciones ganaderas, sobre el crecimiento de este tipo de bacterias. Para ello se analizaron muestras de leche en tres periodos diferentes: antes de la inyección, tras la inyección y pasado el tiempo de supresión del antibiótico.

También se realizó el estudio de los quesos obtenidos a partir de estas leches a tres tiempos de maduración distintos, 0 días, 30 días y 60 días, donde además de realizar recuentos sobre bacterias proteolíticas y lipolíticas también se trató de determinar la presencia/ausencia de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados han demostrado que hay diferencias estadísticamente significativas en los recuentos microbiológicos de leche de cabra tras la administración de enrofloxacin.

En el caso de los quesos no se encontraron bacterias proteolíticas en ninguna de las muestras analizadas, con respecto a las bacterias lipolíticas no se pudo establecer una relación directa entre la administración del antibiótico y una disminución de colonias, aunque si se vio esta disminución de lipolíticos a lo largo de la maduración, de forma más pronunciada al final de esta. El análisis de patógenos nos demuestra la ausencia de estos en los quesos fabricados en este estudio.

**PALABRAS CLAVE:** enrofloxacin, bacteria, proteolítica, lipolítica, leche, queso, cabra.

## RESUM

El present treball pretén abordar la problemàtica del creixement de certs gèneres bacterians amb metabolisme proteolític i lipolític en llet crua de cabra. Aquest fet té implicacions directes en la qualitat de la llet emmagatzemada o els productes derivats d'aquesta com ara el formatge, en el nostre cas hem utilitzat el formatge de Tronchón com a producte derivat.

Per això es busca la possible influència de la enrofloxacin, antibiòtic d'ús molt estès en les explotacions ramaderes, sobre el creixement d'aquest tipus de bacteris. Per a això es van analitzar mostres de llet en tres períodes

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

diferents: abans de la injecció, després de la injecció i passat el temps de supressió de l'antibiòtic.

També es va realitzar l'estudi dels formatges obtinguts a partir d'aquestes llets a tres temps de maduració diferents, 0 dies, 30 dies i 60 dies, on a més de fer recomptes sobre bacteris proteolítics i lipolítiques també es va tractar de determinar la presència / absència de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* i *Staphylococcus aureus*.

Els resultats han demostrat que hi ha diferències estadísticament significatives en els recomptes microbiològics de llet de cabra després de l'administració de enrofloxacina.

En el cas dels formatges no es van trobar bacteris proteolítics en cap de les mostres analitzades, pel que fa als bacteris lipolítiques no es va poder establir una relació directa entre l'administració de l'antibiòtic i una disminució de colònies, encara que si es va veure aquesta disminució de lipolítics al llarg de la maduració, de forma més pronunciada al final d'aquesta. L'anàlisi de patògens ens demostra l'absència d'aquests en els formatges fabricats en aquest estudi.

PARAULES CLAU: enrofloxacina, bacteri, proteolítica, lipolítica, llet, formatge, cabra.

## **ABSTRACT**

This paper aims to address the problem of the growth of certain bacterial genera with proteolytic and lipolytic metabolism in raw goat milk. What have direct implications on the quality of stored milk or products derived from this as it may be cheese, in our case we used the Tronchón cheese as a byproduct.

Therefore it seeks the possible influence of enrofloxacin, an antibiotic widely used for farming purposes, on the growth of such bacteria. To this end milk samples were analyzed at three different times: before injection, after injection and removal last time the antibiotic.

The study of the cheeses obtained are also made from these milks three times from different maturation, 0 days, 30 days and 60 days, where in addition to counts of proteolytic and lipolytic bacteria also sought to determine the presence / absence *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* and *Staphylococcus aureus*.

The results have shown that there are statistically significant differences in microbial counts of goat milk following administration of enrofloxacin.

For cheeses not proteolytic bacteria were found in any of the samples, with respect to lipolytic bacteria could not establish a direct relationship between the antibiotic and decreased colony, although was this decrease in lipolytic along maturation, more sharply at the end of this. Pathogen analysis demonstrates the absence of these in cheeses made in this study.

KEY WORDS: enrofloxacin, bacteria, proteolytic, lipolytic, milk, cheese, goat.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. Los quesos de leche de cabra**

#### **PRODUCCIÓN DE LECHE Y QUESO DE CABRA**

Para la fabricación del queso podemos utilizar leche cruda (sin pasteurizar) o leche pasteurizada. Cada tipo tiene sus ventajas e inconvenientes. Con la pasteurización nos aseguramos de que eliminamos los microorganismos patógenos, lo que minimiza el riesgo de que los quesos puedan ser perjudiciales para el hombre en quesos de curación menor a 60 días (Real Decreto 752/2011).

Sin embargo, el queso fabricado con leche no pasteurizada nos garantiza un queso más intenso y sabroso, ya que al no haber sido sometido a procesos térmicos conserva microorganismos propios de la leche.

El interés mundial en aplicaciones de la leche caprina ha crecido recientemente, y la producción y los patrones de fabricación asociados con este tipo de leche han cambiado considerablemente.

Los quesos fabricados a partir de leche de cabra tienen un impacto económico y social importante en la cuenca mediterránea dadas sus propiedades organolépticas y de textura únicas y la fácil adaptación de las cabras a los pastos pobres y secos de esta región (Fonseca et al., 2013).

Por otra parte, el queso de cabra es muy nutritivo, especialmente en términos de su alto contenido de proteína en relación con el contenido de calorías y grasas. (Gomes y Malcata, 1998)

El queso de Tronchón cuenta con siglos de antigüedad, se elabora tradicionalmente en la comarca del Maestrazgo con leche de cabra o de oveja. Es un queso muy aromático y algo cremoso. Se puede degustar fresco, tierno o curado.

#### **CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA DE CABRA Y QUESOS ELABORADOS A PARTIR DE ESTA**

Los quesos hechos con leche sin pasteurizar parecen estar asociados con brotes de intoxicaciones alimentarias con mayor frecuencia que los fabricados a partir de leche pasteurizada, aunque estos también pueden ocasionar toxiinfecciones por una inadecuada pasteurización de la leche o porque el queso hecho de leche pasteurizada se contamina posteriormente con microorganismos patógenos. (Araya et al., 2008). Lo que hace a la leche un medio tan favorable al crecimiento microbiológico es su alto valor nutricional, una alta actividad de y un pH casi neutro (Hassan y Frank, 2011)

La presencia de patógenos en el queso puede reducirse considerablemente mediante una adecuada higiene y buenas prácticas de manufactura. Es reconocido que el sistema Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control puede ser una herramienta eficaz para aumentar la seguridad de los alimentos. (Cristobal y Maurtua, 2003).

