



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CAMPUS TABASCO**

**PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**“CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y CALIDAD  
MICROBIOLÓGICA DEL QUESO DE PORO DEL MUNICIPIO DE BALANCAN,  
TABASCO, MÉXICO”**

**I.A.A. FERNANDO PÉREZ PACHECO**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**H. CÁRDENAS, TABASCO**

**2012**

La presente tesis, titulada: “**Caracterización de parámetros físico-químicos y calidad microbiológica del queso de poro del municipio de Balancán, Tabasco**”, realizada por el alumno: **Fernando Pérez Pacheco**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PROGRAMA DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR



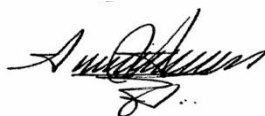
CONSEJERO: \_\_\_\_\_

DR. ADOLFO BUCIO GALINDO



ASESOR (A): \_\_\_\_\_

DRA. CONSUELO DEL CARMEN BAUTISTA MUÑOZ



ASESOR (A): \_\_\_\_\_

DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

H. CARDENAS, TABASCO, A 02 DE AGOSTO DE 2012

## RESUMEN

El siguiente trabajo de tesis tuvo por objeto ampliar el conocimiento sobre los quesos ácidos manufacturados con leche bronca, y en específico en generar información sobre la calidad microbiológica y los factores fisicoquímicos del queso poro genuino del municipio de Balancán, Tabasco, México. Entre los microorganismos indicadores evaluados se tuvieron las siguientes bacterias patógenas: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, coliformes y *Listeria monocytogenes* a diferentes tiempos de almacenamiento. Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron: la Actividad de agua (Aw), el pH, el contenido de sal (NaCl) y la acidez. Se encontró que el queso poro tiene valores de pH cercano a 4.0, la concentración de NaCl, en un intervalo de 3.96 a 4.27%, el contenido de Aw, con un intervalo de 0.93 a 0.96 (relativamente bajo), y los de acidez de 0.54 a 0.87. Aunque existe presencia de algunos patógenos al tiempo cero, su número no aumenta conforme pasa el tiempo de almacenamiento, posiblemente como consecuencia de que los parámetros fisicoquímicos son limitantes para su crecimiento. La presencia de patógenos en el queso poro solo puede disminuirse mejorando las Buenas Prácticas de Higiene e incorporando un plan de ARPC en los procesos de manufactura.

## ABSTRACT

The following thesis had the aim to increase the knowledge of acid cheeses manufactured with raw milk, and specifically to generate information on the microbiological quality physicochemical factors of queso poro genuino from Balacán, Tabasco, Mexico. Among the indicators microorganisms tested were taken the following bacterial pathogens: *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, coliforms and *Listeria monocytogenes* at different storage times. The physicochemical parameters studied were: Waters activity, pH, the salt content (NaCl) and the acidity. It was found that the queso poro has values of pH near 4.0, the NaCl concentration in a range from 3.96 to 4.27%, the content of Aw, ranging from 0.93 to 0.96 (relatively low), and those of acidity of 0.54 to 0.87. Although there were presence of some pathogens at time zero, the number does not increase as time goes on storage, possibly as a result of the physicochemical parameters are limiting for growth and temperature of storage was low. The presence of pathogens in the queso poro can only be reduced by improving the Good Hygienic Practices and incorporating a HACCP plan in manufacturing processes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Adolfo Bucio Galindo, quien a pesar de los problemas siempre me apoyo, alentó y llamo al orden, para conseguir que este trabajo se transformara de idea en realidad.

A las Dras. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz y Ana María Hernández Anguiano, mis asesoras quienes a pesar de todo continúan conmigo en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindar su apoyo a través de la beca No. 294285 y al proyecto de investigación de un servidor; al Programa de la Maestría de Producción Agroalimentaria en el Trópico, al Concejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CCYTET) y a la Sociedad de Productores de Quesos de Poro Genuino de Balancán por la colaboración prestada para llevar a buen puerto este trabajo. A la línea prioritaria de Investigación 12 y al proyecto “Desarrollo de un queso MAP (Microrregiones de Atención Prioritaria) inocuo” por el apoyo financiero.

A todo el personal directivo, académico y administrativo del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, por su trato, consideraciones y apoyo para mi persona.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a:

Mi Familia, mis padres Avenamar y María del Carmen la guía y ejemplo de mi vida, a Sofía y Abenamar, compañeros en ese largo viaje de aprendizaje que es la vida como hijos y hermanos, a Leonardo mi sobrino cuyo bienestar cuando era todavía un bebe en gestación fue la idea y motivación detrás de mi interés en la microbiología.

Las personas integrantes de mi Consejo Particular por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo y mis problemas.

Los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>V</b>
<b>INDICE DE CONTENIDO</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Objetivos particulares</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Hipótesis</b>	<b>2</b>
<b>3 REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Introducción</b>	<b>3</b>
3.1.1 Clasificación y definición de los Quesos ácidos	4
3.1.2 Los quesos frescos	4
3.1.3 Quesos madurados	5
3.1.4 Producción	9
<b>3.2 Los microbios y las fuentes de microbios en quesos de leche cruda (bronca)</b>	<b>9</b>
3.2.1 Los microbios con una función específica	10
3.2.2 Los patógenos microbianos	12
<b>3.3 Factores que limitan el crecimiento de patógenos</b>	<b>17</b>
3.3.1 pH	17
3.3.2 pH y la temperatura	18
3.3.3 La alcalinización del queso	21
3.3.4 Otras barreras	21
3.3.5 Adaptación al estrés	21
<b>3.4 Brotes de enfermedades por patógenos en queso</b>	<b>21</b>
<b>3.5 Las estrategias utilizadas para mejorar el nivel de inocuidad microbiológica de los quesos de leche bronca</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIALES Y METODOS</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Localización del Área de Estudio</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Plan de Muestreo y Análisis en el Queso de Poro</b>	<b>24</b>

4.2.1	Determinación de la Actividad de Agua (Aw)	24
4.2.2	Determinación del contenido de sal (NaCl)	24
4.2.3	Determinación de Acidez	25
4.2.4	Determinación del pH	25
<b>4.3</b>	<b>Diseño experimental</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Muestreo</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Pre enriquecimiento de muestra</b>	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Siembra, inoculación y detección en placa.</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i></b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Factores intrínsecos en el queso poro</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b><i>RECOMENDACIONES</i></b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b><i>LITERATURA CITADA</i></b>	<b>38</b>
<b>9</b>	<b><i>ANEXO</i></b>	<b>43</b>
<b>9.1</b>	<b>Anexo I</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

---

Tabla 1. Microorganismos estudiados, medios selectivos empleado y características de las colonias con las que se realizo la identificación	28
Tabla 2. Factores intrínsecos en el queso poro	30
Tabla 3. Análisis del efecto de la temperatura en los factores intrínsecos	30
Tabla 4. Análisis de los patógenos presentes en el queso	31
Tabla 5. Valores promedio encontrados en el queso de poro (Log UFC/g) a 0 Días	32
Tabla 6. Valores promedio encontrados en el queso de poro (Log UFC/g) a 0 Días	32
Tabla 7. Valores promedio encontrados en el queso de poro (Log UFC/g) a 7 Días	33
Tabla 8. Límites máximos y mínimos de patógenos en quesos	33

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

---

Fig. 1 Clasificación de los Quesos	6
Fig. 2 Esquema simplificado de clasificación de los quesos ácidos elaborados con leche bronca por obstáculos microbianos.	7
Fig. 3 Esquema para la fabricación tradicional de queso ácido a partir de leche bronca.	8
Fig. 4 El tiempo de exposición necesario para disminuir las poblaciones de <i>L. monocytogenes</i> tres unidades logarítmicas.	19
Fig.5 El tiempo de exposición necesario para disminuir las poblaciones de A) <i>L. monocytogenes</i> , B) <i>S. aureus</i> , C), <i>E. coli</i> O157: H7, D), <i>Salmonella spp</i> , tres unidades logarítmicas.	20

---

# 1 INTRODUCCIÓN

El queso de poro del municipio de Balancán es uno de los 35 tipos de quesos considerado genuinos que se producen en México (Villegas, 1993). Los quesos genuinos son elaborados solamente con leche fluida y algunos aditivos permitidos, se fabrican por todo el territorio nacional y poseen una larga tradición que se remonta a décadas y aun siglos. Son productos alimentarios que expresan la diversidad geográfica y cultural del país y que requieren ser revalorados y protegidos porque varios de ellos tienden a desaparecer al no poder integrarse a mercados cada día más competidos. Entre las causas de su desaparición se encuentran las bajas cantidades de producción, el incumplimiento de las regulaciones sanitarias y la falta de tecnología, entre otras (Villegas, 2004).

El queso de poro es un producto alimenticio, elaborado de manera artesanal, del cual se desconocen muchas de sus características tanto físico-químicas como microbiológicas. Ya que en su proceso de fabricación se usa leche bronca, el producto en cuestión podría no cumplir con todas las disposiciones sanitarias establecidas en su elaboración y para su consumo.

De acuerdo a ICMSF (2006), *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 son los microorganismos patógenos de mayor importancia en la leche y productos lácteos, ya que frecuentemente se asocian con brotes de enfermedades (ICMSF, 2006).

En México de acuerdo con lo descrito en la NOM-243-SSA1-2010, los intervalos tolerados de presencia de las bacterias anteriormente indicadas son:  $\leq 100$  UFC/g de *coliformes*; 1000 y 100 UFC/g, para *S. aureus* en quesos frescos y madurados respectivamente; ausencia de *Salmonella* en ambos tipos de quesos (en 25g de producto); *L. monocytogenes* negativo en ambos tipos de quesos.

La presencia de bacterias patógenas no es igual en todos los quesos, debido a diferencias en las características fisicoquímicas y métodos de elaboración; por ejemplo, los quesos ácidos y con baja humedad raramente han sido asociados con brotes de enfermedades (Pacheco y Bucio, 2010). Los factores que afectan la supervivencia de los patógenos se clasifican en extrínsecos e intrínsecos; en los primeros se encuentran el pH, la actividad del agua ( $A_w$ ), la acidez, el potencial REDOX, el contenido de sal y las propiedades antimicrobianas del queso; y en los segundos, la temperatura de almacenamiento y el empaque (ICMSF, 2006).

## **2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la calidad microbiológica y las características fisicoquímicas del queso poro.

### **2.1 Objetivos particulares**

- Determinar la calidad microbiológica del queso poro elaborado con leche bronca de acuerdo a la norma NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.
- Evaluar las características fisicoquímicas que caracterizan al queso poro,
- Evaluar si durante el almacenamiento se afectan las características fisicoquímicas del queso poro.
- Evaluar si durante el almacenamiento se afecta la calidad microbiológica del queso poro.

### **2.2 Hipótesis**

- Aunque el queso poro presenta barreras que limitan el crecimiento microbiano, puede contener microorganismos patógenos.

### 3 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Introducción

El queso tiene una larga historia en la dieta humana (Walther *et al*, 2008). La elaboración de queso se inicio hace siglos como un medio de concentrar la leche cruda a través de la precipitación de las proteínas de la leche por medio de la acidificación (Donnelly, 2004). Las primeras cuajadas acidas posiblemente se produjeron debido al proceso espontaneo de fermentación de los azucares de la leche por la acción de las bacterias lácticas, que son parte de la biota adventicia de la leche. Esas cuajadas al romperse, expulsarían suero y concentrarían los sólidos de la leche. Al agregarse sal a la cuajada, aumentaba su sabor y se tenía un alimento de alto valor nutritivo (Walther *et al*, 2008).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron probablemente los principales agentes en la producción de leche acidificada (fermentada) y productos lácteos derivados. Esto es consecuencia de que ellas están naturalmente presentes en la ubre, la leche cruda de animales sanos y se han extendido en el medio ambiente de los sitios donde se produce y procesa la leche (Walstra *et al*, 2006). Muchas especies de BAL tienen el estatus de “Generalmente reconocidas como seguras” (GRAS), y son ampliamente utilizadas en la fabricación de productos lácteos. La característica principal de BAL es la producción de ácidos, especialmente el ácido láctico. La capacidad inhibidora de este ácido se encuentra en su reducción del pH a niveles por debajo del cual otras bacterias no pueden iniciar el crecimiento. El ácido láctico tiene sus propias cualidades sensoriales y las propiedades antimicrobianas (Doores, 2005). El ácido láctico tiene un sabor ácido y agradable. Se ha reconocido generalmente como seguro (GRAS) por la FDA y la CE.

*Versión traducida del siguiente documento:*

Pérez Pacheco F, Bucio Galindo A. 2010. Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth; (Mendez Vilas, ed). En: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Vol. 2. 1205-1210. Formatex Research Center. (Anexo I)

### **3.1.1 Clasificación y definición de los Quesos ácidos**

En la actualidad para la producción de quesos ácidos, se usa la coagulación ácida o mixta que se sigue realizado por las pequeñas empresas de todo el mundo. El método consiste en la adición de microorganismos acidificantes (BAL) por ejemplo con la adición de suero, ácidos (p.ej, el jugo de limón) y también con el uso de enzimas (cuajo). El cuajo producido es un gel firme y elástico (como el queso) en comparación con el gel frágil y débil producido por coagulación exclusivamente ácida (p. ej., yogur) (Vétier, *et al*, 2003).

Existen variaciones importantes en los procedimientos de fabricación de los quesos de cuajada ácida / o mixta lo cual influye en la composición y las propiedades organolépticas así como las propiedades mecánicas. El principal factor en la clasificación de estos quesos es su edad, (jóvenes o maduros), pero también intervienen otros factores, entre ellos el contenido de humedad y las propiedades de textura; existen otras peculiaridades tales como los métodos de salazón o maduración (Fig. 1). Sin embargo, la clasificación y definición de los quesos, en la mayoría de los países, está regulada por un código o ley. Una clasificación alternativa de los quesos ácidos elaborados con leche cruda que se propone es por las barreras relacionadas con la inocuidad microbiana (Fig. 2).

### **3.1.2 Los quesos frescos**

Según Schulz-Collins y Senge (2004) los quesos frescos, generalmente contienen mucha agua, y por lo tanto son bajos en materia seca (MS), bajos en grasas y proteínas y alto contenido de lactosa / lactato.

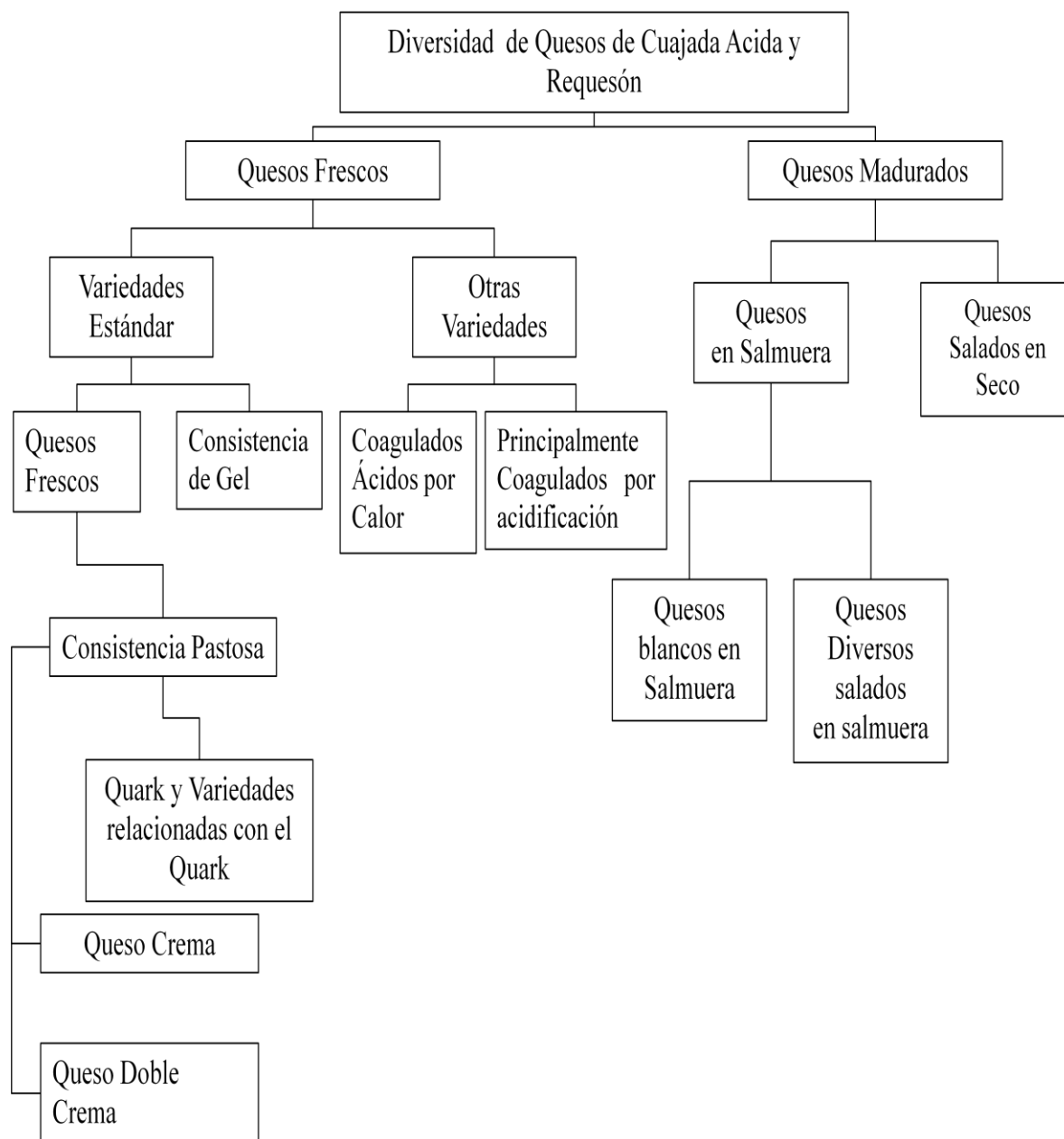
En los quesos frescos obtenidos por coagulación ácida, la mayor parte del calcio se disuelve durante la acidificación y se retira con el suero de leche; de ahí que los quesos frescos son mucho más bajos en calcio que los quesos obtenidos por coagulación enzimática (Schulz-Collins y Senge, 2004). Se pueden dividir en categorías diferentes, por ejemplo, por el método de coagulación: ácido, ácido cuajo, ácido-calor, etc, su consistencia de pasta, granulada o como un gel, o materia prima-leche o suero. Los quesos frescos sin conservantes adicionales pueden echar a perder en cuestión de días.

