

## RELACIÓN ENTRE MICROORGANISMOS AMBIENTALES DE LA GANADERÍA Y DE LA LECHE DE TANQUE

Quintana<sup>1</sup>, A.R., Jiménez<sup>1</sup>, L., Pérez-Guzmán<sup>1</sup>, M.D., Garzón<sup>2</sup>, A.I., Seseña<sup>3</sup>, S., Palop<sup>3</sup>, M.L.L., Arias<sup>1</sup>, R.

<sup>1</sup>Centro Regional de Selección y Reproducción Animal-IRIAF. Valdepeñas. Ciudad Real.

<sup>2</sup>Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica. Universidad de Castilla-La Mancha; alvaroq@jccm.es

### INTRODUCCIÓN

El sector del ovino lechero en Castilla-La Mancha tiene una gran importancia socioeconómica y un papel relevante en el mantenimiento del medio rural, siendo la base territorial de la DOP Queso Manchego, marca de calidad diferenciada de gran prestigio a nivel nacional e internacional. En el ámbito agroalimentario han cobrado gran importancia aquellas actuaciones dirigidas a la protección de la salud pública, para garantizar la seguridad alimentaria. La calidad higiénica de la leche de tanque se determina de forma rutinaria en los sistemas de control de calidad, mediante el recuento de mesófilos totales, tal como establece el Reglamento CE nº 853/2004. Sin embargo, existen diferentes estudios que evidencian que éste es un parámetro poco específico para determinar la presencia y el origen de los diferentes grupos microbianos de interés tecnológico, higiénico-sanitario, etc. en la leche de tanque (Gonzalo et al., 2002; Jiménez et al., 2018). El ambiente de las ganaderías tiene una carga microbiana muy diversa, y se ha comprobado que dichas comunidades microbianas tienen una relación directa con los microorganismos presentes en la leche (Montel et al., 2003). Sin embargo, las fuentes de contaminación y los factores que pueden afectar a los diferentes grupos microbianos de la leche no han sido tratados en profundidad (Vacheyrou et al., 2011). Por ello, se plantea este trabajo con el objetivo de estudiar la relación entre la microbiota presente en la leche de tanque y aquella del aire de las salas de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño en ganaderías de ovino lechero.

### MATERIAL Y MÉTODOS

La toma de muestras se llevó a cabo en doce ganaderías seleccionadas de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Manchega (AGRAMA), a razón de una toma en cada estación del año 2018. En cada visita se recogieron dos muestras de aire, una en la sala de ordeño y otra en la nave de las ovejas de ordeño. Para ello se utilizó un muestreador de aire AirPort MD8 (Sartorius Stedim Biotech), que opera a través del método de filtración e impacto de los microorganismos sobre un filtro de gelatina (Sartorius Stedim Biotech) siendo el volumen final filtrado de 1m<sup>3</sup> de aire. Asimismo, en cada ocasión se tomaba una muestra de leche del tanque de refrigeración que había sido previamente agitado, utilizando para ello botes estériles. Las muestras fueron trasladadas inmediatamente al Laboratorio de Lactología del CERSYRA para su procesamiento.

El filtro de gelatina se colocaba en tubos con 25 mL de solución salina (NaCl 9 g/L) estéril para su completa disolución y seguidamente se realizaban las diluciones seriadas necesarias. En las muestras de aire y de leche se realizaron recuentos en placa de mesófilos totales (RMT), para lo que se utilizó Tryptone Soy Agar (TSA, Panreac, Barcelona) adicionado con 100 mg/L de cicloheximide (Sigma, St. Louis, USA) incubando las placas a 30°C durante 72 horas; de esporas aerobias (EA), en medio TSA al que se añadía 2 g/L de almidón (Merck, Madrid), tras pasteurizar las muestras, incubando las placas a 30°C durante 48 horas; de bacterias ácido-lácticas (BAL), en el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Oxoid, Basingstoke, UK) con 100 mg/L de cicloheximide y 50 mg/L de sodium azide (Sigma, St. Louis, USA), incubándose las placas a 30°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis (Anaerogen Oxoid Limited, Hampshire, Inglaterra); de levaduras (LEV), en el medio Glucose Cloranfenicol Agar al que se añadía 200 µg/mL de cristales de difenilo (Sigma, St. Louis, USA), incubando a 25°C durante 48 horas; de mohos (MOH), en el agar Rosa de Bengala (Panreac, Barcelona) que se incubaba a 28°C durante 96 horas y de *Staphylococcus* (ESTAF), para lo que se utilizó el agar salino Mannitol que se incubaba a 37°C durante 24 horas.