## **2. Presencia de microorganismos proteolíticos y lipolíticos en leche y queso de cabra**

La producción individual, la estacionalidad, y las dificultades en el transporte a menudo limitan la industrialización a gran escala de la leche de cabra, lo que obliga a los ganaderos a almacenar la leche cruda a temperatura de refrigeración durante más de un 1 día antes del procesamiento. Esta práctica causa problemas de calidad para la industria ya que el almacenamiento de leche cruda entre 4 y 7 °C durante algunos días antes del procesamiento permite el crecimiento de bacterias psicrófilas (Fonseca et al., 2013).

La producción por parte de estos microorganismos de enzimas, tales como proteasas y lipasas, puede alterar las propiedades de la leche y de los productos lácteos a lo largo del tiempo, generando sabor amargo y gelificación en el caso de la proteólisis y sabores rancios y jabonosos en el caso de la lipólisis (Dufour et al., 2008). En la industria del queso, concentraciones moderadas de estas enzimas pueden contribuir al desarrollo del aroma y por lo tanto pueden tener un efecto beneficioso, pero otros productos de la actividad residual de las enzimas microbianas pueden llevar a malos sabores y otros defectos de calidad como ya se ha mencionado (von Neubeck et al., 2015).

A esto cabe añadir que mientras que los microorganismos son inactivados durante los tratamientos de la leche, tales como la pasteurización o la ultrapasteurización (UHT), las enzimas termoestables de acción lipolítica y proteolítica son capaces de persistir en la leche (Marchand et al., 2009). Como las enzimas son difíciles de inactivar por medios tecnológicos, es necesario reducir el riesgo de producción enzimática en la propia materia prima. Por lo tanto, se necesita conocimiento sobre los microorganismos que están presentes en la leche cruda y que enzimas son capaces de producir (von Neubeck et al., 2015).

Se ha determinado que tras un periodo de almacenamiento de la leche en refrigeración a 6°C las bacterias del tipo Gram- son las que más prevalencia tienen, y que mientras que estas producen mayoritariamente enzimas de tipo proteolítico (94%), las Gram+ poseen una proporción similar de actividad proteolítica (58%) y lipolítica (42%). En las Gram- predomina el género *Pseudomonas* con una de las enzimas proteolíticas de mayor actividad (Baur et al., 2015).

## **3. Presencia de antibióticos en la leche y derivados lácteos y sus consecuencias**

Como ya se ha mencionado el antibiótico utilizado para este estudio es la enrofloxacin. Este antibiótico pertenece a un grupo de antibióticos llamados fluoroquinolonas, ampliamente utilizados en medicina humana y que pertenecen a una de las clases más importantes de antibióticos sintéticos y de mayor uso en veterinaria a nivel mundial (Hassouan, 2006).

Las fluoroquinolonas son conocidas por actuar como bactericidas por medio de la inhibición de enzimas críticas para la replicación del DNA, como son la topoisomerasa tipo II y la tipo IV.

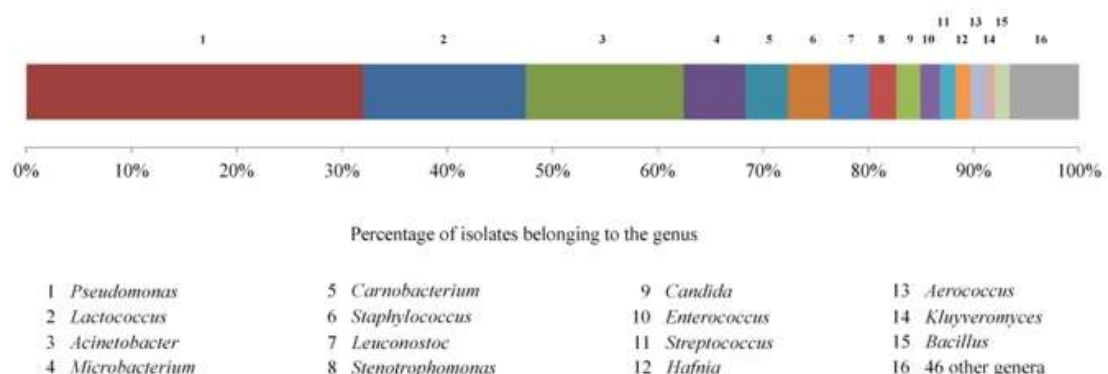
Este antibiótico posee un amplio espectro de acción antibacteriana contra bacterias Gram-negativas, algunas Gram-positivas y micoplasmas (Walker, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa*, una de las bacterias psicrófilas más ubicuas en la leche cruda almacenada, ha demostrado tener un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) muy alto frente a la enrofloxacin, mucho mayor que otras bacterias como *E. coli* y *Staphylococcus pseudintermedius* (Blondeau et al., 2011). Así mismo, es resistente natural a muchos de los antibióticos más utilizados, de modo que su tratamiento es normalmente complicado. Esta resistencia se debe a un plásmido transferible de resistencia (Madigan et al., 2009).

El uso de antibióticos en veterinaria para el tratamiento de enfermedades en el ganado destinado al consumo humano, así como su utilización como aditivos en granjas industriales, han dado como resultado el hecho de que deba considerarse su presencia potencial en alimentos de origen animal. Hay que tener en cuenta que si los tiempos de eliminación de los antibióticos no se respetan, existe un riesgo significativo de encontrar residuos en los alimentos (Hassouan, 2006).

En la actualidad existe una creciente preocupación en las autoridades sanitarias sobre el uso abusivo y fraudulento que en ocasiones se da a este tipo de antibióticos en las explotaciones ganaderas, ya sea con fines profilácticos, de tratamiento de enfermedades, o simplemente para mejorar el rendimiento productivo. A este respecto si no se siguen unas determinadas pautas de administración y periodos de supresión, pueden llegar a darse episodios alérgicos en consumidores hipersensibles a estos residuos de antibióticos o incluso la transmisión por los alimentos de bacterias resistentes dada la administración de antibióticos a bajos niveles.

Los principales géneros bacterianos aislados en la leche son *Pseudomonas*, *Lactococcus* y *Acinetobacter* (Baur et al., 2015 y von Neubeck et al., 2015).