### 3.1.3 Quesos madurados

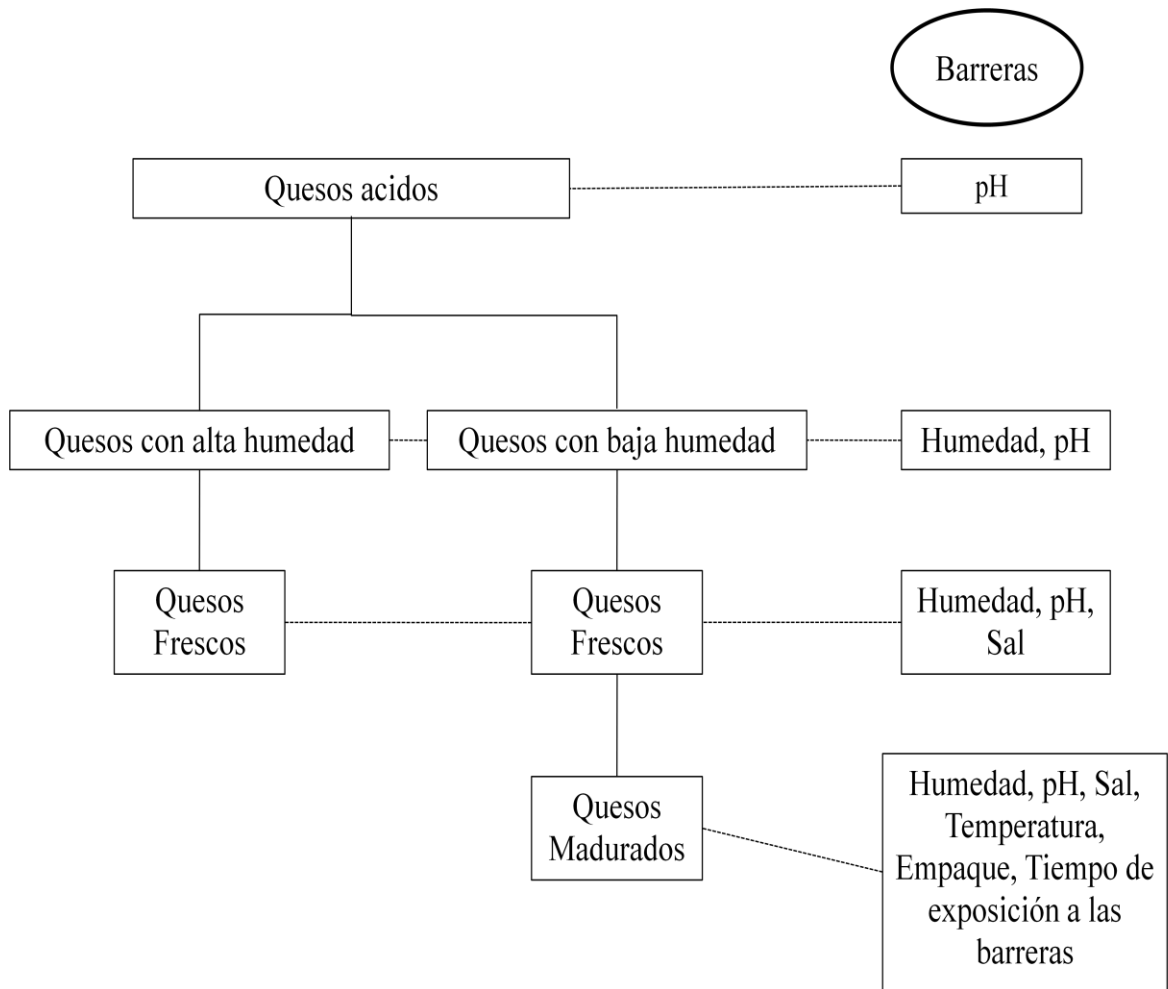
En comparación con los quesos frescos, la mayoría de los quesos madurados son generalmente altos en materia seca (MS) y, por tanto, altos en grasas y proteínas y bajos en lactosa / lactato. Los quesos de cuajada acida madurados tienen en general un sabor y olor muy fuerte, un color ligeramente amarillo y una textura ligeramente quebradiza (Schulz-Collins y Senge, 2004). Los quesos madurados se pueden dividir en dos tipos, madurados por hongos y quesos amarillos. Una de las especies importantes para la maduración de los quesos amarillos es la bacteria de crecimiento superficial *Brevibacterium*, que imparte un color rojizo-anaranjado. Esta imparte olores penetrantes y sabores distintivos. *Brevibacterium* también se encuentra en la piel humana, y las estructuras adyacentes a la piel y es parcialmente responsable por el mal olor corporal. Las cepas asignadas a *Brevibacterium* no se han asociado con infecciones en seres humanos (Denis, 2008). Esta especie puede crecer de forma espontánea en las superficies de queso ácido Harzer (Alemania) o quesos artesanales, al igual que queso poro en México.

Durante la maduración, se producen cambios en la matriz a través de la influencia de la pérdida de agua y la proteólisis. La proteólisis comienza con la coagulación de la leche en la cuba, lo que es una proteólisis primaria, es decir, la hidrólisis interna de las moléculas de caseína, por las enzimas coagulantes y las enzimas nativas de la leche, tales como plasmina. La proteólisis secundaria ocurre durante la maduración, por la acción de peptidasas de microorganismos. La proteólisis debilita la estructura de la matriz de caseína (Beuviel y Buchin, 2004).

Dentro de los quesos madurados, los quesos madurados en salmuera son la familia más importante de quesos para los países del Este y el Mediterráneo y los países vecinos (Alichanidis y Polychroniadou, 2008). Los quesos blancos en salmuera, son las variedades más populares de quesos fabricados en el área Noreste del mar mediterráneo y los Balcanes. Se fabrican a partir de ovinos, búfalos, ganado bovino y / o caprino de leche o de mezclas de estas leches. Los quesos más conocidos son el Queso feta (en Grecia), Domiati (en Egipto), Beyaz peynir (en Turquía) y Halloumi (en Chipre), mientras que otras variedades, menos conocidas se incluyen Batzos de Grecia y de Bulgaria Brinza (Alichanidis y Polychroniadou, 2008). Otros quesos madurados importante son el queso poro, que es un queso elaborado con leche bronca con un bajo pH, la humedad baja y alto contenido de sal (Villegas, 1993). En general, se almacena y se distribuye a temperatura ambiente.

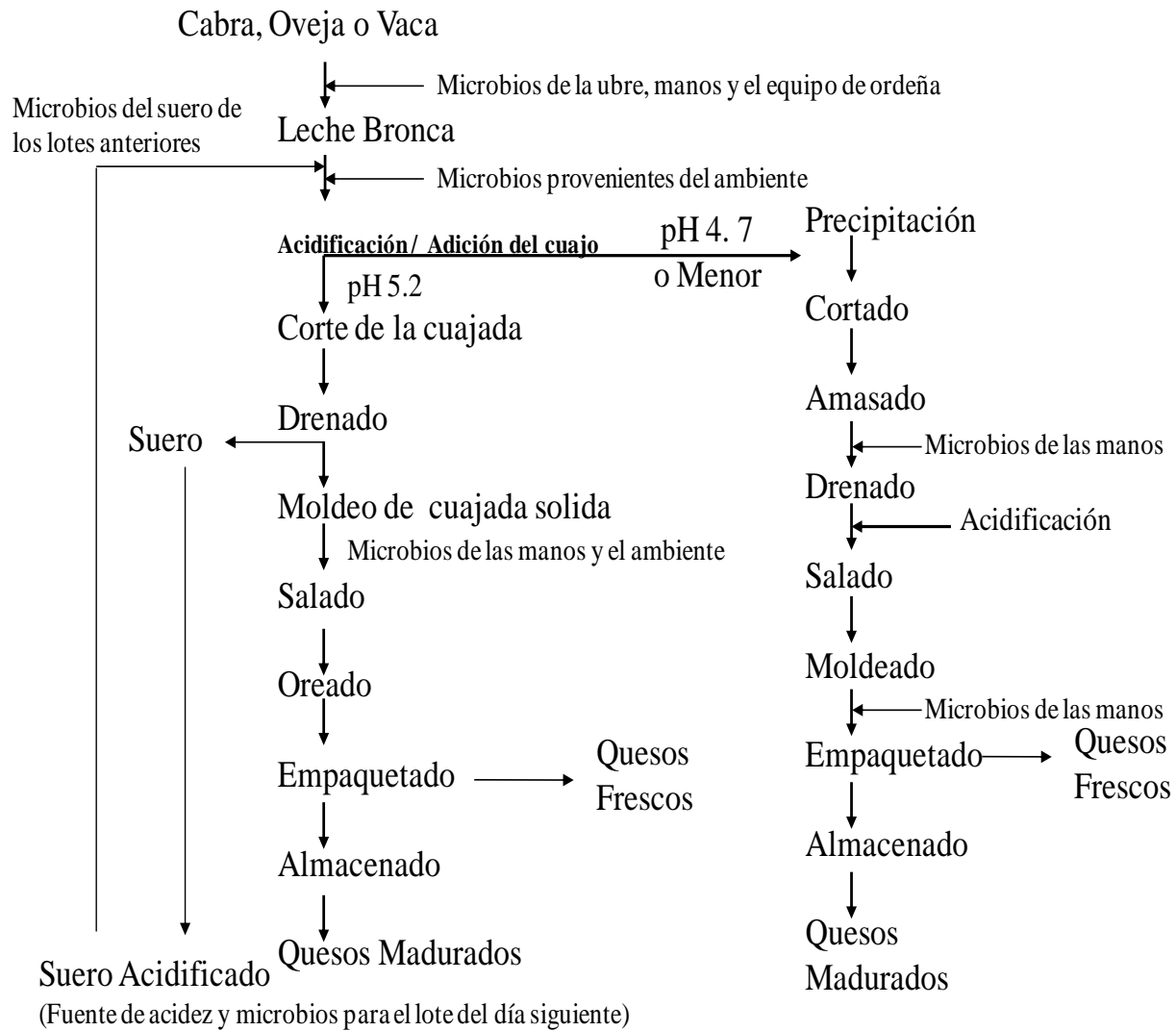


**Fig. 1.** Clasificación de los quesos ácidos de acuerdo a Schulz-Collins y Senge (2004), con modificaciones. Los quesos madurados se dividen en: quesos en salmuera y quesos secados por salado. Los quesos en salmuera a su vez se subdividen en: quesos blancos en salmuera y quesos varios en salmuera.



**Fig. 2.** Esquema simplificado de clasificación de los quesos ácidos elaborados con leche bronca por obstáculos antimicrobianos.





**Fig. 3.** Esquema para la fabricación tradicional de queso de cuajada acida a partir de leche bronca.

### 3.1.4 Producción

Un procedimiento general de fabricación de queso de cuajada acida a partir de leche bronca se muestra en la figura 3. La acidificación de la cuajada debe realizarse durante las primeras etapas de la fabricación de queso (cuajada, desuerado). Para la mayor parte del queso blanco en salmuera, es esencial que aproximadamente 24 h después de la coagulación, el pH sea inferior a 5,0, la humedad debe ser <60% y la sal en la humedad de contenido (S / M) debe ser de ~ 2,5% (Maupoulos y Arvanitoyannis, 1999). La producción de ácido láctico durante estas etapas es de vital importancia. Si la acidificación es demasiado lenta o demasiado baja, no se puede suprimir el crecimiento de algunos microorganismos (es decir, los *coliformes*) capaces de producir gas. Este es un defecto asociado sobre todo con los quesos de leche cruda. Por otro lado, la acidificación cuajada alta conduce a un desuerado excesivo, menor rendimiento y quesos secos, duros y granulados sin cohesión, especialmente cuando las leches de cabra o de vaca se utilizan para la fabricación de queso. Los quesos deben ser transferidos a la cámara fría (4-5°C) sólo cuando su pH alcanza un valor de ~ 4,6 o inferior, nivel de humedad es de ~ 55% de humedad y / sólido superior al 50% (Maupoulos y Arvanitoyannis, 1999).

### 3.2 Los microbios y las fuentes de microbios en quesos de leche cruda (bronca)

La leche es un medio excelente para el crecimiento de microorganismos, por su alto contenido de proteínas, grasas, lactosa, vitaminas y minerales; así como por su alta humedad, y pH neutro. La leche se expone a los microorganismos durante la recogida, almacenamiento, transporte y procesamiento. Los microorganismos son importantes en quesos de leche cruda por tres razones principales:

- Las bacterias ácido lácticas y otros microorganismos pueden contribuir en la conservación de la leche y en la producción de sabor deseable y las características físicas (ICMSF, 2006). Para los quesos de leche cruda hay una necesidad de conocimiento de la biodiversidad natural de los microorganismos, su papel, y sus interacciones (Beuvier y Buchin, 2004).

- Los agentes patógenos o sus toxinas pueden constituir riesgos para la salud.
- Deterioro de los microorganismos o sus metabolitos que pueden causar deterioro.

### 3.2.1 Los microbios con una función específica

Algunos microbios se usan para producir muchos productos sabrosos y que al mismo tiempo producen compuestos que preservan la leche y productos lácteos (FDA, 2001). Los microbios del queso de leche bronca, que son generalmente considerados seguros son las bacterias ácido lácticas; algunas especies de levaduras y hongos también son seguros y están relacionados con la producción de sabor. Para algunos quesos, otras bacterias importantes son las bacterias del ácido propiónico y *Brevibacteria* (Wouters *et al*, 2002).

#### 3.2.1.1 Las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman un grupo natural de las bacterias Gram-positivas, no móviles, que no forman esporas, y con forma de bastones o cocos. Fermentan carbohidratos y alcoholes superiores en ácido láctico, principalmente. Son oxidasa negativa y catalasa negativa (Stiles y Holzappel, 1997; Ananou *et al*, 2007). Géneros importantes para los productos lácteos son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* (Walstra *et al*, 1999). Las BAL pueden soportar un pH bajo, porque cuando se cultivan en un medio acidificado, mantienen el pH del citoplasma más alto que el del medio de cultivo (Kashket, 1987). Su pH interno superior se mantiene bombeando protones (iones H<sup>+</sup>) al exterior a través de ATPasas (Walstra *et al*, 1999). Las BAL están presentes naturalmente en la leche cruda y productos lácteos crudos. En la fabricación de queso tradicional, se transfieren de un lote previo a un nuevo lote mediante la adición de suero de leche. La selección de la flora beneficiosa de la leche, como los lactobacilos, estreptococos y lactococos ocurren naturalmente en los lotes buenos y en muchos casos disminuye el número de patógenos bacterianos (Donnelly, 2004). En la optimización del proceso de fabricación, la adición directa de BAL seleccionadas como cultivos iniciadores en la leche pasteurizada es una práctica común (Donnelly, 2004).

Como inconveniente, las características sensoriales de los quesos originales se pierden parcialmente, debido a que algunos microorganismos importantes en la formación del sabor de los quesos artesanales no se agregan como cultivos iniciadores. Al comienzo de la maduración, los recuentos iniciales de las BAL son altos, generalmente  $10^8$ - $10^9$  UFC / g, y disminuyen regularmente en dos o más unidades logarítmicas durante la maduración, mientras que microorganismos adventicios, que están inicialmente a un nivel  $< 10^3$ - $10^4$  UFC / g, crecen durante la maduración (Beuvier y Buchin, 2004). La microbiota láctica inicial es responsable del

desarrollo de ácido durante la fabricación de queso. La mayoría de las cepas importantes en la acidificación pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Las principales especies utilizadas como cultivos iniciadores de queso feta son *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *L. delbrueckii*. Las principales BAL aisladas de queso Jben que se reportan en la literatura son *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *Lactococcus lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. pseudomesenteroides*, *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. saccharominimus* y *Streptococcus* sp. (Ouadghiri, 2005). En un queso típico de Tabasco, las principales bacterias acidificantes encontrados son *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus pentosus* (Ramos *et al*, 2009). De acuerdo con Hayaloglu *et al* (2002), las especies de BAL registradas en queso blanco turco son, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, especie predominante en el comienzo de la maduración, *E. faecalis* y *E. faecium* (enterococos), segundo grupo más numeroso. *Lactococci* disminuye durante la maduración, mientras que las especies de *Lactobacillus* aumenta, con *Lb. casei* y *L. plantarum* la especie predominante.