Los datos de los recuentos obtenidos se transformaron en logaritmos decimales y se realizó un análisis de correlaciones de Spearman con el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS v9.3, USA, 2011) considerando la relación entre los microorganismos

presentes en las muestras de leche y aquellos de las muestras de aire procedentes de los dos espacios muestreados, así como la relación entre las dos muestras de aire.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar del bajo número de muestras analizadas (n=48), se han obtenido correlaciones estadísticamente significativas tanto entre los recuentos microbianos de la leche de tanque y los de las muestras de aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño, como entre los recuentos de las muestras de aire de ambas salas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Correlaciones entre los recuentos de distintos de los microorganismos analizados en las muestras leche de tanque (L), de aire de la sala de ordeño (1) y de aire de la nave de las ovejas de ordeño (2).

	RMT1	EA1	BAL1	LEV1	MOH1	ESTAF1	RMT2	EA2	BAL2	LEV2	MOH2	ESTAF2
RMT-L	0.17	0.09	0.10	-0.01	0.04	0.06	0.10	0.00	0.01	0.11	0.07	0.11
EA-L	0.00	<b>0.34*</b>	0.25	0.22	0.02	0.22	-0.08	<b>0.37*</b>	0.09	0.09	-0.02	0.00
BAL-L	0.07	-0.10	0.09	0.09	-0.01	0.12	-0.10	<b>-0.31*</b>	-0.09	0.01	-0.13	-0.08
LEV-L	0.08	0.09	0.26	0.18	-0.01	0.12	-0.13	-0.04	0.07	0.25	-0.06	-0.03
MOH-L	0.02	0.14	0.28	-0.08	0.00	0.13	0.00	0.20	0.01	0.15	-0.01	0.00
ESTAF-L	<b>0.33*</b>	0.17	0.18	-0.16	0.15	0.24	0.13	0.09	0.13	0.08	-0.03	0.11
RMT1							<b>0.33*</b>	<b>0.33*</b>	0.28	0.09	<b>0.30*</b>	0.24
EA1							0.08	<b>0.35*</b>	0.00	-0.17	0.13	0.00
BAL1							0.22	<b>0.35*</b>	<b>0.45**</b>	-0.03	0.11	0.26
LEV1							-0.06	-0.22	-0.12	0.19	-0.14	-0.12
MOH1							0.21	0.18	0.07	-0.03	<b>0.39**</b>	0.02
ESTAF1							0.22	<b>0.36*</b>	<b>0.32*</b>	0.20	-0.05	0.23

\*\*La correlación es significativa al nivel  $p < 0.01$  (bilateral). \*La correlación es significativa al nivel  $p < 0.05$  (bilateral). Microorganismos: RMT: mesófilos totales; EA: esporas aerobias; BAL: bacterias ácido-lácticas; LEV: levaduras; MOH: mohos; ESTAF: Staphylococcus.

Como puede observarse en la Tabla 1, existe una correlación estadísticamente significativa entre los recuentos de esporas aerobias en la leche (EA-L) y aquellos de las muestras de aire de la sala de ordeño (EA1) ( $r=0,34$ ;  $p < 0,05$ ), y de la nave de las ovejas de ordeño (EA2) ( $r=0,37$ ;  $p < 0,05$ ). De igual manera, se observa una correlación positiva ( $r=0,35$ ;  $p < 0,05$ ) entre los recuentos de esporas en las muestras de aire de ambos espacios: sala (EA1) y nave de ordeño (EA2). De todos los grupos microbianos analizados sólo en el caso de las esporas aerobias se encontró correlación tanto entre las muestras de aire como también entre las esporas de ambos ambientes y las muestras de leche, evidenciando la resistencia de las esporas a las condiciones ambientales estresantes (sequedad, temperatura, radiaciones, etc.) (Matković et al., 2007), lo que favorecería su transferencia desde el aire a la leche.

Asimismo, se observa una correlación positiva y significativa ( $r=0,33$ ;  $p < 0,05$ ) entre el recuento de estafilococos en leche de tanque (ESTAF-L) y de mesófilos totales en el aire de la sala de ordeño (RMT1), así como una correlación positiva, aunque no significativa, entre el recuento de estafilococos de la leche de tanque (ESTAF-L) y del aire de la sala de ordeño (ESTAF1). Con ello se comprueba que también existen diferencias en las relaciones de las formas vegetativas entre el aire de la sala de ordeño y la leche de tanque, así como la importancia de las condiciones higiénicas de las instalaciones, que puede condicionar los niveles de mesófilos totales y el de estafilococos en la leche como indicador del estado de la sanidad mamaria del rebaño (Gonzalo et al., 2002; Jayarao and Wolfgang, 2003).