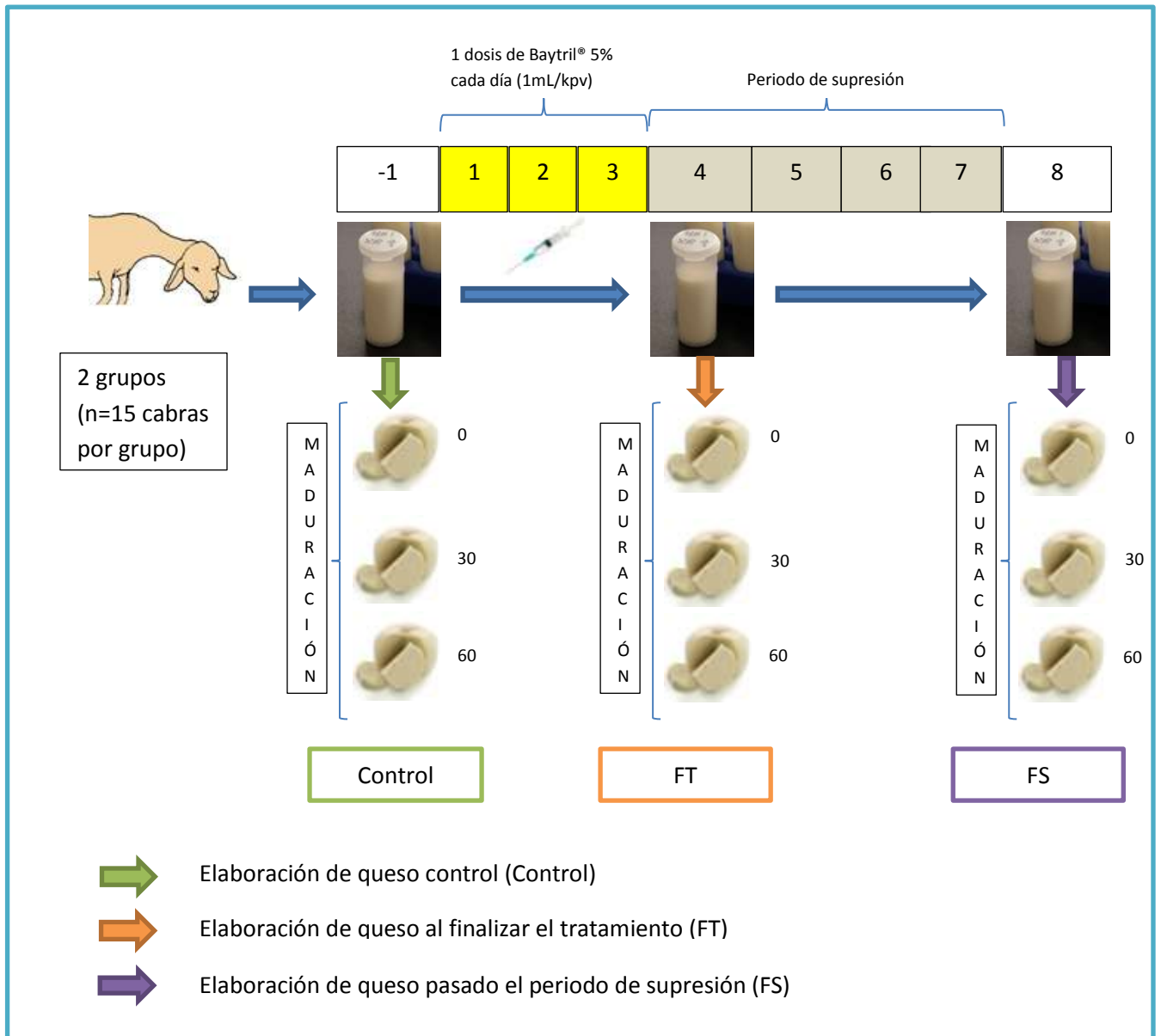


**FIGURA 1.** Abundancia relativa de los 15 géneros bacterianos más abundantes en muestras de leche (von Neubeck et al., 2015).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Diseño experimental

El efecto de la enrofloxacinina inyectada en cabras sobre el recuento de bacterias de la leche cruda y la fabricación de queso de Tronchón a partir de esta, se estudió en un trabajo en colaboración con el departamento de Ciencia Animal, en una experiencia que se estaba realizando con el diseño experimental que se presenta en el siguiente esquema (FIGURA 2).



**FIGURA 2.** Esquema del diseño experimental para la obtención de muestras para la realización de este estudio.



Se emplearon 30 cabras de la raza Murciano-Granadina en el sexto mes de lactación divididas en dos grupos de 15 animales. En cada grupo un día antes de empezar el tratamiento con enrofloxacin, los animales se ordeñaron, se tomaron muestras individuales y con la leche de mezcla se realizó una elaboración de queso control, dando un total de 8 quesos, muestras C (control). A continuación durante tres días consecutivos se les realizó el tratamiento con enrofloxacin suministrada por laboratorios Bayer, España bajo el nombre comercial de Baytril® 5% vía intramuscular profunda a la dosis recomendada por el fabricante (1 mL/10 kg) procediendo al ordeño de las cabras tratadas (1 ordeño diario: 8 am). Al día siguiente de la última administración de antibiótico (día 4) se realizó otra toma de muestras de los animales individuales y de la mezcla de todos ellos, para la realización de los análisis, así como una fabricación de queso a partir de la leche de mezcla, obteniendo 8 quesos, muestras FT (finalizado tratamiento).

Después del periodo de supresión indicado por el fabricante (4 días desde la última dosis administrada) se realizó otra toma de leche a nivel individual y de mezcla y una tercera fabricación con la leche procedente de las 15 cabras tratadas, obteniendo 8 quesos, muestras FS (Finalizado periodo de supresión). El mismo experimento se repitió con el segundo grupo de cabras (Curotto, 2015).

## **2. Muestras de la leche de cabra**

Las muestras de leche fueron tomadas el mismo día que se analizaron. Se almacenaron en condiciones de refrigeración a una temperatura media de entre 4 y 5°C y un máximo de 4 horas desde el ordeño hasta su utilización en el análisis microbiológico.

Las muestras llegaron al laboratorio en botes de muestras de 50 mL, en total 16 botes, uno por cada una de las 15 cabras y otro con la mezcla de leches total (cántara).

## **3. Muestras del queso**

De cada grupo de cabras se generó un total de 9 casos distintos, dado el factor “antibiótico” y el factor “tiempo de maduración” con n=2 quesos analizados por cada caso. En ningún momento se utilizaron quesos ya abiertos en otro muestreo. Todo esto da un total de 18 quesos analizados en cada grupo de cabras, y un total de 36 muestras de quesos analizados para este estudio.

Las muestras de queso se tomaron a medida que este iba madurando y se conservaron a -20°C para evitar el crecimiento de microorganismos. Las 36 muestras llegaron al laboratorio, congeladas y con un peso medio entre los 25 y los 30 gramos.

## 4. Análisis Microbiológicos

### PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LECHE

Se analizaron un total de 96 muestras de leche, 48 por cada grupo de cabras. Para el análisis de la leche de cabra se realizaron cultivos en medios diferenciales para microorganismos lipolíticos y proteolíticos, así como un análisis de microorganismos aerobios mesófilos en la leche mezclada o cántara. Para ello se realizaron una serie de diluciones seriadas, añadiendo 1 mL de la dilución anterior a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada, previamente autoclavada.

### PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE QUESO

Las muestras de queso se dejaron a temperatura ambiente unos 15 minutos para descongelarla, se obtuvieron 25 gramos de queso que se homogeneizaron en 225 mL de agua de peptona, elaborada a partir de peptona bacteriológica (BD, New Jersey, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del etiquetado.

Al tener que homogeneizar el producto la dilución de menor relación que se puede obtener es de  $1 \times 10^{-1}$ , por lo que a partir de esta, haremos las diluciones seriadas como se especifica en el apartado anterior.

### ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS

Este tipo de análisis se realizó únicamente en las muestras de leche total o cántara. Para ello se hizo un cultivo por duplicado de las diluciones: Directa,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , de cada tipo de leche.

La siembra se realizó en profundidad como se describe en la norma (UNE-EN ISO 4833-1:2014), con medio de Plate Count (Scharlau, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se siembran por duplicado 1 mL en placas Petri vacías y luego se añade el medio de cultivo a 44-47°C y se homogeniza. Una vez solidificado el agar se lleva a incubar en estufa a 30°C durante 72h.

### ANÁLISIS DE BACTERIAS PROTEOLÍTICAS

Para el análisis de las bacterias con acción proteolítica se elaboró una metodología de trabajo a partir del manual de laboratorio Harrigan y McCance, 1979.

Para la obtención de 1 litro de medio de cultivo se utilizaron los siguientes ingredientes y proporciones: Se mezclaron en condiciones estériles 500 mL de medio de cultivo Plate Count (Scharlau, Barcelona, España) a doble concentración, autoclavado a 115°C durante 20 minutos con 500 mL de una dilución de leche en polvo desnatada) (Central Lechera Asturiana, Gijón, España), al 4% concentración final (pesada en doble concentración) autoclavada a 115°C durante 20 minutos.

Se utilizaron diluciones Directa,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  para las leches y de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  para los quesos. El cultivo se realizó en profundidad como se describe en la norma (UNE-EN ISO 4833-1:2014). Una vez el medio había solidificado se incuban las placas en estufa durante 72h a 30°C.

La determinación del crecimiento de microorganismos con acción proteolítica y su recuento se realizó por medio de la visualización de halos de digestión de caseína alrededor de este tipo de colonias.

## ANÁLISIS DE BACTERIAS LIPOLÍTICAS

Para el análisis de las bacterias con acción lipolítica se elaboró una metodología de trabajo a partir del manual de laboratorio Harrigan y McCance, 1979.

Para la obtención de 1 litro de medio de cultivo se utilizaron los siguientes ingredientes y proporciones: 10 g de peptona bacteriológica (BD, New Jersey, Estados Unidos), 10 mL de Tween 80, 15 g de agar-agar (Scharlau, Barcelona, España), 0,1 g de cloruro cálcico, 5 g de cloruro sódico (PanReac, Castellar del Vallès, España), 1000 mL de agua destilada. Todo se mezcló y se autoclavó a 115 °C durante 20 minutos.

Se utilizaron las mismas diluciones que en el caso del análisis de las bacterias de acción proteolítica. El cultivo se realizó en profundidad como se describe en la norma (UNE-EN ISO 4833-1:2014). Una vez el medio había solidificado se incuban las placas en una estufa durante 72h a 30°C.

La determinación del crecimiento bacteriano de tipo lipolítico y su recuento se realizó por medio de la visualización de halos de precipitación de ácidos grasos conjugados con iones  $\text{Ca}^{+2}$  alrededor de este tipo de colonias.

## ANÁLISIS DE COLIFORMES Y *E. coli*

Este análisis se realizó en superficie basado en la norma (ISO 16649-2) a partir de diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en muestras de queso, utilizando Agar Cromogénico de Coliformes (Scharlau, Barcelona, España) según las instrucciones de uso del mismo. Incubación 24h a 37°C.

La lectura se realiza contando colonias de color rosa-rojo como coliformes y colonias de color azul-purpura como *E. coli*.

## ANÁLISIS DE *Staphylococcus aureus*

Este análisis se realizó en superficie basado en la norma (UNE-EN ISO 6888-1) a partir de diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en muestras de queso, utilizando una Agar Baird Parker (Scharlau, Barcelona, España) según las instrucciones de uso del mismo. Incubación 48h a 37°C. Las colonias características de *Staphylococcus aureus* son puntiformes, negras con un halo de aclaramiento alrededor de la colonia.

## ANÁLISIS DE *Salmonella* spp.

El análisis se realizó en las muestras de queso. Para este fin se utilizó la metodología seguida en la norma UNE-EN ISO 6579:

-Fase de enriquecimiento: peptona bacteriológica (BD, New Jersey, Estados Unidos). Incubación 16h a 37°C.

-Fase de enriquecimiento: caldo Rapaport (Merck, Darmstadt, Alemania) y Tetrationato [Muller-Kaufman médium Base] (Scharlau, Barcelona, España). Incubación 24h a 37°C.

-Fase de aislamiento:

- Agar XLD [xylose lysine deoxycholate] (Scharlau, Barcelona, España). Incubación 24h a 37°C. Las colonias de características de *Salmonella* son rojas con o sin centro negro y las colonias de coliformes amarillas.
- Agar Hektoen (Scharlau, Barcelona, España). Incubación 24h a 37°C. Las colonias de características de *Salmonella* son verde azuladas con o sin centro negro y las colonias de coliformes color salmón.
- Agar Rambach™ (CHROMagar, Paris, Francia). Incubación 24h a 37°C. Las colonias de características de *Salmonella* son rojas y las colonias de coliformes azul o violeta.

## ANÁLISIS DE *Listeria monocytogenes*

Este análisis se realizó en las muestras de queso. Para este fin se utilizó la metodología seguida en la norma UNE EN ISO 11290-1, para ello se utilizó:

-Fase de enriquecimiento: en vez de caldo Half-Fraser en esta fase se utilizó peptona bacteriológica (BD, New Jersey, Estados Unidos).

-Fase de enriquecimiento: caldo Fraser (Merck, Darmstadt, Alemania).

-Fase de aislamiento:

- Agar Aloa (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) Las colonias de *Listeria* spp. son azules y las de *listeria monocytogenes* son azules con un halo de precipitado alrededor de la colonia.
- Agar Palcam (Scharlau, Barcelona, España). Las colonias de *Listeria* spp son grises con un halo negro alrededor.

## IDENTIFICACIÓN MEDIANTE TIRA API

Para realizar la identificación de bacterias por medio de Tiras API20E y API20NE resuspenderemos la colonia aislada que queramos identificar, por medio de asas de siembra de un solo uso, en 5 mL de agua destilada estéril. Una vez agitado el contenido de la dilución, rellenamos con una pipeta Pasteur los pocillos y seguiremos las instrucciones del fabricante para incubación y lectura de las Tiras API. Los resultados de la identificación se comprueban mediante lectura del código numérico resultante en la web apiweb™ ( <https://apiweb.biomerieux.com>) al que se accede con un código de cliente.