### 3.2.1.2 Levaduras

Las levaduras son organismos eucariotas, ubicados en el reino de los hongos, las cuales juegan un papel esencial en la preparación de determinados productos lácteos fermentados como el kéfir, o los quesos de leche cruda derivados de kéfir y en la maduración de muchos quesos. El elevado número de levaduras en algunos productos lácteos acidificados puede atribuirse a su capacidad para tolerar bajos niveles de pH, de actividad de agua y de temperaturas (5° C) así como para asimilar lactosa y ácidos orgánicos (ácido succínico, láctico y cítrico) y tolerar altas concentraciones de sal y productos de limpieza y desinfectantes (Fadda *et al*, 2001). El predominio y crecimiento de algunas especies de levadura se ha relacionado con el proceso de maduración debido a su capacidad para producir proteasas extracelulares y lipasas (Fleet y Mian, 1987). Debido a que la levadura se recupera al final de la etapa de maduración, se considera que juegan un papel secundario en el desarrollo del aroma en el queso jben, producto de bajo pH y alto contenido de humedad, en Marruecos (Benkerroum y Tamine, 2004).

Niveles de levadura de entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC / g pueden causar deterioro en yogur (Fleet y Mian, 1987); en contraste, estos niveles en queso Jben no afectan la inocuidad del producto (Benkerroum y Tamine, 2004). Por su parte, las autoridades de salud consideran que las

levaduras que generalmente se encuentran en los alimentos son de poca importancia clínica (Fleet y Mian, 1987). En contraste, se ha reportado que las levaduras de deterioro puede tener un efecto en el control de patógenos como *L. monocytogenes* en el queso de cuajada ácida tipo industrial al metabolizar las proteínas de la leche, elevar el pH y, potencialmente, asimilar los ácidos orgánicos del producto (Rogga *et al*, 2005).

Entre las especies de levadura más frecuentemente aisladas de la superficie de los quesos se encuentran *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida diffluens* y *Rhodotorula glutinis* (Fadda *et al*, 2001). Por ejemplo, en salmuera de queso feta griego, entre las levaduras reportadas como dominantes se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Torula sporadelbrueckii* y *Pichia membranaefaciens*.

Entre las fuentes de inóculo de las levaduras, al igual que el de las bacterias, se encuentran: las salmueras de la leche, otros quesos, el aire de las cámaras de maduración, los estantes de maduración, y la piel de las personas (Bockelman *et al*, 2006). Un gran número de levaduras se registra con frecuencia en el aire del entorno de procesamiento y en los equipos de procesamiento tales como tablas para la salazón en seco de los bloques de queso (Viljoen, 2001), las cuales se consideran un nicho ecológico para algunas especies, como *Dek. Anomala* (Viljoen, 2001).

### **3.2.2 Los patógenos microbianos**

De acuerdo con la Food and Drug Administration (ICMSF, 2006) y la directiva CEE 92/46 (Beuvier y Buchin, 2004), los patógenos principales que son motivo de preocupación en la industria de la leche y productos lácteos procesados son: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. Varios de los patógenos entéricos comunes, tales como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Campylobacter* son habitantes del tracto intestinal de los rumiantes, y animales domésticos como vacas, ovejas y cabras (Baylis, 2009). Los procedimientos eficaces de limpieza, incluyendo la eliminación de materia fecal de las ubres antes del ordeño y las buenas prácticas de fabricación durante el proceso de elaboración del queso puede reducir el riesgo de contaminación con estos patógenos (Baylis, 2009).

### **3.2.2.1 L. monocytogenes**

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, oxidasa negativa, catalasa positiva, que no presenta colonias pigmentadas (Jay, 2000). Esta bacteria es el agente causal de la listeriosis humana, enfermedad de transmisión alimentaria atípica y uno de los patógenos más peligrosos para la industria alimentaria (Baylis, 2009; Allerberger, 2007).

#### **3.2.2.1.1 Hábitat**

El hábitat de *L. monocytogenes* es muy extenso en la naturaleza. Se encuentra en el suelo, el polvo, los productos alimenticios, tanto de origen animal como vegetal, y el agua. Debido a que la bacteria puede estar presente en el tracto intestinal de personas y animales puede ser transportada en las heces fecales por cualquiera de ellos, incluyendo animales o personas asintomáticos (Allerberger, 2007). Las especies de *Listeria* comúnmente ganan acceso a la leche o a la ubre de las vacas durante el ordeño por contaminación fecal o bien ingresan al sistema digestivo de los animales cuando estos consumen hierba, pienso o ensilaje contaminado. (Bell y Kyriakides, 2002). Una vez que *L. monocytogenes* es introducida en el equipo de ordeño o a las plantas de lácteos, contamina y posteriormente coloniza desagües de piso, transportadores, pisos y equipos de acero inoxidable (Bell y Kyriakides, 2002) los cuales finalmente llegan a contaminar las soluciones de salmuera utilizadas para la producción de queso (Larson *et al*, 1999).

#### **3.2.2.1.2 Adaptación de Listeria al medio ambiente**

*L. monocytogenes* es una bacteria psicrotrófa, tolerante a la sal y que puede crecer bajo condiciones de pH de 4.5 a 9.6 y con valores de  $A_w$  de 0,92. Algunas cepas o serotipos pueden mostrar aumento de respuestas de adaptación a condiciones adversas presentes en los alimentos. Por lo tanto, el control de la contaminación y el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la producción, la maduración y el almacenamiento de queso es un problema de seguridad e importante aspecto de preocupación para los productores y consumidores de este producto lácteo (Rogga *et al*, 2005).

#### **3.2.2.1.3 Incidencia en el queso**

La presencia de *Listeria* en quesos ácidos de leche bronca es variable. A la fecha no se ha reportado para el queso feta (Sarantinopoulos, 2002) pero si en quesos europeos mancha roja. Al

respecto, un análisis realizado por Rudolf y Scherer (2001) mostró que el 6,4% de las muestras de este tipo de queso estaba contaminado con *L. monocytogenes*. Por otra parte un estudio realizado sobre la incidencia de patógenos en productos lácteos comerciales marroquíes mostró que *L. monocytogenes* se encuentra con mayor frecuencia en productos lácteos frescos con alta humedad y pH bajo, y en menor frecuencia en queso madurado (El Marrakchi *et al*, 1993). Aparentemente los quesos madurados presentan condiciones adversas para la supervivencia y/o crecimiento de *L. monocytogenes*. Brotes de listeriosis fatales se han registrado asociados al consumo de quesos blandos (Rogga *et al*, 2005).

### **3.2.2.2 Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram-positivo, oxidasa negativo y catalasa positivo. Forma racimos que muestran colonias pigmentadas cuando se cultiva en agar nutritivo. Forma a menudo grupos que parecen racimos de uvas (Jay, 2000). La intoxicación por estafilococos (envenenamiento de la comida por estafilococos) es resultado de la ingestión de enterotoxinas que se sintetizan durante el crecimiento de *S. aureus* en los alimentos. La producción de enterotoxina es más común entre los aislados de *S. aureus* de origen humano y hay una fuerte correlación con la producción de la enzima coagulasa (Sutherland y Varnam, 2002).

#### **3.2.2.2.1 Hábitat**

Los estafilococos son de origen predominantemente animal, aunque el aislamiento de algunas especies se puede hacer a partir de fuentes ambientales. Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de colonizar el equipo y el entorno de la fábrica. Las rutinas de limpieza deberán tener en cuenta esta posibilidad (Peles *et al*, 2007). Pueden estar presentes como parte de la microbiota normal de los seres humanos y otros animales. *S. aureus* puede ser transportado en las cavidades de la piel y nasal de 30% de la población humana sana (Sutherland y Varnam, 2002). *S. aureus* se encuentra con frecuencia en la leche en niveles bajos. A menudo se produce en la ubre de una vaca con mastitis o la mastitis subclínica. *S. aureus* puede entrar en contacto con la leche, ya sea por la eliminación directa de ubres con mastitis clínica o subclínica, por estafilococo o por la contaminación del medio ambiente durante el manejo y procesamiento de la leche cruda (Peles *et al*, 2007). Cuando la ubre se infecta, *S. aureus* se excreta en la leche con grandes fluctuaciones que van desde cero a  $10^8$  UFC / ml (Sutherland y Varnam, 2002).

#### 3.2.2.2.2 Incidencia en el queso

*S. aureus* se ha llegado a aislar en un queso blanco turco, "Beyaz Peynir" durante el proceso de maduración. Se trata de una variedad de queso en salmuera con una textura suave o semi-dura y sabor salado y ácido (Ramos *et al*, 2009; Peles *et al*, 2007). En Lben (pH bajo y alta humedad), *S. aureus* coagulasa positiva se detectó en números por encima de  $10^3$  UFC / ml, pero menor de  $10^6$  UFC / g de queso o ml de suero (Benkerroum y Tamine, 2004). Poblaciones elevadas de *S. aureus* se asocian generalmente con la presencia de la toxina

Las tinas de queso con baja acidez durante mucho tiempo podría ser un riesgo, ya que *S. aureus* puede crecer a un nivel lo suficientemente alto como para producir las enterotoxinas (FDA, 2001). Cuando las BAL se utilizan como iniciadores para hacer queso, se reduce la posibilidad de crecimiento y producción de *S. aureus* y sus toxinas (Lindvistq, 2002). Sin embargo, un pequeño número de brotes causados por *S. aureus* se han atribuido al uso de cultivos iniciadores contaminados. La producción rápida de ácido por cultivos iniciadores activos podría prevenir *S. aureus* a crecer a los altos números necesarios para la producción de enterotoxina (ICMSF, 2006).

En un estudio exploratorio, la leche de cabra se inoculó con una cepa de *Staphylococcus* enterotoxigénico a una concentración final de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC / ml. Posteriormente se fabrico un queso de leche cruda de cabra (pH bajo, 37-50% de MS). El recuento de estafilococos inoculadas en leche de cabra se redujo significativamente después del período de drenaje e incluso desapareció de algunos quesos al final de la fase de maduración (Vernozy-Rozand *et al*, 2005).

#### 3.2.2.3 Salmonella

Salmonella es una bacteria Gram negativa, oxidasa negativa, catalasa negativa, en forma de bacilo, que no forma esporas ni produce colonias pigmentadas (Jay, 2000). Estudios realizados durante los últimos 100 años muestran que *Salmonella* es un agente causal de numerosos brotes de enfermedades y uno de los patógenos más frecuentemente encontrados en la industria alimentaria. Algunos productos lácteos se han asociado con brotes de salmonelosis por el consumo de alimentos contaminados. De los más de 2300 serovares de *Salmonella* reportados potencialmente patógenos al hombre, 200 se han asociado con enfermedades humanas. Las



pobres condiciones higiénicas presentes durante la crianza y reproducción del ganado ha favorecido la contaminación de los alimentos por *Salmonella*.

#### **3.2.2.3.1 Hábitat**

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto intestinal de mamíferos (como el hombre y animales domésticos y silvestres), reptiles, aves e insectos. Cuando algunos de los serovares de *Salmonella* se encuentra en los alimentos en número significativo pueden ser enterotoxicogénicos (Jay, 2000). La leche cruda puede ser una fuente importante de contaminación por *Salmonella* (Kasrazadeh y Genigeorgis, 1994; Walstra *et al*, 2006; ICMSF, 2006), la cual una vez que ha ingresado al organismo puede ser causa de importantes enfermedades. El mecanismo de infección por esta bacteria inicia con el ingreso y multiplicación en el intestino delgado, seguido de colonización y finalizando con la invasión de los tejidos intestinales, produciendo enterotoxinas y provocando reacción inflamatoria y diarrea.

#### **3.2.2.3.2 Incidencia en el queso**

Aunque el análisis de los quesos de fabricación comercial rara vez resulta en el aislamiento de *Salmonella*, se tienen reportes que esta bacteria tiene capacidad de crecer y sobrevivir durante el proceso de fabricación de diversos quesos por más de 60 días (ICMSF, 2006). Benkerroum y Tamine (2004) reportaron la presencia de *Salmonella* spp. En el 10% de los quesos tipo Jben tradicional los cuales se caracterizan por tener un pH bajo y contenido de humedad intermedia.

#### **3.2.2.4 *Escherichia coli* O157: H7**

*E. coli* O157: H7 es una bacteria enterotoxigénica, en forma de bacilo, Gram negativa, oxidasa negativa, catalasa negativa que no producen colonias pigmentadas (Jay, 2000). En la mayoría de los brotes asociados con el consumo de alimentos, *E. coli* O157: H7 se ha encontrado involucrada (Blackburn, 2002; Walstra *et al*, 2006; ICMSF, 2006). Los análisis e investigaciones realizadas durante los brotes han indicado que las personas consumieron alimentos contaminados con heces fecales de ganado.

#### **3.2.2.4.1 Hábitat**

Frecuentemente, *E. coli* O157 se ha aislado de heces de ganado bovino y otros animales de granja, pero también de la leche cruda y productos lácteos (ICMSF, 2006). Debido a que *E. coli*

O157 se ha encontrado en las heces de ganado sano, se considera que estos animales son transmisores asintomáticos de la bacteria (Öksüz *et al*, 2004).

#### **3.2.2.4.2 Incidencia en el queso**

Actualmente existe una preocupación cada vez mayor sobre los informes que reportan la presencia de *E. coli* O157: H7 en la leche sin pasteurizar (Vernozy-Rozand *et al*, 2005). Lo anterior se basa en el conocimiento que se tiene de que esta bacteria se muestra relativamente tolerante a los ácidos (ICMSF, 2006); es decir, en ambientes ácidos desarrolla una respuesta de tolerancia o adaptación (ATR, por sus siglas en inglés) convirtiéndose en ácido-tolerante a pH bajos, condición que mantiene incluso durante exposiciones posteriores (Vernozy-Rozand *et al*, 2005). *E. coli* O157: H7 es altamente contagioso incluso a dosis bajas; se cree que 10 células de esta bacteria pueden ser suficientes para causar enfermedad en una persona.

### **3.3 Factores que limitan el crecimiento de patógenos**

La supervivencia y el crecimiento de patógenos en el queso dependen de muchos factores, incluyendo variaciones en el pH, Aw, sales, la presencia de la microbiota que compite, la temperatura y los cambios bioquímicos durante la maduración. La calidad microbiológica de la leche y las buenas prácticas de fabricación también contribuyen a la seguridad del producto final, especialmente en los quesos donde la leche no es pasteurizada (FDA, 2001). Cada factor limitante se describe en las siguientes líneas.

#### **3.3.1 pH**

La mayoría de las bacterias crecen de manera óptima a un pH cercano a la neutralidad (Jay, 2000). Los quesos de cuajada ácida podría tener una mayor vida de almacenamiento y calidad microbiológica que los quesos de pH neutro. Un pH bajo disminuye la tasa de crecimiento de la mayoría de los patógenos microbianos y por consiguiente el deterioro microbiano del producto. Entre las bacterias patógenas que resultan afectadas en su tasa de crecimiento por el efecto de pH bajo están las especies del género *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y las cepas patógenas de *Escherichia coli* tales como la entomorrágica (ECEH), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* O157: H7 (Kasrazadeh y Genigeorgis, 1994).

El crecimiento de *L. monocytogenes* se ha registrado a valores de pH que oscilan desde 4,0 hasta 9,6. La fase y tiempo de generación aumentan considerablemente cuando el pH disminuye por debajo de 5,5. *L. monocytogenes* puede tolerar valores de pH de hasta 4,1 en función de otros factores tales como contenido de humedad, temperatura de almacenamiento, y la presencia de cultivos iniciadores (Blackburn, 2002 Cole *et al*, 1990; Domínguez *et al*, 1987; Jay 2000). En contraste *E. coli* O157: H7 ha mostrado ser más resistente a los ácidos, siendo capaz de soportar valores de pH tan bajos como 3,0. Lo anterior indica que existe un riesgo potencial de que algunas cepas VTEC (productoras de verotoxinas), y especialmente cepas de *E. coli* O157: H7, podría sobrevivir al bajo pH asociado con el proceso de fabricación de queso (Baylis, 2009).

### **3.3.2 pH y la temperatura**

La ausencia de crecimiento y disminución de la viabilidad celular se puede observar cuando *L. monocytogenes* se encuentra a un  $\text{pH} \leq 5,5$ , cuando otras condiciones ambientales no son óptimas para la supervivencia (Lado y Yousef, 2007). Mediante el uso de un modelo de simulación (USDA Programa de Modelación de Patógenos), se pudo averiguar cuál sería la reducción en crecimiento de *L. monocytogenes* expuesto a un pH de 4,7 y a diferentes temperaturas (Figura 4). En este caso las condiciones adicionales en el modelo fueron: cloruro de sodio 2,0%, 0,989 Aw, y ácido láctico 1,5%. Cuanto mayor sea la temperatura, más rápido será el tiempo de reducción.