Por otra parte, se observa una correlación positiva ( $r=0,35$ ;  $p < 0,05$ ) entre el recuento de bacterias lácticas en el aire de la sala de ordeño (BAL1) y de esporas en el aire de la nave de ordeño (EA2), y una correlación negativa entre el recuento de bacterias lácticas en la leche de tanque (BAL-L) y de esporas en el aire de la nave de las ovejas de ordeño (EA2) ( $r=-0,31$ ;  $p < 0,05$ ), en concordancia con la correlación negativa, aunque no significativa, entre ambos grupos de microorganismos entre el aire de la sala de ordeño y la leche de tanque.

Este resultado indicaría la relación entre ambos tipos de microorganismos y los diferentes ambientes de la ganadería, y evidencia que existen diferencias en las relaciones entre microorganismos en función del tipo de muestra, estación del año, características de los alojamientos (material de cama, etc.) (Monsallier et al., 2014), y las características propias de una forma de resistencia como son las esporas.

Son destacables las correlaciones encontradas entre muchos de los microorganismos presentes en el aire de la sala y de la nave de ordeño. Así se observan correlaciones positivas y significativas para los recuentos de mesófilos totales ( $r=0,33$ ;  $p<0,05$ ), esporas aerobias ( $r=0,35$ ;  $p<0,05$ ), mohos ( $r=0,39$ ;  $p<0,01$ ) o bacterias lácticas ( $r=0,45$ ;  $p<0,01$ ), siendo también las correlaciones positivas para el recuento de las levaduras o de los estafilococos entre ambos ambientes, aunque estas no llegan a ser estadísticamente significativas. Por último, se observan correlaciones positivas entre el recuento de estafilococos de la sala de ordeño (ESTAF1) con otros grupos microbianos como las esporas aerobias (EA2) ( $r=0,36$ ;  $p<0,05$ ) y bacterias lácticas (BAL2) ( $r=0,32$ ;  $p<0,05$ ) de la nave de ordeño. Popescu et al. (2011) también observaron una relación directa entre las condiciones higiénicas de los alojamientos de los animales con el recuento microbiano en el aire de la ganadería, circunstancia que explicaría la relación entre los recuentos de microorganismos del aire de la sala y de la nave de ordeño.

A la vista de estos resultados, y a modo de conclusión, se evidencia que existe relación entre los recuentos de diferentes grupos microbianos de importancia ambiental en el aire de la sala de ordeño y de la nave de las ovejas de ordeño, en particular de las esporas aerobias que también muestran su relación entre estos ambientes y la leche de tanque. En esta línea, sería interesante continuar con estudios que determinen la casuística de la transferencia de microorganismos entre el aire de los ambientes estudiados y la leche de tanque de las explotaciones ovinas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOUE L nº 139/55, 2004.
- Gonzalo, C. et al. 2002. *J. Dairy Sci.* 85: 1460-1467.
- Jayarao, B.M., Wolfgang, D.R. 2003. *Vet. Clin. Food Anim.* 19: 75-92.
- Jiménez, L. et al. 2018. *FCV-LUZ / Vol. XXVIII*, 1: 11-18.
- Matković, K. et al. 2007. *Animal Sci.*, 52: 249–254.
- Monsallier, F. et al. 2014. *Options Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens*, 109.
- Montel, M.C. et al. 2003. *INRA Productions Animales* 16: 279–282.
- Popescu, S. et al. 2011. *African J. Agric. Res.* 6(32): 6726–6734.
- Vacheyrou et al. 2011. *Int. J. Food Microbiol.* 146: 253–262.

**Agradecimientos:** A los ganaderos de AGRAMA por facilitar e interesarse por el estudio.

#### RELATIONSHIPS BETWEEN MICROBIAL COMMUNITIES IN THE ENVIRONMENTAL DAIRY FARM AND THE BULK TANK MILK

**ABSTRACT:** The dairy farm environment plays an important role in diversity of milk because it may influence the microbial communities through the air from the stables to the milk. This study aims at evaluating the microbiological quality of milk and to assess the microbial transfers through the farm environment. The air samples were collected in the breed shed and the milking parlour in twelve Spanish farms. In addition, a bulk tank milk sample was sampled for the microbial analysis. Results showed that significant correlations appear for different microbial groups between the air of the milking parlour and the air of the stable, as well as this farm environment and bulk tank milk. The aerobic spores present in the farm environment correlate with those found in milk. These aerobic spores also correlate positively with lactic acid bacteria found in the farm environment, but negatively with those found in milk. Therefore, these results showed that there is a relationship between both places of the farm environment, and this microbial flow to the bulk tank milk depends on the resistance of the microorganism.

**Keywords:** milk, microbial transfer, airborne bacteria, farm.