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Para determinar la influencia del factor “antibiótico” en todas las muestras y el factor “maduración” en quesos realizaremos un análisis estadístico con el programa Statgraphics Centurion XVI. Para ello comprobaremos si los datos se ajustan a una distribución normal y realizaremos de test de Kruskal-Wallis.

### III. RESULTADOS y DISCUSIÓN

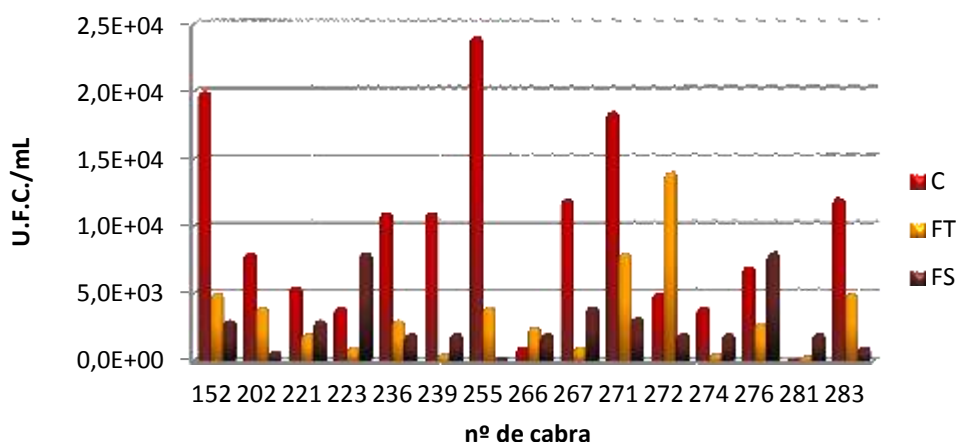
#### 1. Muestras de la leche de cabra

##### RECuento DE BACTERIAS PROTEOLÍTICAS

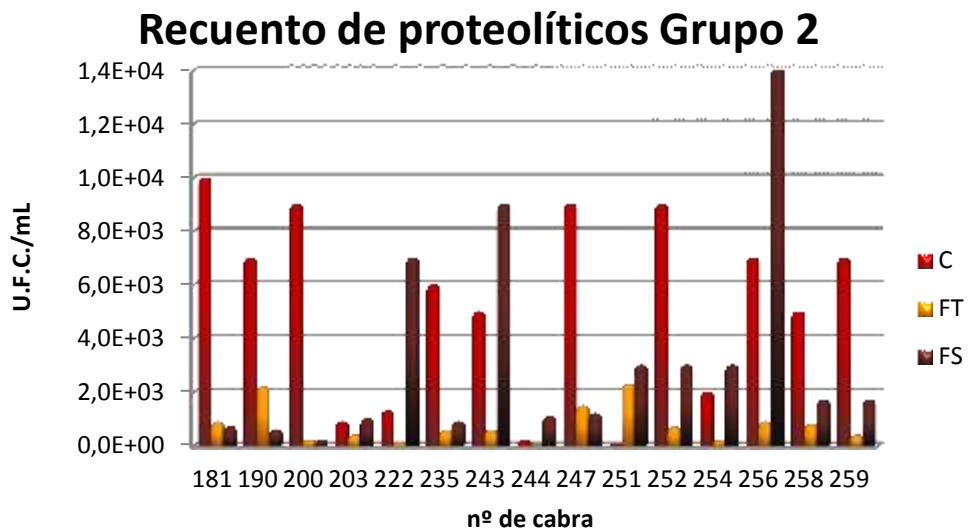
Los análisis de las muestras de leche de cabra control dan unos recuentos de bacterias proteolíticas que oscilan entre  $2,4 \cdot 10^4$  y  $2,4 \cdot 10^2$  UFC/mL incluso hay muestras en las que no se detectan, sin embargo después del tratamiento los recuentos son menores, entre  $1,4 \cdot 10^3$  y  $1 \cdot 10^2$  UFC/mL y similares a los recuentos después del periodo de supresión  $1,4 \cdot 10^4$  y  $2 \cdot 10^2$  UFC/mL (FIGURA 5). Los recuentos son muy variables dependiendo de los grupos de trabajo y de las cabras analizadas, destacan las cabras 152, 255, 271 en el grupo control y la cabras 256 en el grupo FS por sus altos recuentos.(FIGURAS 3 y 4).

Una vez comprobado que los datos no se ajustan a una distribución normal se aplica el test de Kruskal-Wallis que compara las medianas en lugar de las medias, para evaluar el efecto del tratamiento antibiótico sobre los recuentos. El resultado da un p-valor es 0.00. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%. La diferencia se encuentra entre los resultados del grupo C y los de FT y FS.

#### Recuento de proteolíticos Grupo 1



**FIGURA 3.** Gráfico de U.F.C./mL de bacterias proteolíticas de cada una de las muestras de leche de cabra del Grupo 1.



**FIGURA 4.** Gráfico de U.F.C./mL de bacterias proteolíticas de cada una de las muestras de leche de cabra del Grupo 2.

#### RECUESTO DE BACTERIAS LIPOLÍTICAS

Los análisis de las muestras de leche de cabra control dan unos recuentos de bacterias lipolíticas que oscilan entre  $1,5 \cdot 10^4$  y  $1,1 \cdot 10^1$  UFC/mL con bastantes muestras en las que no se detectan, sin embargo después del tratamiento los recuento son menores con máximos de  $5,0 \cdot 10^3$  UFC/mL para FT y  $1,0 \cdot 10^4$  UFC/mL para FT). (FIGURA 6) Los recuentos son muy variables dependiendo de los grupos de trabajo ya que en el segundo grupo se dan muchas muestras en las que no detectamos lipolíticos en las muestras control, y también de las cabras analizadas, cabe destacar los altos recuentos en las muestras después del periodo de supresión de las cabras 235, 239, 243. (FIGURAS 7 y 8).