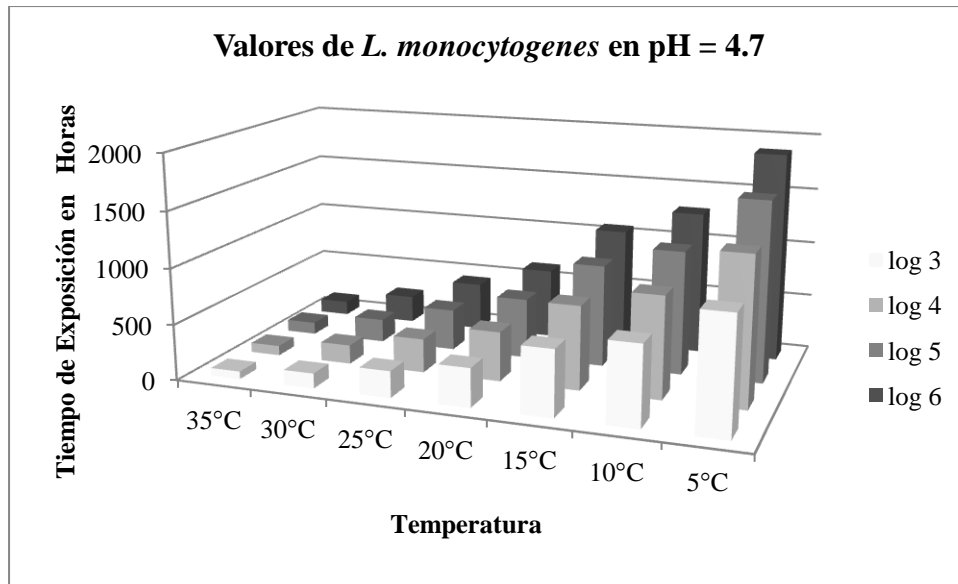


Fig. 4 Tiempo de exposición necesario para disminuir las poblaciones de *L. monocytogenes* tres unidades logarítmicas (es decir, 3 valores D) a diferentes temperaturas de almacenamiento, según lo determinado por el Programa de Modelación de Patógenos del USDA, Estados Unidos (USDA, el Programa de Modelar Patógenos [versión 7.0]). <http://ars.usda.gov>

Mediante el uso del Programa de Modelación de Patógenos del USDA, también fue posible simular lo que sería la reducción en crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., y *E. coli* mediante la variación de pH y temperatura. Las altas temperaturas se relacionan con un tiempo de rápida reducción de los valores de pH entre 4 y 5,2. El tiempo de reducción aumenta cuando había un pH elevado y baja temperatura (Fig. 5).

Con el fin de confirmar tal información predictiva derivada de un modelo matemático, es necesario llevar a cabo experimentos para examinar la supervivencia de los patógenos durante la fabricación y la maduración de los quesos de leche cruda como se describe por Vernozzy-Rozand *et al* (2009). Una fuente de variación podría ser la temperatura de maduración. Esta información podría ayudar a saber si las temperaturas reales para la maduración de algunas especialidades regionales como queso poro en México son las mejores para la seguridad microbiana. El queso poro se suele madurar y almacenar a temperatura ambiente.

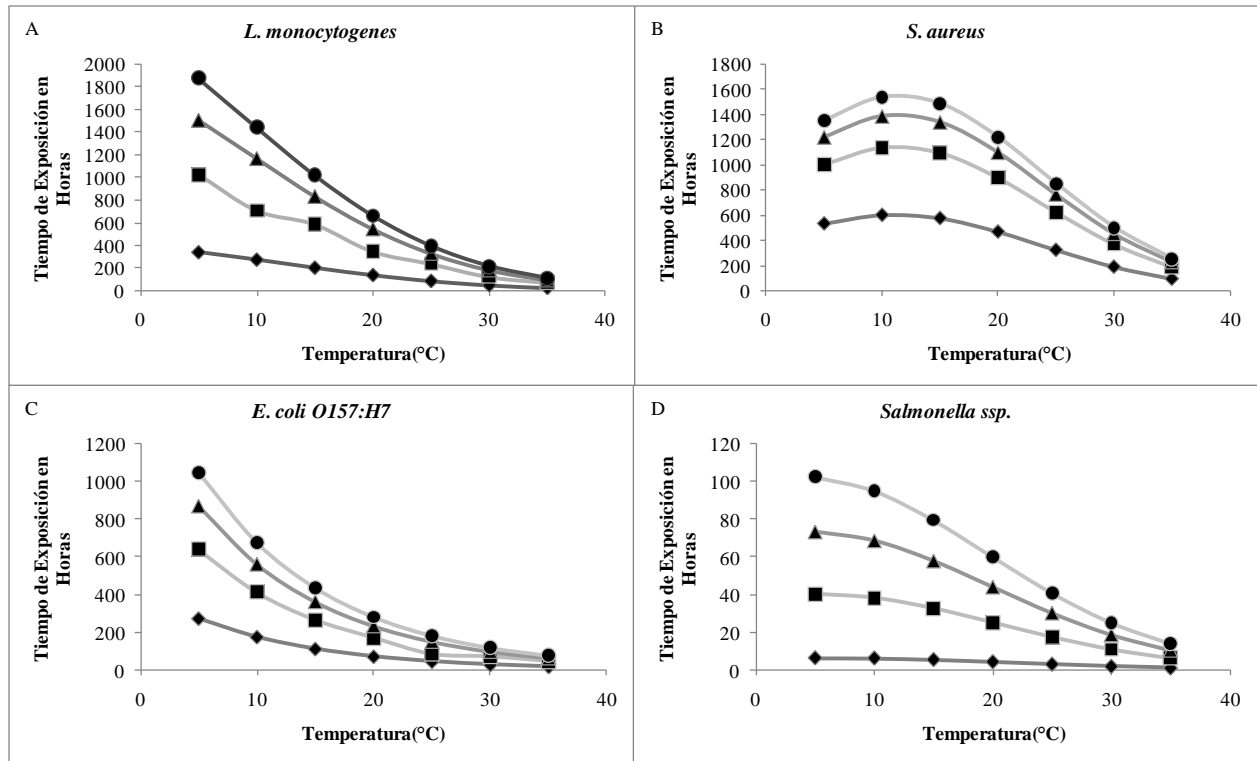


Fig. 5 El tiempo de exposición necesario para disminuir las poblaciones de: A) *L. monocytogenes*, B) *S. aureus*, C), *E. coli* O157: H7, D), *Salmonella* spp, en tres unidades logarítmicas (es decir, 3 D-valores) a diferentes temperaturas de almacenamiento y diferentes concentraciones de pH. Los valores se obtuvieron con el Programa de Modelación de patógenos del USDA y se calcularon a partir de los datos de crecimiento microbiano reportados en UFC/ml (A partir de [USDA, 2010] Programa de Modelación de Patógenos [47] Programa de Modelar Patógenos [versión 7.0]. [Http://ars.usda.gov](http://ars.usda.gov). Símbolos  $\blacklozenge$  pH 4.0,  $\blacksquare$  pH 4.7,  $\blacktriangle$  pH 5.0,  $\bullet$  pH 5.2)

Existen reportes de adaptación a la acidez para las especies de *Salmonella* (Leyer y Johnson, 1992), *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*. Las células de *Salmonella* expuestas por dos generaciones a pH de 5.8 presentaron una mayor resistencia a la inactivación por ácidos orgánicos que aquellas células sin exposición previa. Entre los ácidos orgánicos que resistieron estas bacterias adaptadas y que se encuentran comúnmente presentes en el queso, se incluyen los ácidos láctico, propiónico, y acético. Los mecanismos de adaptación podrían aumentar cuando el tiempo de fermentación de la leche es prolongado (Leyer y Johnson, 1992).

Estas observaciones apoyan la teoría de que la adaptación a las condiciones ácidas es un mecanismo que permite a *Salmonella* spp., persistir en los productos lácteos fermentados.

### **3.3.3 La alcalinización del queso**

Algunas variedades de queso puede contener una microbiota no láctica y no acidificante, como las especies de levaduras y hongos como *Debaryomyces hansenii* o *Kluyveromyces marxianus* que pueden alcalinizar el queso permitiendo el crecimiento de *Brevibacterium* en número tan alto como la biota láctica. El crecimiento de algunos patógenos como *Listeria* pueden ocurrir en las superficies de los quesos (Millet *et al*, 2006).

### **3.3.4 Otras barreras**

En los quesos ácidos, los factores intrínsecos como  $A_w$  y el contenido de sal generan condiciones adversas para el crecimiento microbiano, que varían dependiendo del tipo de queso y la tecnología utilizada en su fabricación (Beuvier y Buchin, 2004). En general *S. aureus* y *L. monocytogenes* son resistentes a un alto contenido de sal (hasta 6%) y pH bajo de 4,1, en algunos casos (Blackburn, 2002; Cole *et al*, 1990; Domínguez *et al*, 1987).

### **3.3.5 Adaptación al estrés**

La adaptación de los microorganismos a un determinado ambiente se produce cuando las células de dicho microorganismos se exponen a condiciones desfavorables o de estrés (condiciones subletales) y algunas de ellas expresan su resistencia a dicha condición. De tal manera que las nuevas poblaciones que se generan a partir de dichas células se muestran resistentes cuando se exponen posteriormente a la misma condición desfavorable o a condiciones de estrés superior o de mayor intensidad. Las condiciones desfavorables para un microorganismo pueden estar relacionadas con la temperatura, el contenido de sal, la humedad y la  $A_w$  (Cebrián *et al*, 2006; Hill *et al*, 2002). Se ha informado que varios patógenos tales como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 y *S. aureus* presentan mayor resistencia a condiciones muy ácidas tras una previa exposición a una condición medianamente ácida. Las bacterias adaptadas a las condiciones ácidas también pueden mostrar mayor resistencia, o protección cruzada, a otros ambientes desfavorables.

## **3.4 Brotes de enfermedades por patógenos en queso**

Existe poca información publicada sobre brotes de enfermedades humanas relacionados con el consumo de quesos ácidos fabricados con leche bronca. Sin embargo, varios informes de brotes de enfermedades ligados con alimentos indican que fueron resultado de la ingestión de

quesos preparados a base de leche bronca. Cabe señalar que los quesos son susceptibles a la contaminación durante el proceso de maduración. Por ejemplo, la contaminación por *L. monocytogenes* durante la maduración de los quesos Camembert, Brie, azul y Feta, se ha asociado con el aumento del pH (ICMSF, 2006). Se carece de información referente a posibles brotes de salmonelosis relacionados con el consumo de quesos ácidos. Sin embargo, los quesos suaves acidificados como Cheddar, mozzarella, Irlanda se han relacionado con varios brotes de *Salmonella* spp. Registrados en Canadá, Europa y EE.UU (Kasrazadeh y Genigeorgis, 1994; D'Aoust, 1994).

### **3.5 Las estrategias utilizadas para mejorar el nivel de inocuidad microbiológica de los quesos de leche bronca**

Las prácticas de higiene relacionadas con la limpieza de ordeño, la ubre y los pezones y saneamiento puede ayudar a reducir la contaminación de la leche con patógenos como *Listeria* spp., Igualmente importante es el régimen de limpieza y desinfección aplicado al ordeño y el equipo de almacenamiento (Bell y Kyriakides, 2002). La acidificación rápida en las primeras etapas del proceso de fabricación de quesos de leche cruda es un factor clave para controlar efectivamente el desarrollo de *L. monocytogenes* y otros patógenos con la contaminación en la base de bajo de leche cruda (Millet *et al*, 2006). Una rápida acidificación puede ser llevada a cabo mediante la adición de cultivos iniciadores activos o suero acidificado, o por adición de ácido. Es necesario incorporar el sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) y la evaluación del riesgo microbiano (ARM) los planes para la prevención de la contaminación de los quesos de leche cruda.

Los quesos ácidos de leche bronca son producidos por muchas pequeñas empresas en varios países alrededor del mundo. El proceso de fabricación de quesos de leche bronca mediante la acidificación es similar en muchos aspectos. Los riesgos de microbios pueden evitarse mediante la inclusión de la higiene en el proceso de ordeño y por la rápida acidificación de la leche y la rápida reducción de la humedad e incorporación final de sal también. Muchos microorganismos tales como bacterias ácido-lácticas, levaduras, mohos y otras bacterias patógenas se han adaptado para sobrevivir y crecer en estos entornos. Tienen un papel fundamental en las características bioquímicas y sensoriales de cada tipo de queso. El grupo de bacterias ácido lácticas también pueden tener un papel en inhibir el crecimiento de bacterias

patógenas y el deterioro de los quesos. Muy pocos reportes han demostrado la aparición de patógenos transmitidos por alimentos aislados de quesos de leche de ácido primas, especialmente de quesos de leche de ácido primas frescas. Por otra parte, a nuestro entender, los quesos ácidos de leche bronca no han estado involucrados en brotes de enfermedades humanas. Es factible que los protocolos de procesamiento para la fabricación de quesos ácidos de leche bronca crean un ambiente desfavorable para los microorganismos patógenos que prosperan en un nivel que no representa un riesgo de peligro para el consumidor.



## **4 MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Localización del Área de Estudio**

El municipio de Balancán se localiza en la región Usumacinta, teniendo como cabecera municipal a la ciudad de Balancán de Domínguez que se ubica al norte del estado de Tabasco, México. La ganadería es el sector más importante en la economía local, y se practica de manera extensiva. La actividad industrial más importante en la cabecera municipal es la fabricación de quesos y otros derivados lácteos. También se fabrican dulces, conservas y embutidos. (Enciclopedia de Municipios de México, 2005).

### **4.2 Plan de Muestreo y Análisis en el Queso de Poro**

Los quesos se colectaron en seis diferentes empresas (queserías) ubicadas en la ciudad de Balancán de Domínguez, municipio de Balancán, estado de Tabasco. Y que forman parte del patrón organizado por la asociación de productores de queso poro del municipio.

Se colectaron muestras de aproximadamente 250 g de queso de poro recién elaborado en las diferentes queserías. Las muestras se sometieron a análisis el mismo día de la colecta y posteriormente durante un período de tiempo por determinar para registrar cambios en la población microbiana patógena del queso. Así mismo, se determinó la temperatura, el pH y las características bioquímicas de cada muestra de acuerdo a la NOM-243-SSA1 (2010).

#### **4.2.1 Determinación de la Actividad de Agua ( $A_w$ )**

Se tomaron 3g aproximadamente de muestra de cada tipo de queso, se calibró el equipo (Marca Aqualab model 3), y se realizó el análisis por triplicado. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Nutrición de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la UJAT

#### **4.2.2 Determinación del contenido de sal (NaCl)**

Para las determinaciones de NaCl en el queso, se utilizó del método volumétrico de la AOAC (2004) y la versión del método Volhard para la determinación de cloruros de Haouet *et al* (2006) aproximadamente 3 g de muestra descortezada y bien molida. La muestra se depositó en un matraz con 25 ml de  $KNO_3$  0.1N para favorecer la reacción con los cloruros presentes. Después de hervir la mezcla con 10 ml de  $HNO_3$ , exento de halógenos y 50 ml de agua destilada por 10 min se agregaron 15 ml de solución de permanganato de potasio al 5 %, en fracciones de 3

ml para obtener una solución amarilla transparente. Una vez enfriada y filtrada en un matraz aforado de 250 ml, la solución se lavo minuciosamente en agua destilada a 20°C, se agregaron 25ml  $\text{AgNO}_3$  a 0.05M (o su equivalente) y se valoró el exceso de la solución de  $\text{AgNO}_3$  0.1N en alícuotas de 100 ml con una solución de KCNS 0.1 N. Como indicador se adicionaron 2 ml de solución saturada de sulfato de amonio hierro III hasta obtener un precipitado café oscuro a rojizo.

#### **4.2.3 Determinación de Acidez**

La determinación se realizó de acuerdo al método de Villegas (2004), el cual consistió en añadir agua destilada a 40°C a 10 g de queso finamente molido contenido en un frasco volumétrico para aforar a un volumen de 100 ml. Después de agitar la mezcla vigorosamente y filtrarla, se tomaron 25 ml de filtrado, correspondientes a 2.5 g de muestra, y se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N y 5 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador.

En general la titulación se realizó de la manera siguiente. Se llenó una bureta con una solución de NaOH 0.1 N valorada y se registró la lectura de la cantidad de solución en la bureta. La muestra en solución se depositó en un matraz Erlenmeyer y se le adicionaron 5 gotas (una por una) de fenolftaleína al 1%, para realizar la titulación con agitación lenta. Cuando se dio el vire de la solución a color rosa se suspendió la adición de NaOH y se continuó agitando por 15 s para estabilizar la reacción. En caso contrario, se adicionó una gota extra de NaOH para terminar la titulación. Se tomó la lectura del volumen dispensado en la bureta y se estimó la cantidad NaOH usado para neutralizar la acidez de la muestra. Con estos valores se estimó la acidez de cada muestra.

#### **4.2.4 Determinación del pH**

La determinación del pH del queso se realizó con un potenciómetro con electrodo de vidrio (Marca Hanna, modelo 993100). Previo a la determinación, 3 g de muestra se mezclaron con agua destilada (v.g.1/3 de su peso) para obtener una pasta suave en la cual se insertó el electrodo para tomar la lectura. Cabe señalar que la lectura de pH realizada con una mezcla así tratada es ligeramente más elevada debido al efecto de dilución producido por el agua incorporada.

### **4.3 Diseño experimental**

Se estableció un diseño completamente al azar, con los siguientes factores: marcas de queso, tiempo de almacenamiento (día 0 y día 14) y temperatura de almacenamiento (refrigeración y temperatura ambiente). Las repeticiones se definieron de acuerdo al periodo de tiempo y a la cantidad de muestra. Se analizaron las variables diversidad y densidad de microorganismos por la pruebas de ANOVA, homogeneidad de varianzas, y pruebas adicionales necesarias.

### **4.4 Muestreo**

Las piezas de queso de poro se seleccionaron de acuerdo al peso (muestra de 250g), y se transportaron al Laboratorio de Alimentos del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Una vez en el laboratorio, de cada pieza se tomaron 25g de muestra obtenida de diferentes secciones (centro, corteza) cortadas en piezas pequeñas. Las secciones se homogeneizaron (licuaron) para obtener muestras representativas.

### **4.5 Pre enriquecimiento de muestra**

Con la finalidad de restaurar la condición fisiológica de aquellas células bacterianas que pudieran estar dañadas en los quesos almacenados, las muestras se sometieron a un pre enriquecimiento en Agua Peptonada Buferada (BPW, Fluka 08105). Para esto 25 g de queso se depositaron en matraces Erlenmeyer y se adicionaron 225 ml de PBW (pH 7) y se dejó incubar por 1h a 35<sup>o</sup>-37<sup>o</sup>C sin agitación. De la suspensión así obtenida se tomó un ml para realizar diluciones seriadas (de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup>) en tubos con 9 ml de agua destilada y 0.1 ml para sembrado en placa.

### **4.6 Siembra, inoculación y detección en placa.**

Se utilizó la técnica de vaciado en placas Petri (100 X 15mm) y el método de siembra en la superficie del medio de cultivo. Para esto se agregó un volumen de 0.1 ml de suspensión en BPW como amortiguador y entre 20 y 30ml del medio selectivo para cada microorganismo. El medio y la marca específicos en cada caso se indican abajo.

Detección de *Salmonella*. Para la detección de *Salmonella* se tomó 1 ml de cada una de las diluciones en PBW; Agar para *Salmonella* y *Shigella* (Marca Dibico) como medio selectivo y diferencial y se incubó por 1h a 35<sup>o</sup>C.

Detección de *Listeria monocytogenes*. Para la detección de estas bacterias se tomó 1 ml de cada una de las muestras en PBW y se sembraron en placas con Agar PALCAM 75977 (por sus siglas en inglés, marca Sigma-Aldrich). Después de la siembra las placas se incubaron por 48 h a 30°-37°C. El Agar PALCAM es un medio selectivo para aislamiento e identificación de especies de *Listeria* en alimentos.

Detección de *Escherichia coli*. Para la detección de *E. coli*, se tomó 1 ml de cada una de las muestras en PBW y se sembraron en placas con Agar HiCrome para *E. coli* (Fluka 51489). Después de la siembra las placas se incubaron por 24 – 48h a una temperatura de 35°C. El Agar HiCrome es un medio para la detección y enumeración de *E. coli* en muestras de alimentos.

Detección de *Staphylococcus aureus*. En este caso se utilizó el medio selectivo Agar para Estafilococos no. 110 marca DIBICO. Después de la siembra las placas se incubaron por 24 – 48 hrs a una temperatura 35°C.

Se analizaron los lotes de las muestras en busca de la presencia de 4 microorganismos descritos en la Tabla 1; junto con los medios usados para la detección y la morfología de las colonias detectadas que coincidentes con las descripciones de sus respectivos manuales.

Tabla 1. Microorganismos estudiados, medios selectivos empleados y características de las colonias con las que se realizó la identificación.

MICROORGANISMO	MEDIO	MORFOLOGÍA COLONIAL
<i>Escherichia coli</i>	Hi Crome E.Coli no. 70722 Marca Flucka	Colonias pequeñas circulares de color azul
<i>Salmonella ssp</i>	Agar para Salmonella y Shigella marca DIBICO	Colonias pequeñas incoloras transparentes con o sin centro negro
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar para Estafilococos no. 110 marca DIBICO	Colonias pequeñas circulares de color blanco
<i>Listeria monocytogenes</i>	Agar PALCAM para Listeria monocytogenes no. 75977 marca Sigma Aldrich	Colonias gris-verde con centro negro y halo de precipitación

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Factores intrínsecos en el queso poro

En la tabla 2 se muestra que el pH y el contenido de NaCl no fueron estadísticamente significativos entre las diferentes marcas de queso. Diferencias significativas ocurrieron en  $A_w$  y la acidez. Las diferencias en  $A_w$  pueden ser consecuencia de método de elaboración de los quesos, en la cual los valores más bajos pueden ser consecuencia de un mayor prensado y un mayor desuerado en los quesos de  $A_w$  más bajo.

Una mayor acidez en algunas marcas de queso puede ser consecuencia de un pH más bajo de la materia prima como el suero de inoculo, el cual se ha observado tiene valores de pH de entre 4.0-4.1 y puede estar más acidificado. Haciendo un análisis de la información de Jay (2000) en relación a los parámetros de pH de los quesos poro, destaca que esos valores están debajo o igual al pH mínimo para el crecimiento de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *Staphylococcus aureus*. Aunque generalmente existe variabilidad en el pH mínimo para el crecimiento de esas especies (Lianou y Koutsoumanis, 2011). Pero en general, a esos pH solo algunas levaduras, hongos y bacterias lácticas pueden crecer. En general, entre más bajo sea el pH más extensa será la vida útil que tenga el queso (Pacheco y Bucio, 2010). Los quesos que tienen pH alrededor de 7.0 (6.6–7.5) proveen condiciones optimas para el desarrollo de patógenos, y de biota de descomposición.

En relación con el  $A_w$ , los valores debajo de 0.96 son inhibitorios de la mayoría de bacterias patógenas, excepto *Staphylococcus aureus* que crece a  $A_w$  tan bajos como 0.86 (Jay, 2000). Algunas cepas de *Salmonella* tienen su límite de  $A_w$  mínimo de 0.94 (Lianou y Koutsoumanis, 2011). Para reducir el riesgo de la presencia de esos patógenos, se recomendaría disminuir la  $A_w$  al límite como se observa en el caso de uno de las marcas de los quesos. La cantidad de sal del queso poro se registró en el límite de tolerancia para *Salmonella* que es de 4-5% (Norhana *et al.*, 2010).

Tabla 2. Factores intrínsecos registrados en diferentes tipos de queso poro.

Procedencia	Factores intrínsecos			
	pH	Aw	% NaCl	Acidez
SNM	4.06	0.93a	4.15	0.54c
SJT	4.00	0.96a	4.27	0.73b
USM	4.09	0.96b	3.92	0.87 <sup>a</sup>
TIG	4.02	Nd	4.02	0.85 <sup>a</sup>
BJC	4.03	Nd	3.96	0.67b
BLM	4.03	Nd	3.96	0.74b

Las letras a, b, c, por columna indican diferencias significativas entre los diferentes quesos muestreados. Nd indica no determinación de la Aw para las muestras de algunos quesos. Marcas analizadas: San Marcos (SNM), San Judas Tadeo (SJT), Usumacinta (USM), El Tigre (TIG), Bejucal (BJC), Balam (BLM)

De los parámetros fisicoquímicos (factores intrínsecos) evaluados, solo el pH se redujo durante el almacenamiento del queso, tanto en condiciones de refrigeración como ambientales (Tabla 3). El valor de pH registrado al final del almacenamiento se encontró por debajo del límite de crecimiento de los microorganismos patogénicos, que oscila en un intervalo de 4.1-4.5. Lo anterior puede ser debido a actividades de acidificación de bacterias lácticas o sus enzimas (Lindqvist, *et al* 2002).

Tabla 3. Análisis del efecto de la temperatura en los factores intrínsecos del queso de poro.

Factores	Tiempo		Temperatura
	0 días	14días	
pH	4.03 <sup>a</sup>	3.55b	Refrigeración
		3.53b	Ambiente
Acidez	0.75 <sup>a</sup>	0.67a	Refrigeración
		0.46a	Ambiente

% NaCl	3.92 <sup>a</sup>	3.95a	Refrigeración
		3.68a	Ambiente

Las letras a, b, c, por columna indican diferencias significativas entre los diferentes periodos de tiempo y temperatura.

En la Tabla 4 se muestra que la prevalencia de las bacterias patogénicas analizadas fue común en todos los quesos examinados, salvo por *L. monocytogenes*, que solo se observó en una muestra durante todo el estudio (perteneciente a SJT muestra 3  $1 \times 10^{-1}$ ). No se pudo determinar si dicha colonia de *L. monocytogenes* se encontraba de forma natural en el queso poro o llegó hasta el mismo por medio de contaminación cruzada.

Tabla 4. Prevalencia de bacterias patogénicas en el queso poro según procedencia.

Procedencia	Muestras positivas/Total de muestras			
	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
SNM	4/4	2/4	4/4	0/4
USM	4/4	ND	4/4	0/4
SJT	2/4	4/4	ND	1/4
BJC	2/3	1/3	3/3	0/3
BLM	2/3	2/3	1/3	0/3
TIG	1/3	2/3	2/3	0/3
Prevalencia				
(% totales)	15/ 21(71%)	11/17 (64.7%)	14/17 (82%)	1/21 (4%)

En general los patógenos se mantuvieron en un intervalo de 3.0 a 3.77 Log UFC/g como se muestra en la Tabla 5; en esa tabla se observa que *Salmonella* se redujo a los 7 días, *S. aureus* aumentó ligeramente y *E. coli* se mantuvo sin cambio. *L. monocytogenes* fue presuntamente detectada en una sola muestra, por lo que queda pendiente su identificación y caracterización.



Tabla 5. Población bacteriana promedio registrada en el queso de poro durante el almacenamiento.

Bacteria	Log UFC/g	
	0 días	7 días
<i>Salmonella</i>	3.77	1.85
<i>S. aureus</i>	3.15	3.80
<i>Coliformes</i>	3.03	3.0
<i>L. monocytogenes</i>	1	Ausente

En la tabla 6 se muestra que para las marcas de quesos, las muestras evaluadas a 0 días no presentaron diferencias significativas en su contenido los distintos patógenos evaluados; en el caso de coliformes para la marca Balam tampoco fue encontrado de forma significativa en las muestras. En el caso de *Salmonella* la cuenta tiene un intervalo de 2.90 a 4.64 ciclos logarítmicos, para *S. aureus* con una cuenta de 3-3.30 Log UFC/g y para *coliformes* su cuenta tuvo un intervalo de 4.45-4.61 log UFC/g.

Tabla 6. Valores promedio expresados en Log UFC/g de las poblaciones bacterianas, registrados en el queso de poro de acuerdo a su origen a los 0 días.

Origen	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Coliformes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
TIG	4.64	3.00	4.45	0
BJC	Nd	Nd	4.61	0
BLM	2.90	3.30	0	0

Nd: No datos

En el caso de las muestras evaluadas a los 7 días (Tabla 7) no se encontró diferencias significativas entre los distintos patógenos evaluados y las diferentes marcas de quesos, *Salmonella* tampoco fue encontrada en el Tigre. La cuenta para *Salmonella* osciló entre 0.22 y 5.34; para *S. aureus*, entre 2.62 y 5.71; y, para *Coliformes* entre 4.21 y 4.80 Log UFC/g respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Valores promedio encontrados en el queso de poro (Log UFC/g) a los 7 días.

Origen	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Coliformes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
TIG	0.00	2.62	Nd	0.00
BJC	0.22	5.71	4.21	0.00
BLM	5.34	3.04	4.80	0.00

Nd, No disponible

Tabla 8. Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos.

Microorganismo	Límite máximo	Productos
<b>Organismos Coliformes totales</b>	≤100 UFC/g o mL	Helados y sorbetes. Quesos de suero
	≤50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
	≤20 UFC/g o mL	En punto de venta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.
	≤10 UFC/g o mL	En planta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤10 UFC/ mL por siembra directa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizado.
	≤100 UFC/g o mL	Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados
	1000 UFC/g	Quesos frescos y quesos de suero
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados. Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero. Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados. Mantequillas.
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL	Quesos frescos.
	≤ 3 NMP/g o mL	Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados.
	≤ 10 NMP/g	Quesos madurados y procesados.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados ** Quesos. Quesos de suero. Helados, bases para helados y sorbetes.**.

Al comparar los límites permitidos de patógenos indicados en la Tabla 8 con los valores encontrados en los quesos analizados en este estudio, se observa que los microorganismos se encuentran por arriba de dichos límites. Lo anterior indica que las muestras de queso poro no

cumplen con los parámetros de calidad sanitaria establecidos en la NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. A pesar de que no se tiene reportado brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los quesos ácidos incluyendo el queso poro debido a que no se tienen registros o subregistros de esto. Su consumo representa un riesgo para la salud de los consumidores. Por lo que su consumo representa un riesgo para la salud de los consumidores.

*L. monocytogenes* presenta un caso particular durante dado el hecho que de acuerdo a los procedimientos utilizados en el estudio, solo fue posible detectarla en una sola muestra. Mientras que otros específicamente, en el caso de *S. aureus* los valores detectados y expresados en log (UFC/g) oscilaron en un intervalo de 3.15 a 3.80; para *Salmonella*, de 3.77 a 1.85 y para *coliformes* de 3.03 a 3.0.

Durante el transcurso de las pruebas fue notable que solo se haya detectado presuntamente *L. monocytogenes* en solo una de las muestras analizadas. Esta sola colonia situaría en 1000 ufc/g el número total de *L. monocytogenes* detectados. Es común la presencia de este microorganismo en quesos elaborados en leche bronca en Europa y los EE.UU. (ICMSF, 2006). Sin embargo la presencia de este patógeno en productos lácteos en el país no ha sido confirmada. Se cree que debido a las características propias del queso, contenido alto de sal y pH, junto con un contenido de  $A_w$  bajo al compararlo con otros tipos de quesos, convierte al queso poro en un medio poco favorable para la proliferación de este patógeno en particular. Sin embargo, no se deberá descartar la posibilidad de su presencia en los quesos frescos tipo poro debido a la presencia de otros patógenos indicadores de contaminación. Por lo anterior se sugiere continuar con análisis microbiológicos adicionales o más sensibles a la presencia de *Listeria* por los riesgos potenciales a la salud.

En el caso de *Salmonella*, la distribución de los patógenos de este género es geográficamente mucho más amplia y se ha encontrado de forma frecuente en diversos productos lácteos por lo que su presencia en el queso poro es motivo de preocupación, los parámetros evaluados indican que existe una reducción en su número conforme el paso del periodo de

almacenamiento. La presencia de Salmonella en el queso poro indica una alta capacidad de esta bacteria para adaptarse rápidamente a condiciones adversas o desfavorables. Por lo que es importante conocer los mecanismos de adaptación a dichas condiciones.

La presencia de dichos microorganismos en el queso poro puede deberse a diversas fuentes de contaminación cruzada durante la recolección como vacas enfermas de mastitis, ordeña inadecuada que facilita la contaminación con materia fecal, inadecuado transporte y almacenamiento y malas prácticas de higiene y manufactura durante la fabricación del mismo como limpieza inadecuada del área de trabajo y de los instrumentos. Estas fuentes de contaminación contribuyen a mantener una cierta presencia de patógenos en el queso poro.

Considerando los valores registrados de cada uno de los parámetros intrínsecos: pH, contenido de NaCl, Aw y temperatura de refrigeración analizados en las muestras de queso poro se encuentra que los valores de esos parámetros se hacen más extremos con el almacenamiento del queso, pues se reduce el contenido de agua, aumenta la acidez, se reduce el pH y aumenta la acidez. Estos factores adversos llevan a condiciones fisiológicas de stress para el crecimiento microbiano haciéndoles difícil su multiplicación. Sin embargo estas condiciones no son suficientes para eliminar el problema de los patógenos, pues una higiene adecuada durante el proceso de ordeño, traslado a la planta y durante la elaboración de los quesos ayuda a prevenir los riesgos microbiológicos por parte de patógenos.

## 6 CONCLUSIONES

Se encontró presencia de *Salmonella*, *S. aureus*, coliformes y *L. monocytogenes* en el queso poro analizado por lo que su calidad microbiológica es deficiente con respecto a la NOM-243-SSA1-2010.

Las características fisicoquímicas del queso poro son limitantes para el crecimiento microbiano siendo los valores de pH de 4.1-4.5, concentración de NaCl de 3.96 a 4.27%, Aw de 0.93 a 0.96 y de acidez de 0.54 a 0.87.

Durante el almacenamiento el pH fue el único factor fisicoquímico en el que se observó una disminución significativa. Esta disminución genera un medio hostil para los patógenos que hay en el queso poro. Como fue el caso de *Salmonella* del cual se observó una disminución en su número.

## 7 RECOMENDACIONES

Se debe hacer un diagnóstico de las Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad (NOM 120) durante el proceso de manufactura del queso poro.

Se recomienda implementación de Buenas Prácticas de Manejo e Higiene durante la producción y manejo de este queso para reducir el riesgo de intoxicaciones y contaminaciones microbianas y como un primer paso a la implementación de un sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control.

Se recomienda la confirmación y caracterización bioquímica y molecular de las cepas de *Salmonella spp.*, y de la cepa presuntiva de *Listeria monocytogenes* encontradas y aisladas en las muestras de este estudio, para disponer de un registro “microbiológico” sobre cepas y variedades de patógenos presentes en el queso poro y en la región.

Se recomienda que se proceda con dicha confirmación mediante el empleo de la técnica de Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR) para obtener una confirmación mediante el empleo del ADN.

Se recomienda hacer estudios más detallados sobre los cambios fisicoquímicos que ocurren en el queso poro durante su almacenamiento, por un periodo de hasta 60 días de acuerdo a los parámetros dictados por la FDA puesto que se afecta la persistencia de patógenos en el mismo.

## 8 LITERATURA CITADA

- Alichanidis E, Polychroniadou A. Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*. 2008; 88: 495–510.
- Allerberger F. *Listeria*; *Foodborne Diseases*, 2007, V. St. Georgiev (Ed.). Humana Press
- Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods; *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2007, A. Méndez-Vilas (Ed.).
- Baylis CL. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, 2009; 62: 293-307.
- Bell C, Kyriakides A. *Listeria monocytogenes*. In: Blackburn C de W and McClure PJ. Eds. *Foodborne pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2002.
- Benkerroum N., Tamine AY. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (*Iben*, *jben* and *smen*) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 2004; 21: 399-413.
- Beuvier E., Buchin, S. Raw Milk Cheeses; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition - Volume 1: General Aspects, France ISBN: 0-1226-3652-X, Set ISBN: 0-1226-3651-; Elsevier Ltd, 2004.
- Blackburn, Clive de W; McClure, Peter J., eds. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*; Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, United Kingdom/USA; 2002
- Bockelmann W, Willems KP, Neve H, Heller KH. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 2005; 15: 719–732
- Cebrián G., Sagarzazu N., Pagán, R. Condón S., Mañas P. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 140: 26-33
- Cole, MB. Jones, MV. Holyoak, K. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990; 69: 63-72.
- D'Aoust, JY. *Salmonella* and the international food trade, Review Article. *International Journal of Food Microbiology*. 1994; 24: 11-31.