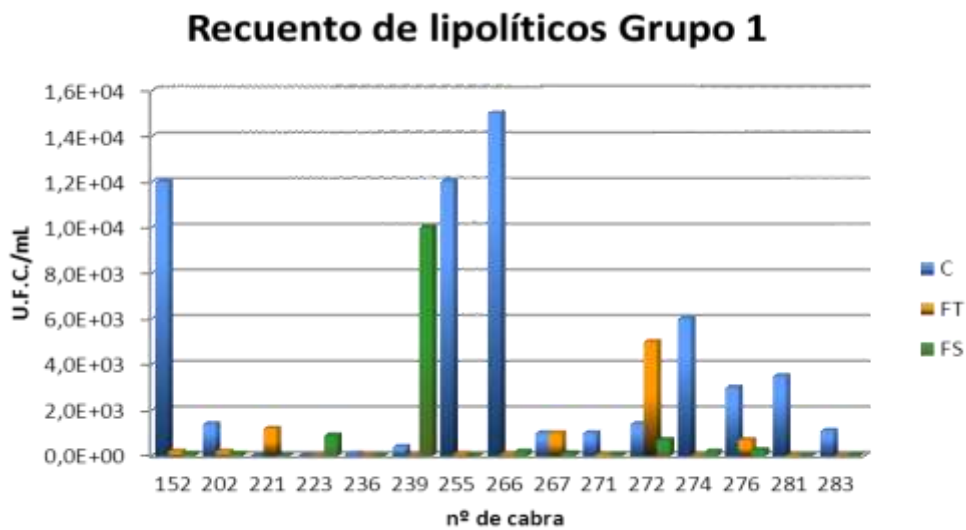
En este caso los datos tampoco se ajustan a una distribución normal por lo que se aplica el test de Kruskal-Wallis, para evaluar el efecto del tratamiento antibiótico sobre los recuentos de microorganismos lipolíticos. El resultado da un p-valor es 0,31. Puesto que el p-valor es superior a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.



**FIGURA 5.** Crecimiento de proteolíticos en agar leche



**FIGURA 6.** Crecimiento de lipolíticos en agar tween 80



**FIGURA 7.** Gráfico de U.F.C./mL de bacterias lipolíticas de cada una de las muestras de leche de cabra utilizadas en el ensayo para Grupo 1



**FIGURA 8.** Gráfico de U.F.C./mL de bacterias lipolíticas de cada una de las muestras de leche de cabra utilizadas en el ensayo para Grupo 2.

#### RECuento DE LECHE MEZCLADA O CANTARA.

Los resultados de la leche mezclada (TABLA 1) tienen valores similares a los máximos de cada uno de los recuentos. En el caso de los aerobios mesófilos son más elevados puesto que además de proteolíticos y lipolíticos, contamos todos los microorganismos existentes en la leche mezclada. Tenemos que considerar que es posible que en la mezcla de leches en cántara se den condiciones propicias para la reproducción de las bacterias y por lo tanto el aumento de los recuentos.

**TABLA 1.** Recuento de bacterias en U.F.C./mL de las muestras de leche de cabra mezcladas en cantara para la fabricación de queso de Tronchón.

	Grupo 1			Grupo 2		
	C	FT	FS	C	FT	FS
<b>Proteolíticos</b>	2,2 10 <sup>4</sup>	1,4 10 <sup>4</sup>	2,0 10 <sup>4</sup>	2,5 10 <sup>4</sup>	1,1 10 <sup>3</sup>	1,7 10 <sup>4</sup>
<b>Lipolíticos</b>	1,4 10 <sup>4</sup>	1,0 10 <sup>3</sup>	1,0 10 <sup>3</sup>	1,2 10 <sup>4</sup>	5,0 10 <sup>3</sup>	2,2 10 <sup>3</sup>
<b>Aerobios mesófilos</b>	1,8 10 <sup>5</sup>	1,4 10 <sup>5</sup>	1,1 10 <sup>5</sup>	2,9 10 <sup>5</sup>	4,6 10 <sup>4</sup>	8,0 10 <sup>4</sup>

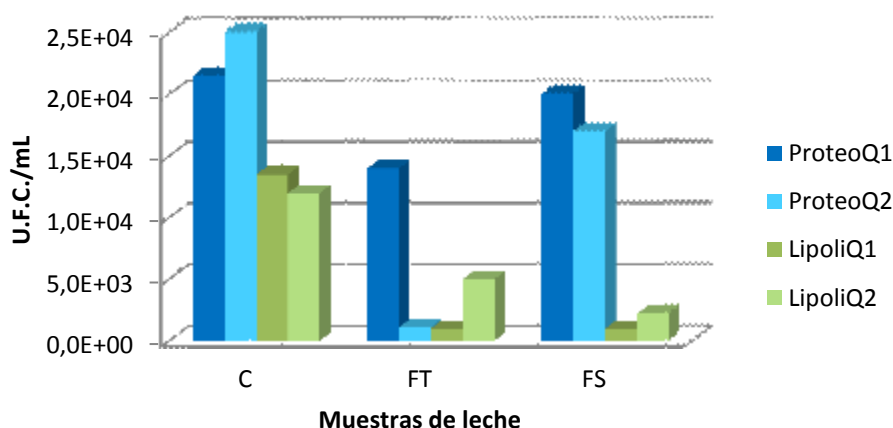
C: Control, FT: Finalizado periodo de tratamiento, FS: Finalizado periodo de supresión

Los recuentos de la leche de cabra mezclada dan resultados mayores para proteolíticos que para lipolíticos (FIGURA 9) y también se observa una disminución de los recuentos después del tratamiento antibiótico.

Los datos obtenidos para proteolíticos y lipolíticos en la mezcla, parecen tener la misma tendencia que las leches por separado, sin embargo en la cantara encontramos recuentos de aerobios mesófilos más elevados que estos, lo que indican un crecimiento microbiano, esto demostraría que el residuo de antibiótico existente en la leche no es suficiente para rebajar los recuentos microbianos. Si bien el tratamiento de las cabras sí que se demuestra más efectivo en la disminución de recuentos de proteolíticos y lipolíticos.

Según los resultados obtenidos por el trabajo realizado en el departamento de Ciencia Animal el residuo de antibióticos en esta leche fue de media de 68,71 µg/kg de antibiótico total en la leche después del tratamiento FT, y en la leche después del periodo de supresión FS, es indetectable. (Curotto. 2015). Efectivamente esa cantidad de antibiótico está por debajo de la C.M.I. de enrofloxacin necesaria que se calcula en una media de 0,5 µg/mL, por lo que no se detecta influencia en los recuentos.

### Recuentos de leche mezclada



**FIGURA 9.** Gráfico de U.F.C./mL de bacterias de cada una de las muestras de leche de mezcla o cantara utilizadas en las dos fabricaciones.



## 2. Muestras del queso Tronchón.

En el recuento de bacterias proteolíticas realizado a las muestras de quesos, ha sido negativo en todos los análisis, sin embargo todos los quesos dieron resultados positivos en el recuento de lipolíticos (TABLA 2). En este caso los recuentos pueden variar por el tratamiento antibiótico o por el tiempo de maduración. Según los resultados obtenidos por Curotto, 2015, el residuo de antibióticos en estos quesos fue de media de 117,48  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de antibiótico total en los quesos maduros fabricados con leche después del tratamiento FT, y en los quesos fabricados con leche después del periodo de supresión FS, es indetectable. Nuestros resultados no muestran que se vean afectados por la cantidad de antibiótico existente en el queso seguramente por estar por debajo de la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.) que se necesita para inhibir el crecimiento de las bacterias. Los recuentos realizados con las muestras de las diferentes fases del tratamiento de antibióticos son similares.