- Denis C, Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*.2008; 126:311-315.
- Domínguez, L.; Garayzabal, J.F.F.; Vazquez, J.A.; Blanco J. L.; Suárez, G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. *Letters in Applied Microbiology*.1987; 4: 125-127.
- Donnelly CW. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed. Vol 1. 2004.
- Doores S. Organic acids; *Antimicrobials in Food*, Third edition; P. M. Davidson, J. N. Sofos, and A. L. Branen (Ed).2005.Taylor & Francis Group.
- El Marrakchi, A.; Hamama, A.; El Othmani, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. *Journal of food protection*. 1993; 56; 256-259
- Enciclopedia de los Municipios de México ESTADO DE TABASCO, BALANCÁN consultada en la siguiente dirección: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/tabasco/mpios/27001a.html>. Durante Febrero a Marzo de 2010
- Fadda ME, Cosentino S, Deplano M, Palmas F. Yeast populations in Sardinian feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 69: 153–156.
- FDA. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods: A Report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the US Department of Health and Human Services December 31, 2001 IFT/FDA Contract No. 223-98-2333 Task Order No. 4
- Fleet GH, Mian MA. The occurrence and growth of yeasts in dairy products *International Journal of Food Microbiology*, 1987; 4: 145-155.
- Haouet, M. Naceur; Altissimi, M Serena; Framboas M.; Galarini R. Validation of the Volhard method for chloride determination in food. *Accred Qual Assur* (2006) 11: 23–28 DOI 10.1007/s00769-006-0116-x
- Hayaloglu A.A., Guven M, Fox PF. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese ‘BeyazPeynir’ *International Dairy Journal* 2002; 12: 635–648.



- Hill C, Cotter PD., Sleator RD, Gahan Cormac GM. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*.2002; 12:273-283.
- Horwitz, W., Latimer, George W, Official Methods of Analysis of AOAC International.18th edition.AOAC International. 2007
- ICMSF. *Microorganism in Foods*, Microbial ecology of food commodities. 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Academics, Plenum Publishers. Londres, U.K. 2006.
- Jay JM. *Modern Food Microbiology*.6<sup>th</sup> edition. Aspen Publishers, Inc., Maryland.2000.
- Kashket ER. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*. 1987; 46, 233-244.
- Kasrazadeh, M, Genigeorgis C. Potential growth and control of *Salmonella* in Hispanic type soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*.1994; 22:127-140.
- Lado, BH. And Yousef, AE. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2007: 158-213.
- Larson AE, Johnson EA, Nelson JH. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science*.1999; 82: 1860-1868.
- Leyer, GJ.; Johnson, EA. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992; 58:2075-2080.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P..A stochastic approach for integrating strain variability in modeling *Salmonella enterica* growth as a function of pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 2011149, 254-261.
- Lindqvist R, Sylvén S, Vågsholm I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk, *International Journal of Food Microbiology*.2002; 78: 155– 170.
- MacDonald, PDM. Whitwam, RE, Boggs JD.; MacCormack, J. Newton; Anderson, Kevin L.; Reardon, Joe W.; Saah, J. Royden; Graves, Lewis M.; Hunter, Susan B.; Sobel,Jeremy; Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese; *Clinical Infectious Diseases*; No. 40, 2005, pp. 677–82.
- Mauropoulos A.A. and Arvanitoyannis IS. Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. 1999. *Food Control*. 1999; 10: 213-219.

- Millet L, Saubusse M, Didiene R, Tessier L, Montel MC. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 108: 105 – 114.
- NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación, Lunes 27 de septiembre de 2010.
- Norhana, M.N. W., Poole, S. E., Hilton D. C., Dykes, G. A. 2010. Prevalence, persistence and control of Salmonella and Listeria in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control*, 21: 343-361.
- Ouadghiri M, Amar M, Vancanneyt M, Swings J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251:267-271.
- Öksüz, Ö, Arici, M, Kurultay, S, Gümüs T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey *Food Control*, Vol. 15, No. 6, 2004, pp. 453-456
- Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztúri P, Kardos G, Turcsányi I, Béri B, Szabó A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*.2007; 118: 186-193.
- Pérez Pacheco F, Bucio Galindo A.; Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth; Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Vol. 2. 2010. ISBN-13: 978-84-614-6195-0
- Ramos IB, Bucio GA, Bautista MC, Aranda IE e Izquierdo RF. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso crema tropical, *Universidad y Ciencia* 2009; 2: 159-171.
- Rogga KJ. Samelis J, Kakouri A, Katsiari , MC. Savvaidis IN, Kontominas MG. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. *International Dairy Journal*, 2005;15: 59-67.
- Rudolf M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 63 91–98.
- Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, De Vuyst L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making, *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 72: 125–136.

- Schulz-Collins D, Senge B. Acid- and Acid/Rennet-curd Cheeses Part A: Quark, Cream Cheese and Related Varieties; Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 2: Major Cheese Groups; ISBN: 0-1226-3653-8; Set ISBN: 0-1226-3651-1; Elsevier Ltd; 2004.
- Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 36: 1- 29.
- Sutherland J, Varnam A. Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In Blackburn C de W and McClure PJ. Eds. *Foodborne pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2002.
- USDA-ARS. Pathogen Modeling Program. (USDA. Pathogen Modeling Program [version 7.0]). <http://ars.usda.gov>. Consultado en 2010
- Vétier N, Banon S, Chardot V, Hardy J. Effect of Temperature and Aggregation Rate on the Fractal Dimension of Renneted Casein Aggregates. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86:2504-2507.
- Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Montet MP, Bonin V, Dernburg A, Richard Y. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 105: 83-88.
- Viljoen BC. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 69 pp37-44
- Villegas de Gante, A. Los Quesos Mexicanos. CIESTAAM Editorial, p.p. 215-216. México. 1993.
- Villegas de Gante, Abraham. Tecnología Quesera. Editorial Trillas, México. 2004p.p. 11-26
- Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, van Boekel MAJS. Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. First Edition. Marcel Dekker 1999.
- Walstra P, Wouters JTM and Geurts TJ. *Dairy Science and Technology*, Second Edition. CRC Press 2006.
- Walther B, Schmid A, Sieber R, Wehrmüller K. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology* 2008. 88, 389-405.
- Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 2002; 12: 91-109.

## 9 ANEXO

### 9.1 Anexo I

Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Vol. 2

A. Méndez-Vilas (Ed.) pp 1205-1216

#### **Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth**

**F. Perez Pacheco<sup>1</sup>, and A. Bucio Galindo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, km 3.5 carretera Cárdenas, Huimanguillo, CP 86500. México.

Raw milk acid cheeses are manufactured and consumed in some tropical regions in America, North Africa and in the East Mediterranean countries. For tropical cheeses, little information is available on its microbial safety. This review give some insights of the microbiological safety of some raw milk acid cheeses around the world which are traditionally made at a pH below 4.7 and which contain other hurdles which are generally known as limiting factors for pathogens growth. It is described the occurrence of microbial pathogens in acid cheeses; the intrinsic and extrinsic conditions favoring its survival and growth, including pH, moisture, the presence of lactic acid bacteria and temperature. It is reviewed the published information on outbreaks of human illness linked to consumption of the raw milk cheeses made with acid curds. This information is important at epidemiological level because raw milk cheeses with higher pH values are generally known as vehicles of infection. Cheeses with lower pH values might be considered as a low microbial risk group where pathogen might be at a low level of concern. Microbial safety of these cheeses is due to the bacteriostatic properties given by its manufacture peculiarities. Microbial safety of these cheeses may be enhanced by the usage of good quality raw milk and by following good manufacturing practices in the whole process of cheese making to prevent cross-contamination of the product. Some other strategies used to improve the safety level of this kind of cheeses are mentioned.

**Keywords** Raw milk cheese, pH, safety, lactic acid bacteria, pathogens

### **1. Introduction**

Cheese has a long history in the human diet [1]. Cheese making evolved centuries ago as a means of concentrating raw milk via acid precipitation of milk [2]. Fermentation of the milk sugars would cause the acidified milk to curdle and the swaying motion would break up the curd and provide solid curd and drinkable whey. The curds would be removed, drained and lightly salted to provide a tasty and nourishing high protein food [1].

Lactic acid bacteria (LAB) were likely the prime agents in producing soured (fermented) milk and dairy products. They are naturally present in the udder, the raw milk of healthy animals and have spread in the dairy environment [3]. Many species of LAB have the Generally Recognized as Safe (GRAS) status and are extensively used in the manufacture of dairy products. The prime property of LAB is the production of acids, especially lactic acid. The inhibitory capacity of this acid lies in its reduction of pH to levels below which bacteria cannot initiate growth. Lactic acid has unique sensory qualities and antimicrobial properties [4]. Lactic acid has a sour and pleasant taste. It has the generally recognized as a safe (GRAS) status by FDA and EC.

#### 1.1 Classification and definition of Acid Cheeses

Currently clotting of the milk in acid curd cheeses is still accomplished by small enterprises around the world by adding acidifying starters (LAB), acids (i.e. lemon juice), and enzymes (rennet). Rennet sets the cheese into

a strong and rubbery gel (cheese-like) compared to the fragile and weak gel produced by acidic coagulation alone (i.e. yogurt) [5].

The acid curd cheeses or acid/rennet curd cheeses may be very similar but also rather different in respect of manufacturing protocols, composition and organoleptic as well as mechanical properties. The main factor in the categorization of these cheese is their age. They differ whether they are fresh or ripened, by the moisture content and by their mechanical properties (texture) and other peculiarities of the milk used and the processing, such as the methods of salting or ripening (Fig. 1). However, the classification and definition of cheeses are, in most countries, controlled by a codex or law. An alternative classification of acid cheeses made with raw milk might be done by the hurdles related to microbial safety (Fig 2).

### 1.2 Fresh cheeses

According to Schulz-Collins and Senge [6], fresh cheeses are generally low in dry matter (DM) and, hence, low in fat and protein and high in lactose/lactate. As most of the calcium is solubilized during the acid coagulation and removed with the whey, fresh cheeses are much lower in calcium than rennet-curd cheeses [6]. They can be divided into various categories, e.g., by the method of coagulation- acid, acid rennet, acid-heat, etc., their consistency- paste, grainy or gel-like, or raw material- milk or whey. Fresh cheeses without additional preservatives can spoil in a matter of days.

### 1.3 Ripened cheeses

In comparison, most ripened cheeses, are generally high in dry matter (DM) and, hence, high in fat and protein and low in lactose/lactate. Acid-curd ripened cheeses have generally a very strong flavor and odor, and a slightly yellow color and a slightly brittle texture [6]. Ripened cheeses can be divided into two types, mold-ripened cheeses and yellow cheeses. One of the important species for the ripening of yellow cheeses is *Brevibacterium linens* (the reddish-orange "smear bacteria"). It imparts pungent odors and distinctive flavors. *Brevibacterium* is also found on human skin, and structures adjacent to skin and it is partially responsible for body odor. Strains assigned to *Brevibacterium* had not been associated with human infections [7]. This species can grow spontaneously on the surfaces of Harzer acid cheese (Germany) or artisan cheeses, like queso de Poro in Mexico.

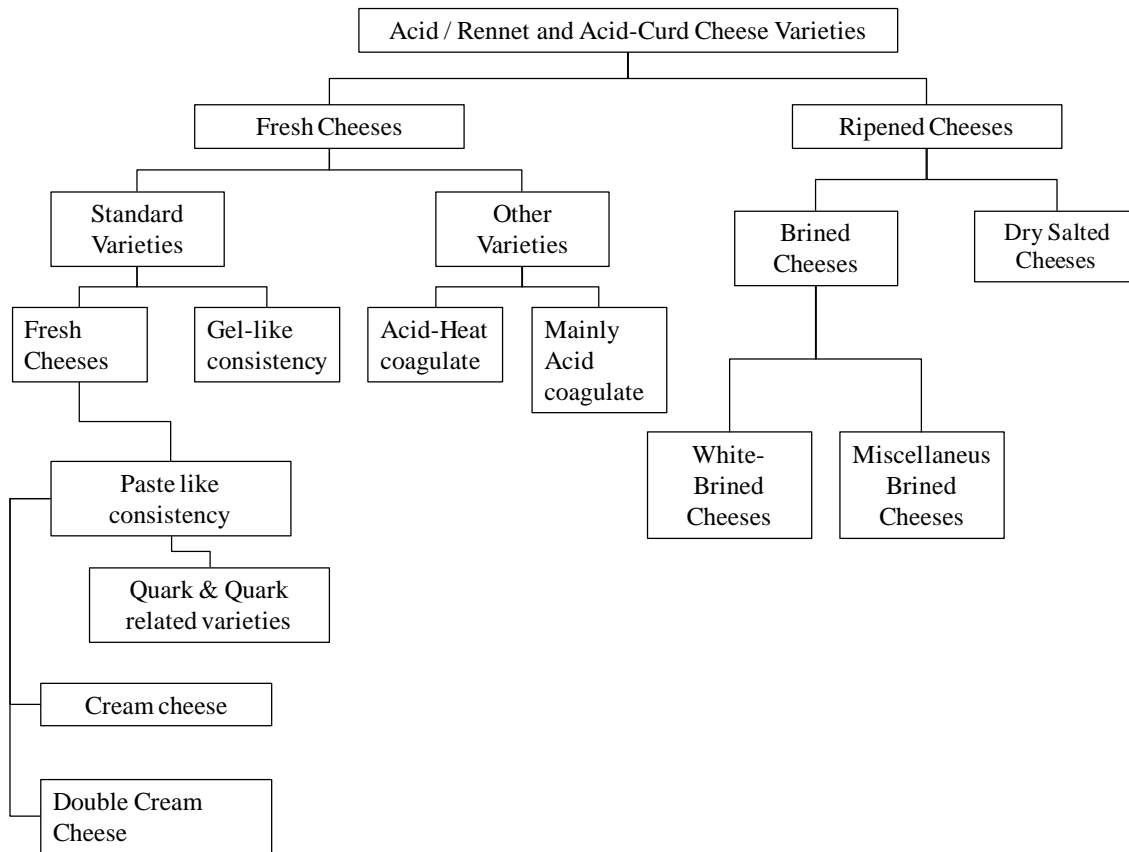
During ripening, changes occur in the matrix through the influence of the loss of water and proteolysis. Proteolysis begins with coagulation of the milk in the vat; this is a primary proteolysis, i.e., internal hydrolysis of casein molecules, by the coagulant and indigenous enzymes of milk, such as plasmin. Secondary proteolysis occurs during ripening, by the action of peptidases of microorganisms. Proteolysis weakens the structure of the casein matrix [8].

Within the ripened cheeses, brined cheeses are the most important family of cheeses for East-Mediterranean and neighboring countries [9]. White-brined cheeses (also known as white-pickled cheeses) are the most popular varieties of cheeses manufactured in the North-east Mediterranean area and the Balkans. They are manufactured from ovine, buffalo, bovine and/or caprine milk or from mixtures of these milks. Feta cheese (in Greece), Domiati (in Egypt), Beyaz peynir (in Turkey) and Halloumi (in Cyprus) are the best-known cheeses, while other, less well-known varieties include Batzos from Greece and Brinza from Bulgaria [9]. Other important ripened cheese is queso de Poro, which is a low pH, low moisture and ripened cheese made from raw cow milk in Mexico [10]. It is generally stored and distributed at room temperature.

### 1.4 Manufacturing

A general procedure of manufacturing raw milk acid cheese is shown in Fig 3. Curd acidification should be accomplished during the early stages of cheese making (curdling, draining). For most of the White Brined Cheese, it is essential that about 24 h after coagulation pH is lower than 5.0, moisture is < 60% and salt-in-moisture content (S/M) is ~ 2.5% [11]. Lactic acid production during these stages is of vital importance. Too slow or too low

acidification may not suppress the growth of some microorganisms (i.e. coliforms) able to cause early gas blowing. This is a defect associated mostly with raw milk cheeses. On the other hand, high curd acidification leads to excessive drainage, lower yield and dry, hard and grainy cheeses without cohesion, especially when goat's or cow's milks are used for cheese-making. The cheeses should be transferred to the cold room (4–5 °C) only when their pH attains a value of ~ 4.6 or lower, moisture level is ~ 55% and solid/moisture higher than 50% [11].



**Fig. 1** Classification of Acid Cheeses. Modified of Schulz-Collins and Senge 2004. Ripened Cheeses were divided in two categories: 1) Brined Cheeses, which was subdivided in A) White Brined Cheeses B) Miscellaneous brined cheeses and 2) Dry Salted cheeses.

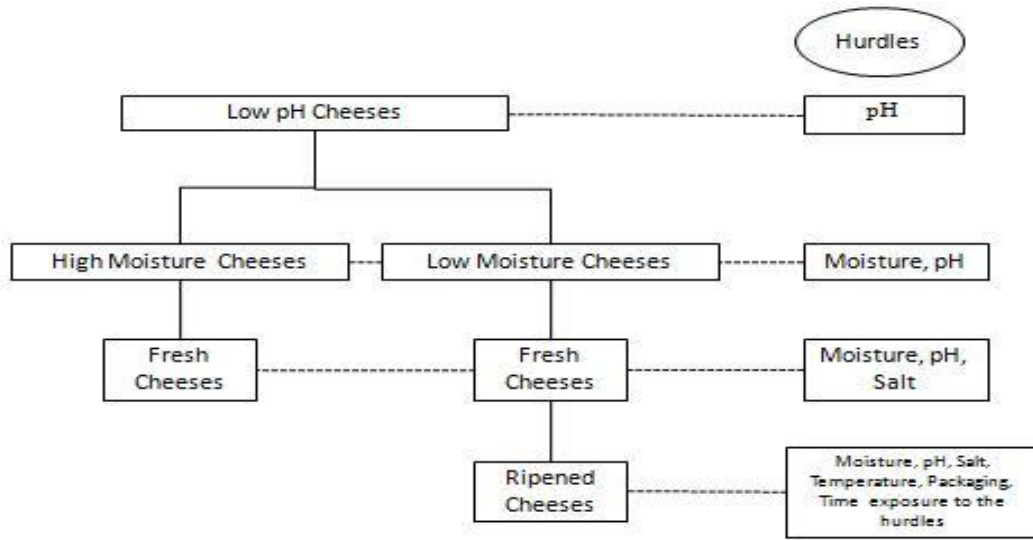


Fig. 2. Simplified scheme of classification of raw milk acid cheeses by microbial hurdles.

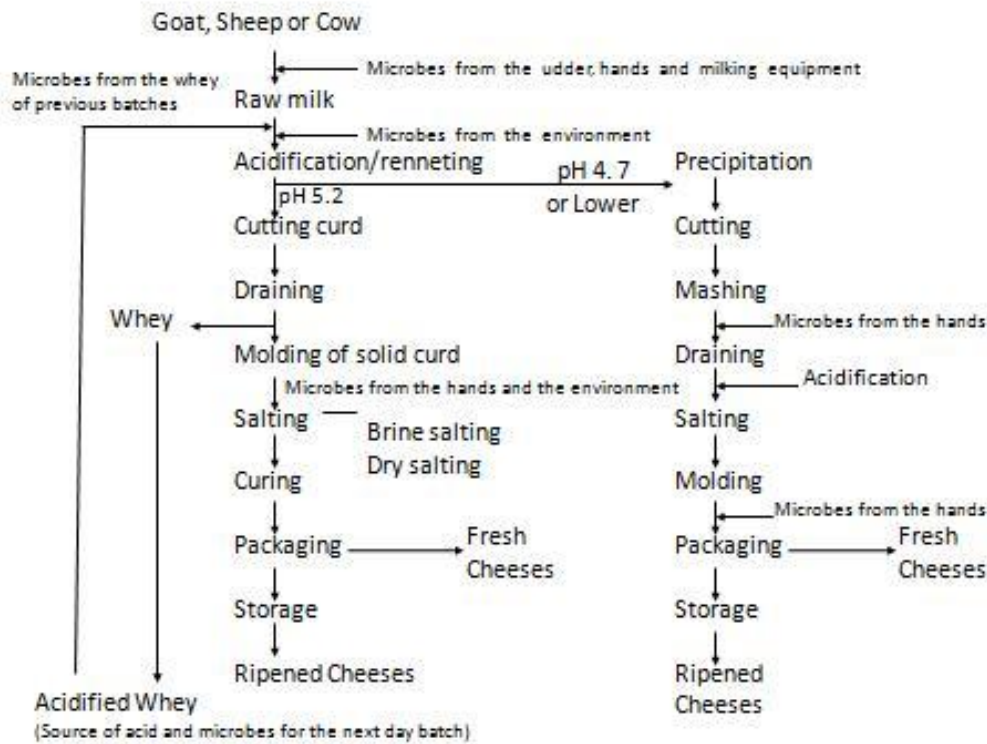


Fig. 3 Schematic illustration for the manufacture of traditional raw milk acid cheese.



## 2. Microbes and Sources of Microbes in Raw Milk Cheeses

Milk is an excellent medium for growth of microorganisms, as it provides rich nutrients (proteins, fats, lactose, vitamins and minerals) for microbes, it is high in moisture, and has neutral pH. Milk is exposed to microorganisms during collection, storage, transportation, and processing.

Microorganisms are important in raw milk cheeses for three principal reasons:

- LAB and other microorganisms may contribute in the preservation of milk and in the production of desirable flavor and physical characteristics [12]. For raw milk cheeses there is a need for knowledge of the natural biodiversity of microorganisms, their role, and their interactions [8].
- Pathogens or their toxins may constitute health hazards.
- Spoilage microorganisms or their metabolites may cause spoilage.

### 2.1 Microbes with a specific role

Some microbes can produce many flavorful products and can also preserve milk and milk products [13]. Microbes of raw milk cheese which are generally considered safe are “LAB”, some species of yeasts and molds are also safe and are related to flavor production. For some cheeses, other important bacteria are the propionic acid bacteria and *Brevibacterium* as well [14].

#### 2.1.1 Lactic acid bacteria

LAB forms a natural group of Gram-positive, nonmotile, non-sporeforming, rods and coccus-shaped organisms that ferment carbohydrates and higher alcohols to form chiefly lactic acid. They are oxidase negative and catalase negative [15, 16]. Important genera for dairy products are *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* [17]. LAB may withstand a low pH because when grown in acidified medium, they maintain a higher pH in the cytoplasm than the culture medium [18]. Higher internal pH is accomplished by pumping out protons (H<sup>+</sup> ions) via ATPases [17]. LAB are naturally present in raw milk and raw milk products. In traditional cheese making they are transferred from old batch to new batch via whey addition. Selection of the beneficial natural flora in milk, such as lactobacilli, streptococci and lactococci naturally occur in good batches and in many instances decrease the numbers of bacterial pathogens [2]. In optimizing the manufacturing process, the direct addition of selected LAB as starter cultures in pasteurized milk is a common practice [2]. As a drawback, the sensory characteristics of the original cheeses are lost partially, because there are some microorganisms important in the flavor formation of artisan cheeses that are not added as starters. At the beginning of ripening, LAB starter counts are high, usually 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU/g, and decrease regularly by two or more log cycles during ageing, whereas adventitious microorganisms, which are initially at a level often <10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> CFU/g, grow during ripening [8]. The starter flora is responsible for acid development during cheese manufacture. The majority of the strains belongs to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus*. The main species used as starters for Feta cheese are *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *L. delbrueckii*. The main LAB isolated from Brie cheese are *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *Lactococcus lactis*, *Lc garvieae*, *Lc raffinolactis*, *Lc pseudomesenteroides*, *Lc mesenteroides*, *Lc citreum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus saccharominimus* and *Streptococcus* sp. [19]. In queso Tabasco, the main acidifying bacteria found were *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus pentosus* [20]. According to Hayaloglu [21], LAB species isolated from Turkish white cheese were, *Lc. lactis* subsp. *lactis* being the predominant species at the beginning of ripening, and enterococci (*E. faecalis* and *E. faecium*) were the second most numerous group. *Lactococci* declined during ripening, while *Lactobacillus* species increased, being *Lb. casei* and *L. plantarum* the predominant species.

#### 2.1.2 Yeast

Yeasts are eukaryotic micro-organisms classified in the kingdom Fungi. They are much larger than bacteria. Yeasts play an essential role in the preparation of certain fermented dairy products such as kefir, kefir-derived raw milk cheeses and in the ripening of many cheeses. The high numbers of yeasts in some acidified dairy products may be attributed to their ability to tolerate low pH values and low water activities; and to grow at low temperatures, to assimilate lactose and organic acids such as succinic, lactic, and citric acid; and to tolerate high salt concentrations and cleaning compounds and sanitizers [23]. The predominance and growth of some yeast species has been related to the ripening process due to their ability to produce extracellular proteases and lipases and grow well at 5°C [24]. Because yeast are recovered at the end of the fermentation stage, it is suggested that they play a secondary role in the aroma development in Jben, a low pH high moisture product from Morocco [25].

The occurrence of yeasts in yogurt can cause spoilage (up to  $10^6$ - $10^7$  CFU/g) [24]. The public health significance of yeasts in foods, including dairy products, has been considered by most health authorities to be very minimal [24]. Yeast in high numbers ( $10^6$ - $10^7$  CFU/g) in Jben (low pH-low moisture cheese) is not matter of concern to the safety of the product [25]. *Candida famata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida diffluens* and *Rhodotorula glutinis* were the most frequency isolated species [23]. The sources of yeast and surface bacteria of smear cheeses are the following: milk, cheese brines, the air of ripening rooms, ripening shelves, and the human skin [26]. High numbers of yeasts are frequently observed on processing equipment, and in the air of the processing environment [22], such as wooden tables used for dry salting the cheese blocks, since wood is an ecological niche for some species such as *Dek. anomala* [22]. Dominant yeasts of brine from Greek feta cheese were *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Torulaspota delbrueckii* and *Pichia membranaefaciens*. It has been suggested that spoilage yeasts may have a role in protecting *L. monocytogenes* from acid in industrial type pilot cheese by metabolizing milk proteins, raising the pH and potentially assimilating organic acids of cheese [27].

## 2.2 Microbial pathogens

According to U.S. Food and Drug Administration (12), and EEC directive 92/46 [8], the principal pathogens of concern associated with milk and processed milk products are *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*, pathogenic *E. coli*. Many of the common enteric pathogens such as *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Campylobacter* are carried in the intestinal tract of ruminants, including domestic animals used in milk production, e.g. cows, sheep and goats [28]. Effective cleaning procedures, including removing faecal material from udders prior to milking and good manufacturing practices during cheese making process can reduce the risk [28].

### 2.2.1 *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* is a Gram positive rod, oxidase negative, catalase positive without pigmented colonies [29]. It is also the causal agent of human Listeriosis an atypical foodborne disease and it is one of the most dangerous pathogens to the food industry [28, 30].

#### 2.2.1.1 *Habitat*

It is widespread in nature and has been isolated from soil, dust, food products for humans—both of animal and vegetable origin, feed, water, and sewage, and it can be carried by almost any animal species, including asymptomatic humans [30]. *Listeria* spp. most commonly gain access to the milk from the cows' udder during milking. Animals are most likely to become colonized through consumption of the organism in grass or feed and, in particular, silage. As with enteric contaminants, *Listeria* spp. can gain entry to the milk from faecal contamination of the udder [31]. Once introduced into the milking equipment, *L. monocytogenes* can readily colonize these moist environments [31]. *L. monocytogenes* is found commonly in wet areas of dairy plants, such as floor drains, conveyers, floors and stainless steel equipment and has been isolated from brine solutions used for cheese [32].

#### 2.2.1.2 *Adaptations of Listeria to the environment*

*L. monocytogenes* is a psychotropic and salt tolerant bacterium, and may grow at pH 4.5 to 9.6 or at aw values as low as 0.92, while certain strains or serotypes may show increased adaptive responses to food-related

stresses. Thus, controlling contamination and growth of *L. monocytogenes* during cheese manufacture, ripening, and storage is an important safety concern and consumer demand [27].

#### 2.2.1.3 Occurrence in cheese

The occurrence of *Listeria* spp. in raw milk acid cheeses is variable. It has never been reported for Feta cheese [33]. A survey on the occurrence of pathogens in commercial Moroccan dairy products showed that *L. monocytogenes* was frequently detected in the fresh products made with raw milk (low pH-high moisture) but not in ripened cheese [34]. Due to their overall lower hurdle effect compared to hard cheeses, soft cheeses show a higher incidence and potential for survival/growth of *L. monocytogenes*. Accordingly, soft cheeses have been implicated in the most fatal listeriosis outbreaks in total or proportionally to the numbers of reported cases of illnesses [27]. Rudolf and Scherer [35] reported that 6.4% of European red-smear cheese samples were contaminated with *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* was found more frequently in high-moisture cheese.

#### 2.2.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive cocci, oxidase negative and catalase positive. It forms clusters showing pigmented colonies when grown in nutrient agar. It often forms characteristic clumps resembling bunches of grapes [29]. Staphylococcal intoxication (staphylococcal food poisoning) results from ingestion of enterotoxins, synthesized during growth of *S. aureus* in foods. Enterotoxin production is most common amongst *S. aureus* isolates of human origin and there is a strong correlation with production of the enzyme coagulase [36].

##### 2.2.2.1 Habitat

Staphylococci are predominantly of animal origin, although isolation of some species may be made from environmental sources. Some strains of *S. aureus* are able to colonize equipment and the factory environment. Cleaning schedules should take account of this possibility [37]. They may be present as part of the normal microbiota of humans and other animals. *S. aureus* might be carried on skin and nasal cavities of 30% of the healthy human population [36]. *S. aureus* is frequently found in milk at low levels. It often occurs in the udder of a cow with mastitis or subclinical mastitis. *S. aureus* can gain access to milk either by direct excretion from udders with clinical or subclinical staphylococcal mastitis or by contamination from the environment during handling and processing of raw milk [37]. When the udder is infected, *S. aureus* is excreted in the milk with large fluctuations in counts ranging from zero to  $10^8$  CFU/ml [37].

##### 2.2.2.2 Occurrence in cheese

*S. aureus* was isolated from a Turkish White cheese, “Beyaz Peynir” during a ripening. This is a brined cheese variety with a soft or semi-hard texture and a salty and acid taste [20, 37]. In Lben (low pH and high moisture dairy product), coagulase positive *S. aureus* was detected in numbers above  $10^3$  CFU/ml [25]. High numbers of *S. aureus* are generally associated with the presence of toxin ( $>10^6$  CFU/g of cheese or ml of whey).

Cheese vats with low acidity for a long time might be a risk, because *S. aureus* might grow at a level high enough to produce the enterotoxins [13]. When LAB are used as starters to make cheese, it is reduced the possibility of toxin-infections with *S. aureus* [38]. However, a small number of outbreaks caused by *S. aureus* have been attributed to the use of contaminated starter cultures. Rapid acid production by active starter cultures could prevent *S. aureus* to grow to the high numbers required for enterotoxin production [12].

In a challenge study, goat milk was inoculated with an enterotoxinogenic *S. aureus* strain to a final concentration of  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  CFU/ml. Thereafter, a raw goat milk lactic cheese was made (low pH, 37-50% dry matter content). Staphylococcal counts in inoculated in goat milk, declined markedly after the draining period and the organism even disappeared from some cheeses by the end of ripening stage [39].

### 2.2.3 *Salmonella*

*Salmonella* spp is a Gram negative, non sporing rods, oxidase negative, and catalase negative without producing pigmented colonies [29]. It is one of the most prevalent pathogens in the food industry. Studies about this microorganism date up to 100 years and have been the causative agent on several outbreaks of foodborne diseases particularly in dairy products. Most of species are pathogenic [40, 41, 12].

#### 2.2.3.1 *Habitat*

The primary habitat of *Salmonella* spp. is the intestinal tract of animals and humans. *Salmonella* food poisoning results from the ingestion of foods containing appropriate strains of this genus in significant numbers [29]. Raw milk is an important vehicle for salmonellae causing human infection [41, 3, 12]. *Salmonella* spp. causes illness by means of infection. They multiply in the small intestine, colonizing and subsequently invading the intestinal tissues, producing an enterotoxin and causing an inflammatory reaction and diarrhea.

#### 2.2.3.2 Occurrence in cheese

Although analysis of commercially made cheeses rarely results in isolation of salmonellae, these species may grow during cheese manufacture and can survive in various cheeses for more than 60 days [12]. *Salmonella* spp. was detected in traditional Jben (low pH-intermediate moisture) at frequencies of 10% [25].

### 2.2.4 *Escherichia coli* O157: H7

*E. coli* O157:H7 it is a Gram negative rod, oxidase negative, catalase negative without producing pigmented colonies [29]. Most of foodborne outbreaks of *E coli* O157:H7 have been associated with the consumption of foods contaminated with cattle feces [40, 3, 12].

#### 2.2.4.1 *Habitat*

It is commonly isolated from feces of cattle and other farm animals; it also has been isolated from raw milk and dairy products [12]. Because *E coli* O157 has been found regularly in healthy cattle feces, this animal is known to be an asymptomatic transmitter [42].

#### 2.2.4.2 Occurrence in cheese

There are not many reports of *E. coli* O157:H7 isolated from unpasteurized milk [39]. However, there is a growing concern, because *E. coli* O157:H7 is relatively an acid tolerant microorganism [12]. The presence of viable *E. coli* O157:H7 is of concern to all manufacturers of raw lactic milk cheeses for several reasons. First, this pathogen is infectious even at low doses. Second, experiments *in vitro* have shown that *E. coli* O157:H7 colonies exposed to mildly acid conditions develop an adaptive tolerance response (ATR) to acid environments and become acid-tolerant to even lower pHs during subsequent exposures [39].

## 3. Factors limiting pathogens growth

The survival and growth of pathogens in cheese depend on the many factors, including variations in pH,  $a_w$ , salts, the presence of competing microbiota, and the temperature and biochemical changes during ripening. The microbiological quality of the milk and the good manufacturing practices will also contribute to the safety of the final product, especially in cheeses where milk is not pasteurized [13]. Each limiting factor will be described in the following lines.