El tratamiento de datos con el programa estadístico nos muestra que no siguen una distribución normal por lo que se aplica test de Kruskal-Wallis, que respecto a la variable antibiótico da un p-valor de 0,09, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de queso según su concentración de antibiótico.

**TABLA 2.** Recuento de bacterias lipolíticos en U.F.C./g de las muestras de queso según tratamiento con antibiótico y tiempo de maduración.

Maduración	Queso 1			Queso 2		
	Antibiótico			Antibiótico		
	C	FT	FS	C	FT	FS
Día 0	$6,3 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^3$
	$2,2 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^3$
Día 30	$6,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^3$
	$4,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$2,6 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
Día 60	$1,4 \cdot 10^2$	$4,5 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^1$	$8,0 \cdot 10^1$
	$2,1 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^2$

C: Control, FT: Finalizado periodo de tratamiento, FS: Finalizado periodo de supresión

Sin embargo si aplicamos el test de Kruskal-Wallis, para los datos en relación del tiempo de maduración sí que obtenemos diferencias estadísticamente significativas con un p-valor de 0,00 en las muestras obtenidas con 60 días de maduración.

Podemos concluir que respecto a la concentración de bacterias lipolíticas que se encuentran en el queso fabricado en este estudio, la cantidad de residuo de antibiótico existente no tiene ninguna influencia mientras que el tiempo de maduración sí que disminuye los recuentos a los 60 días de maduración.

## RECUESTO DE COLIFORMES

En este caso, los recuentos dieron positivo en las muestras del Día 0, tanto para el queso 1 como para el queso 2 y en las tres fases del tratamiento con antibiótico. En el Día 30 de maduración también encontramos resultados positivos en ambos quesos pero mayor número en la fase FS del queso 1. Por último los coliformes se reducen a niveles indetectables por este recuento en el Día 60 de maduración. (TABLA 3)

**TABLA 3.** Recuento de coliformes totales en U.F.C./g de las muestras de queso según tratamiento con antibiótico y tiempo de maduración.

Maduración	Queso 1			Queso 2		
	Antibiótico			Antibiótico		
	C	FT	FS	C	FT	FS
Día 0	n.d.	Incont.	6,0 10 <sup>2</sup>	6,0 10 <sup>3</sup>	2,0 10 <sup>2</sup>	1,8 10 <sup>3</sup>
	4,0 10 <sup>3</sup> (*)	n.d.	5,0 10 <sup>2</sup>	Incont.	2,0 10 <sup>2</sup> (*)	9,0 10 <sup>2</sup> (*)
Día 30	n.d.	n.d.	1,0 10 <sup>2</sup>	1,00	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	1,1 10 <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
Día 60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

C: Control, FT: Finalizado periodo de tratamiento, FS: Finalizado periodo de supresión (\*) Colonias identificadas

Se ha realizado la identificación de colonias de coliformes al azar mediante tira API 20E, los resultados de estas colonias son:

- (\*):Muestra Queso 1-Control-Día0 *Enterobacter gergoviae*. Muy buena identificación. 99.8% ID.
- (\*):Muestra Queso 2-FT-Día0 *Hafnia alvei*. Excelente identificación. 99.9% ID.
- (\*):Muestra Queso 2-FS-Día0 *Pantoea* spp. (separado del genero *enterobacter*) Muy buena identificación. 99.2% ID.

El resultado de la identificación coincide con los coliformes que normalmente se encuentran entre la biota de la leche. (von Neubeck, 2015).

## ANÁLISIS DE PATÓGENOS DE QUESO DE CABRA.

Se ha realizado el análisis de patógenos que la legislación indica para el control de calidad de quesos. Reglamento 2073/2005 D.O.U.E. 22/12/2005 modificado por Reglamento CE 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007.

Se realizó el recuento de *E. coli*, recuento de Estafilocco coagulasa +, ausencia de Salmonela en 25 g y ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g.

### RECUESTO DE *E. coli*

El recuento de *E. coli* se realiza a la vez que el recuento de coliformes mediante siembra en placa con medio cromogénico de coliformes. (ISO 16649-2) La aparición de colonias de color azul-purpura es indicativo de la presencia de *E. coli*. Se realizaron los 36 recuentos y no se detectó ninguna colonia con las propiedades de *E. coli* por lo que el resultado fue ausencia de *E. coli* en todas las muestras.

### RECUESTO DE *Staphylococcus aureus* coagulasa +

El recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa + se realizó mediante siembra en placa con medio Baird-Parker, en el que se identifican colonias negras con halo de aclaramiento. Aunque en nuestros recuentos aparecieron colonias negras no tenían las características de *Staphylococcus aureus* por lo que el resultado fue de ausencia de *Staphylococcus aureus* en las 36 muestras.

### ANÁLISIS DE DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*

En el análisis de detección de *Listeria monocytogenes* en 25 g, se realizaron los 36 análisis según la norma UNE EN ISO 11290-1 con aislamiento de colonias en medio ALOA, en este medio las colonias de *Listeria monocytogenes* son azules con un halo de precipitación alrededor de las colonias. Los análisis de las muestras dan como resultados, en algunos casos, colonias azules pero en ningún caso con precipitado. A las colonias azules se les realizó una prueba bioquímica de confirmación que consiste en la siembra de agar sangre para comprobar la  $\beta$ -hemólisis. *Listeria monocytogenes* da esta prueba bioquímica positiva. Todas las colonias analizadas dieron la prueba  $\beta$ -hemólisis negativa por lo que no se detecta presencia de *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras.

### ANÁLISIS DE DETECCIÓN DE *Salmonella* spp

En el análisis de presencia y ausencia de *Salmonella* spp en 25 g, se realizaron los 36 análisis siguiendo la norma UNE-EN ISO 6579 utilizando como medios de aislamiento sólidos los medios Agar Rambach, Agar XLD y Agar Hektoen. En ninguno de los medios se identifican colonias características de *Salmonella* spp por lo que todas las muestras presentaron ausencia de *Salmonella* en 25 g.

En las placas del análisis de *Salmonella* aparecen colonias características de la presencia de coliformes en muestras en las que el recuento es negativo, esto es debido a que los coliformes aunque están en las muestras de queso no se detectan en los recuento por encontrarse en cantidades por debajo del límite de detección de los recuentos, mientras que en análisis de *Salmonella* hay una etapa de enriquecimiento donde aumenta el número de coliformes por lo que se detectan en estos análisis. (TABLA 4).