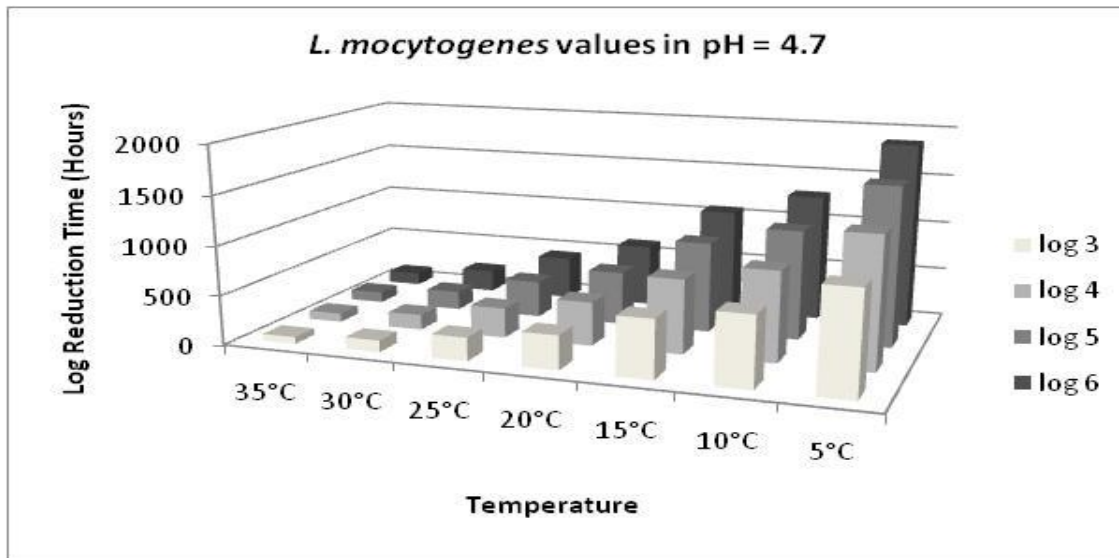
### 3.1 pH

Most of bacteria grows optimally at a pH close to neutrality [29]. Acid curd cheeses might have a longer storage life and higher safety standards than neutral pH cheeses. A low pH decrease the growth rate of most of microbial pathogens and microbial spoilage. Among the pathogenic bacteria affected in their growth rate by the

effect of low pH are species of the genus *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and the pathogenic strains of *Escherichia coli* such as the enterohemorrhagic (EHEC), *E. coli* enteropathogenic (EPEC) *E. coli* enterotoxigenic (EETC), *E. coli* enteroinvasive (EIEC) y *E. coli* O157:H7 [41]. For instance growth of *L. monocytogenes* has been reported at pH values ranging from 4.0 to 9.6. Lag phase and generation time increase considerably as pH decreases to below 6.5. *L. monocytogenes* can tolerate pH values up to 4.1 depending on other factors such as moisture content, storage temperature, and the presence of starter cultures [40, 43, 44, 29]. *E. coli* O157: H7 appear to be more acid-resistant, being able to withstand pH values as low as 3.0. Consequently, there is a potential risk that some VTEC strains, and especially strains of *E. coli* O157:H7, could survive the low pH associated with the cheese manufacturing process [28].

### 3.2 pH and temperature

Absence of growth and decrease in cell viability may be observed in *L. monocytogenes* at pH  $\leq 5.5$ , when other environmental conditions are not optimal for survival [46]. By using a simulation model (USDA Pathogen Modeling Program), it was possible to figure out what would be the reduction time of *L. monocytogenes* exposed to low pH (pH = 4.7) at various temperatures (Figure 3); additional conditions in the model were sodium chloride 2.0%, aw 0.989, and lactic acid 1.5%. The higher the temperature, the faster the reduction time.



**Fig. 4** Exposure time, needed to decrease *L. monocytogenes* populations 3 log units (i.e., 3 D-values) at different storage temperatures, as determined by the USDA Pathogen Modeling Program. (USDA. Pathogen Modeling Program [version 7.0]). <http://ars.usda.gov>

By using The USDA Pathogen Modeling Program, it was also possible to simulate what would be the reduction time of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* and *E.coli* by varying pH and temperature. High temperatures were related with a fast reduction time for pH values between 4 and 5.2. The longer reduction time was associated with high pH and low temperature.

In order to confirm such predictive information derived from a mathematical model, it is necessary to carry out challenging experiments to examine survival of the pathogens during the manufacture and ripening of raw milk cheeses as described by Vernozy-Rozand and colleagues [39]. A source of variation could be the temperature of ripening. Such information could help to know whether the actual temperatures for ripening of some regional cheeses specialties like queso de Poro in Mexico are the best for microbial safety. Queso de poro is usually ripened and stored at room temperature.

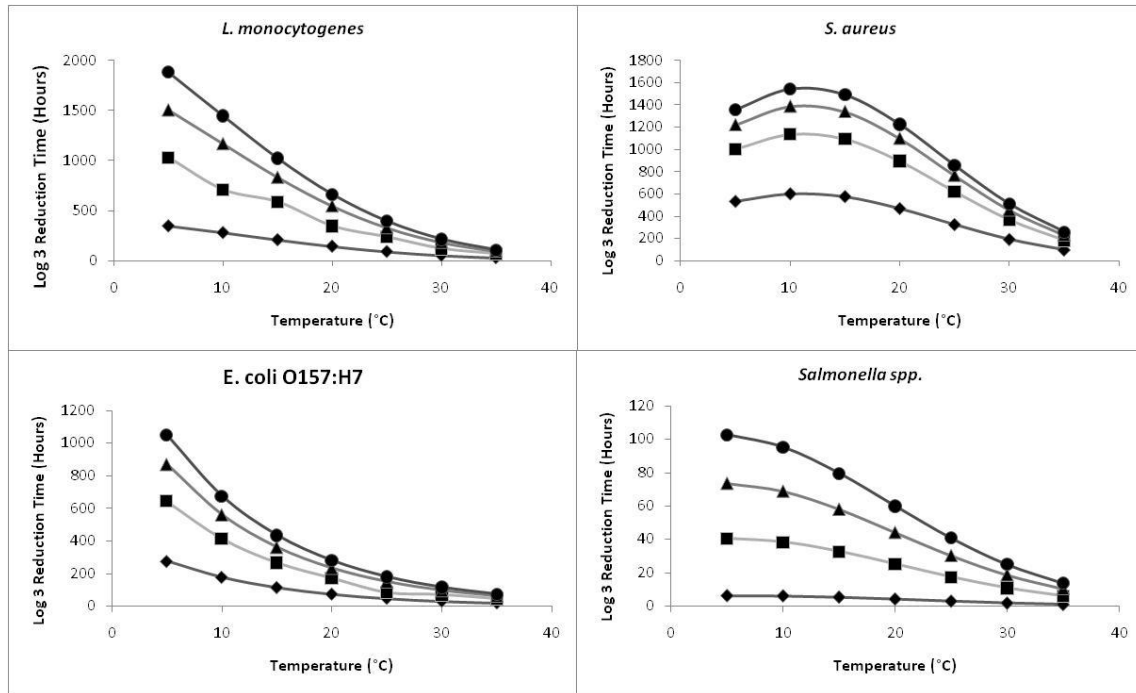


Fig.5 Exposure time, needed to decrease A) *L. monocytogenes*, B) *S.aureus*, C) *E. Coli* O157:H7, D) *Salmonella* spp., populations 3 logs (i.e., 3 . D-values) at different storage temperatures and different pH concentrations, values obtained with the USDA Pathogen Modeling Program. (From [47] Pathogen Modeling Program [version 7.0]. <http://ars.usda.gov>. Symbols ◆ pH 4.0, ■ pH 4.7, ▲ pH 5.0, ● pH 5.2)

There are some adaptation mechanisms to acid reported for the genus *Salmonella* [48], *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and *E.coli*. Acid-adapted cells of *Salmonella* had increased resistance to inactivation by organic acids commonly present in cheese including lactic, propionic, and acetic acids. Such mechanisms could be enhanced when milk fermentation takes a long time [48].

These observations support the theory that acid adaptation is a mechanism of adaptation that allows *Salmonella* spp. to persist in fermented dairy products and possibly other acidified food.

### 3.3 Alkalinization of cheese

Some varieties of cheese may have other non-lactic and non-acidifying microbiota such as yeasts, fungi that can alkalize the cheese as *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus* and can allow the growth of *Brevibacterium* in numbers as high as lactic biota. Growth of some pathogens such as *Listeria* can occur on cheese surfaces [49].

### 3.4 Other hurdles

In the acid cheeses, the others intrinsic factors like the  $a_w$  and the salt content generate adverse conditions for microbial growth, which vary depending on the type of cheese and the level technology used in its manufacture [8]. In general *S. aureus* and *L. monocytogenes* are resistant to salinity (up to 6%) and pH of 4.1 in certain cases [40,43,44]

### 3.5 Stress adaptation

A stress adaptation occurs when a bacterium exposed to a sub-lethal stress, may become more resistant to subsequent applications of the same stress in a higher intensity or to exposure to other stresses such as temperature, salt content, moisture and  $a_w$  conditions [50, 51]. Several foodborne pathogens such as *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* have been reported to exhibit an enhanced resistance to severe acid environments after exposure to a mild acid environment. The acid-adapted bacteria may also show increased resistance, or cross-protection, to other environmental stresses.

#### **4. Outbreaks of disease by the presence of pathogens**

There is limited published information on outbreaks of human illness linked to consumption of the raw milk cheeses made with acid curds. However there are many reports of outbreaks of foodborne diseases as a result of ingestion of high or mild pH cheeses made of raw milk.

Cheeses are susceptible to contamination during the ripening process, for instance, multiplication of *L. monocytogenes* is associated with increasing pH during ripening of cheeses like Camembert, Brie, Blue and Feta [12]. There is not information regarding to possible outbreaks of salmonellosis in acid cheeses. However *Salmonella* spp. in dairy products caused several outbreaks of foodborne disease in Canada, Europe and USA, in particular cheeses like Cheddar, Mozzarella, Irish [41, 52] which are mild acidified cheeses.

#### **5. Strategies used to improve the microbial safety level of raw milk cheeses**

Hygienic milking practices involving udder and teat cleaning and sanitization can help to reduce contamination of the milk with pathogens like *Listeria* spp. Equally important is the cleaning and sanitization regime applied to the milking and milk storage equipment (31). Rapid acidification in the early stages of the process of raw milk cheeses manufacture is a key factor to effectively control the development of *L. monocytogenes* and other pathogens with low core contamination in raw-milk [49]. Rapid acidification may be accomplished either by adding active starter cultures or acidified whey, or by addition of acid. It is necessary to incorporate the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) and Microbial Risk Assessment (MRA) plans for prevention of contamination of raw milk cheeses.

#### **6. Conclusion**

Raw milk acid cheeses are produced by small enterprises in various countries around the world. The process of manufacture of raw milk acid cheeses is similar in many ways. Microbial risks might be prevented by including hygiene in the milking process and by the rapid acidification of the milk and the rapid reduction of moisture as well. Many microorganisms such as lactic acid bacteria, yeasts, molds and other non-pathogenic bacteria are adapted to survive and grow in such environments. They have a key role in the biochemical and sensory characteristics of each kind of cheese. The lactic acid bacteria group may also have a role inhibiting the growth of pathogenic and spoilage bacteria. Very few reports have shown the occurrence of foodborne pathogens isolated from raw milk acid cheeses, particularly from raw milk acid fresh cheeses. Moreover, to our knowledge, raw milk acid cheeses have never been involved in outbreaks of human diseases. It is feasible that the processing protocols to manufacture raw milk acid cheeses create an unfavorable environment for pathogen microbes to thrive at a level that represent a hazard risk for the consumer.

**Acknowledgements** The support by CONACYT, CCYTET and Sociedad de productores de Quesos de Poro Genuino de Balancán is gratefully acknowledged.

## References

- [1] Walther B, Schmid A, Sieber R, Wehrmüller K. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology* 2008; 88, 389–405.
- [2] Donnelly CW. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed. Vol 1. 2004.
- [3] Walstra P, Wouters JTM and Geurts TJ. *Dairy Science and Technology*, Second Edition. CRC Press 2006.
- [4] Doores S. Organic acids; *Antimicrobials in Food*, Third edition; P. M. Davidson, J. N. Sofos, and A. L. Branen (Ed). 2005. Taylor & Francis Group.
- [5] Vétier N, Banon S, Chardot V, Hardy J. Effect of Temperature and Aggregation Rate on the Fractal Dimension of Renneted Casein Aggregates. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86:2504-2507.
- [6] Schulz-Collins D, Senge B. Acid- and Acid/Rennet-curd Cheeses Part A: Quark, Cream Cheese and Related Varieties; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition - Volume 2: Major Cheese Groups; ISBN: 0-1226-3653-8; Set ISBN: 0-1226-3651-1; Elsevier Ltd; 2004.
- [7] Denis C, Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 126:311-315.
- [8] Beuquier E., Buchin, S. Raw Milk Cheeses; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition - Volume 1: General Aspects, France ISBN: 0-1226-3652-X, Set ISBN: 0-1226-3651-; Elsevier Ltd, 2004.
- [9] Alichanidis E, Polychroniadou A. Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*. 2008; 88: 495–510.
- [10] Villegas de Gante, A. Los Quesos Mexicanos. 1993. CIESTAAM Editorial, p.p. 215-216. México
- [11] Mauropoulos AA and Arvanitoyannis IS. Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. 1999. *Food Control*. 1999; 10: 213-219.
- [12] ICMSF. 2006. *Microorganism in Foods*, Microbial ecology of food commodities. 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Academics, Plenum Publishers. Londres, U.K.
- [13] FDA. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods: A Report of the Institute of Food Technologists for the Food and Drug Administration of the US Department of Health and Human Services December 31, 2001 IFT/FDA Contract No. 223-98-2333 Task Order No. 4
- [14] Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 2002; 12: 91–109.
- [15] Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 36: 1- 29.
- [16] Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods; *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2007, A. Méndez-Vilas (Ed.).
- [17] Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, van Boekel MAJS. *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. First Edition. Marcel Dekker 1999.
- [18] Kashket ER. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*. 1987; 46, 233-244.
- [19] Ouadghiri M, Amar M, Vancanneyt M, Swings J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251:267-271.
- [20] Ramos IB, Bucio GA, Bautista MC, Aranda IE y Izquierdo RF. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso crema tropical, *Universidad y Ciencia* 2009; 2: 159-171.
- [21] Hayaloglu AA, Guven M, Fox PF. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir' *International Dairy Journal* 2002; 12 : 635–648.
- [22] Viljoen BC. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 69 37–44
- [23] Fadda ME, Cosentino S, Deplano M, Palmas F. Yeast populations in Sardinian feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 69: 153–156.
- [24] Fleet GH, Mian MA. The occurrence and growth of yeasts in dairy products *International Journal of Food Microbiology*, 1987; 4: 145-155.
- [25] Benkerroum N, Tamine AY. Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (*Iben, jben and smen*) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 2004; 21: 399-413.
- [26] Bockelmann W, Willems KP, Neve H, Heller KH. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 2005; 15: 719–732



- [27] Rogga KJ, Samelis J, Kakouri A, Katsiari , MC, Savvaidis IN, Kontominas MG. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. *International Dairy Journal*, 2005;15: 59-67.
- [28] Baylis CL. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, 2009; 62: 293-307.
- [29] Jay JM. *Modern Food Microbiology*. 6<sup>th</sup> edition. Aspen Publishers, Inc., Maryland. 2000.
- [30] Allerberger F. *Listeria*; *Foodborne Diseases*, 2007, V. St. Georgiev (Ed.). Humana Press
- [31] Bell C, Kyriakides A. *Listeria monocytogenes*. In: Blackburn C de W and McClure PJ. Eds. *Foodborne pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2002.
- [32] Larson AE, Johnson EA, Nelson JH. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science*. 1999; 82: 1860-1868.
- [33] Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, De Vuyst L. Bacteriocin production by Enterococcus faecium FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 72: 125– 136.
- [34] El Marrakchi, A.; Hamama, A.; El Othmani, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. *Journal of food protection*. 1993; 56; 256-259
- [35] Rudolf M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 63 91–98.
- [36] Sutherland J, Varnam A. Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In Blackburn C de W and McClure PJ. Eds. *Foodborne pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2002.
- [37] Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztúri P, Kardos G, Turcsányi I, Béri B, Szabó A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; 118: 186-193.
- [38] Lindqvist R, Sylvén S, Vågsholm I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk, *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 78: 155– 170.
- [39] Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Montet MP, Bonin V, Dernburg A, Richard Y. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 105: 83-88.
- [40] Blackburn, Clive de W; McClure, Peter J., eds. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*; Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, United Kingdom/USA; 2002
- [41] Kasrazadeh, M, Genigeorgis C. Potential growth and control of *Salmonella* in Hispanic type soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 1994; 22:127-140.
- [42] Öksüz, Ö, Arici, M, Kurultay, S, Gümüs T. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey *Food Control*, Vol. 15, No. 6, 2004, pp. 453-456
- [43] Cole, MB, Jones, MV, Holyoak, K.. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990; 69: 63-72.
- [44] Domínguez, L.; Garayzabal, J.F.F.; Vazquez, J.A.; Blanco J. L.; Suárez, G.; Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 1987; 4: 125-127.
- [45] MacDonald, PDM, Whitwam, RE, Boggs JD.; MacCormack, J, Newton; Anderson, Kevin L.; Reardon, Joe W.; Saah, J, Royden; Graves, Lewis M.; Hunter, Susan B.; Sobel, Jeremy; Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese; *Clinical Infectious Diseases*; No. 40, 2005, pp. 677–82.
- [46] Lado, BH, and Yousef, AE. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2007: 158-213.
- [47] USDA-ARS. Pathogen Modeling Program. (USDA. Pathogen Modeling Program [version 7.0]). <http://ars.usda.gov>.
- [48] Leyer, GJ.; Johnson, EA. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992; 58:2075-2080.
- [49] Millet L, Saubusse M, Didiene R, Tessier L, Montel MC. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 108: 105 – 114.

- [50] Cebrián G., Sagarzazu N., Pagán, R. Condón S., Mañas P. Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 140: 26-33.
- [51] Hill C, Cotter PD., Sleator RD, Gahan Cormac GM. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*. 2002; 12: 273-283.
- [52] D'Aoust, JY. *Salmonella* and the international food trade, Review Article. *International Journal of Food Microbiology*. 1994; 24: 11-31.