Las colonias de coliformes identificadas por medio de tira API 20E a partir de las placas del análisis de *Salmonella* spp. dieron todas como resultado *Enterobacter cloacae*. (TABLA 4).

**TABLA 4.** Presencia de coliformes (+) después del enriquecimiento en el análisis de *Salmonella* spp y muestras con colonias identificadas por Tiras API 20E.

Maduración	Queso 1			Queso 2		
	Antibiótico			Antibiótico		
	C	FT	FS	C	FT	FS
Día 0	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+
Día 30	+ (*)	-	+ (*)	-	+ (*)	+ (*)
	-	-	-	-	-	-
Día 60	-	-	-	+ (*)	-	-
	-	-	-	-	+ (*)	+ (*)

C: Control, FT: Finalizado periodo de tratamiento, FS: Finalizado periodo de supresión (\*)*Enterobacter cloacae*

De la misma forma aparecen colonias de color rosa en las placas de Agar Rambach que pueden inducir a la duda por lo que se realizó una resiembra de confirmación y pruebas de oxidasa. Al dar las colonias la prueba de oxidasa positivas se realizó la identificación mediante la tira API 20NE. Estas colonias aparecen en los quesos del Día 0.

El resultado de estas identificaciones fue:

Muestra Queso 1-FS-Día0-2- *Pseudomonas aeruginosa*

Muestra Queso 2-FS-Día0-1- *Pseudomonas aeruginosa*

Muestra Queso 2-FS-Día0-2- *Pseudomonas aeruginosa*

Las colonias rosas desaparecen a partir del día 30 de maduración, por lo que aún con fase de enriquecimiento las colonias desaparecen conforme avanza la maduración de los quesos, excepto para coliformes que perduran hasta en las muestras del Día 60.

#### IV. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos para proteolíticos y lipolíticos se ven influidos por el tratamiento de antibiótico a las cabras, en el caso de proteolíticos hay diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos del grupo control y los de después del tratamiento.

En el caso de leche mezclada encontramos recuentos de aerobios mesófilos altos, lo que indica un crecimiento microbiano, esto demostraría que el residuo de antibiótico existente en la leche no es suficiente para rebajar los recuentos microbianos.

Respecto al análisis de quesos, no encontramos bacterias proteolíticas pero sí lipolíticas. El valor de los recuentos de lipolíticos no se ve

influenciado por el residuo antibiótico que se encuentran en el queso, pero si por el tiempo de maduración que los reduce significativamente.

El análisis de patógenos nos demuestra la ausencia de estos en los quesos fabricados en este estudio.

Al analizar la cantidad de coliformes totales encontramos recuentos positivos hasta el día 30 de maduración. Sin embargo, en el análisis de *Salmonella* spp., que requiere un periodo de enriquecimiento, detectamos la presencia de coliformes en quesos de 60 días de maduración. La identificación de coliformes nos da como resultados bacterias típicas de la leche.

En las placas de aislamiento de *Salmonella* spp. encontramos colonias que identificamos como *Pseudomonas aeruginosa* que desaparecen a partir del día 30 de maduración.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del Departamento de Ciencia Animal y en particular a Dña. Pilar Molina Pons, Dña. M<sup>a</sup> Carmen Beltrán Martínez y Dña. Paloma Quintanilla Vázquez, que nos han proporcionado las muestras para realizar este estudio y nos han facilitado el trabajo de este proyecto.

## V. REFERENCIAS

- AENOR. UNE-EN ISO 4833-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en profundidad. ISO 4833-1:2013. Madrid: AENOR, 2014.
- AENOR. UNE-EN ISO 4833-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 ° C mediante la técnica de siembra en superficies. ISO 4833-2:2013. Madrid: AENOR, 2014.
- AENOR. UNE-EN ISO 6579. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. ISO 6579:2002. Madrid: AENOR, 2003.
- AENOR. UNE-EN ISO 6888-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica que utiliza el medio agar de Baird-Parker. Modificación 1: Incorporación de los datos de precisión.(ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003). ISO 6888-1/A1:2004. Madrid: AENOR, 2004.
- AENOR. UNE-EN ISO 11290-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. Modificación 1: Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. ISO 11290-1:1996/AM1:2004. Madrid: AENOR, 2005.
- Araya, V., Gallo, L., Quesada, C., Chaves, C., Arias, M.L. 2008. "Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuidos en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 58: 182-186.
- Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T., Fischer, L. 2015. "Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. International Dairy Journal. 49: 23-29.
- Blondeau, J.M., Borsos, S., Blondeau, L.D., Blondeau B.J. 2011. "In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat". Veterinary Microbiology 155: 284-290.

- Cristóbal, R., Maurtua, D. 2003. "Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima – Perú y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp". Revista Panamericana Salud Pública. 14(3): 158-64.
- Curotto Zola, Jesús. 2015. Efecto de la presencia de enrofloxacin en la leche sobre la elaboración y características del queso de cabra. Trabajo Fin de Master. U.P.V.
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., Gaillard, J.-L., Dary A. 2008. "Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them". International Journal of Food Microbiology. 125: 188-196.
- Fonseca, C.R., Bordin, K., Fernandes, A.M., Rodrigues, C.E.C., Corassin, C.H., Cruz, A.G., Oliveira, C.A.F. 2013. "Storage of refrigerated raw goat milk affecting the quality of whole milk powder". American Dairy Science Association, 96 :4716–4724.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1998. "Development of Probiotic Cheese Manufactured from Goat Milk: Response Surface Analysis via Technological Manipulation". Journal of Dairy Science, 81:1492–1507.
- Harrigan, W.F., McCance, M.E. "Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos". Academia. 1979.
- Hassan, A.N., Frank, J.F. 2011. Microorganisms associated with milk. In J. W Fuquay, P. F Fox & P.L. H McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (2<sup>nd</sup> ed.), (pp.447-457). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Hassouan, M.K. 2006. "Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- ISO. ISO 16649-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. ISO 16649-2:2001. Ginebra: ISO, 2001.
- Real Decreto 752/2011, de 27 de mayo, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra. Boletín Oficial del Estado, 9 de junio de 2011, núm. 137, p. 58609.
- Reglamento 2073/2005 D.O.U.E. 22/12/2005 modificado por Reglamento CE 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 15 de noviembre de 2005, núm. 338, p. 1.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. "Brock Biología de los Microorganismos". 12<sup>a</sup> edición. Pearson Addison Wesley, 2009.
- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., De Vos P., Devreese B., Heyndrickx M., De Block J. 2009. "Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species". International Journal of Food Microbiology, 133: 68-77.
- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Krenz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M., 2015. "Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential". International Journal of Food Microbiology, 211: 57-65.
- Walker, R.D. 2000 Fluoroquinolones. In Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 3rd edn. Eds Prescott, J.F, Baggot, J.D. & Walker, R.D. pp. 315–338. Iowa State University Press, Ames, IA.