



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE NITRATO/NITRITO SOBRE LA  
SUPERIVENCIA DE LA FLORA MICROBIANA EN  
LECHE CRUDA”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTAN:**

**OLIVIA ARROYO REYES**

**DANIELA ITZEL VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**ASESOR ACADÉMICO  
DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES COLÍN CRUZ**

**ASESOR ADJUNTO  
DRA. ANDREA YAZMÍN GUADARRAMA LEZAMA**

**TOLUCA, MÉXICO, 2018**



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>I. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Queso: definición, orígenes y producción</b> .....	<b>4</b>
1.2 Quesos Mexicanos: Productos alimenticios artesanales .....	5
<b>1.3 Leche como materia prima</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Flora microbiana en leche destinada para queso</b> .....	<b>8</b>
1.4.1 Bacterias lácticas .....	9
1.4.1.1 <i>Streptococcus</i> .....	10
1.4.1.2 <i>Lactobacillus</i> .....	11
1.4.1.3 Bacterias lácticas presentes en leche cruda y quesos .....	12
1.4.2 Bacterias Mesófilas y Psicrótrofas .....	13
1.4.2.1 Bacterias mesófilas .....	13
1.4.2.2 Bacterias psicrótrofas .....	14
1.4.2.3 Bacterias mesófilas y Psicrótrofas presentes en leche cruda y quesos .....	15
1.4.3 Mohos y Levaduras .....	16
1.4.3.1 Mohos .....	17
1.4.3.2 Levaduras .....	17
1.4.3.3 Mohos y Levaduras presentes en leche y queso .....	18
1.4.4 Bacterias patógenas .....	19
1.4.4.1 Flora Butírica .....	20
1.4.4.2 Coliformes .....	22
1.4.4.3 <i>E. coli</i> .....	23
1.4.4.4 <i>Salmonella</i> .....	24
1.4.4.5 <i>Listeria</i> .....	25
1.4.4.6 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
1.4.4.7 Otras bacterias patógenas importantes .....	26
<b>1.5 Producción de quesos frescos artesanales</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6 Conservadores y Antimicrobianos</b> .....	<b>28</b>
<b>1.7 Nitrito y Nitrito</b> .....	<b>29</b>
1.7.1 Sales de nitrato y nitrito como aditivo en la industria alimentaria .....	30
1.7.1.1 Características fisicoquímicas del nitrato y nitrito .....	31
1.7.1.2 Obtención .....	31
1.7.1.3 Usos y aplicaciones del nitrato en la industria alimentaria .....	32
1.7.1.4 Función del nitrato en queso .....	33
<b>1.8 Efecto del nitrato sobre las bacterias</b> .....	<b>34</b>
1.8.1 Microorganismos que degradan el nitrato .....	34
1.8.2 Mecanismo de acción de nitrito como antimicrobiano .....	36
1.8.2.1 Acción sobre bacterias aerobias .....	36
1.8.2.2 Acción sobre bacterias anaerobias .....	37
1.8.2.3 Acción sobre bacterias formadoras de esporas .....	38
1.8.2.4 Bacterias inhibidas por nitrito .....	39
1.9 Nitrito como sustancia peligrosa resultante de una transformación secundaria del nitrato .....	41

<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>44</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>84</b>
<b>VI. REFERENCIAS</b>	
<b>V. ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	página
1. Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos.....	7
2. <i>Lactobacillus</i> homo- y heterofermentativos .....	12
3. Antimicrobianos gras y su espectro de inhibición contra microorganismos .....	29
4. Organismos patógenos nitrato y nitrito reductasas y su relación con óxido nítrico (NO) ...	36
5. Diseño experimental para leche cruda adicionada con nitrato alimenticio o agrícola. ....	47
6. Diseño experimental para colonias típicas de <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , coliformes totales o <i>E.coli</i> en leche UHT adicionada con nitrato alimenticio o agrícola. ....	48
7. Conteo microbiano en Log UFC/mL para leche poco contaminada y leche muy contaminada. ....	67

1. Cinética de crecimiento de bacterias mesófilas en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	53
2. Cinética de crecimiento de bacterias psicrótrofas en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	54
3. Cinética de crecimiento para <i>Streptococcus</i> en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	56
4. Cinética de crecimiento para <i>Lactobacillus</i> en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	57
5. Cinética de crecimiento para bacterias Coliformes totales en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	59
6. Crecimiento para Coliformes fecales en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	61
7. Cinética de crecimiento para <i>Staphylococcus</i> en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	62
8. Cinética de crecimiento para Mohos y Levaduras en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	64
9. Concentración en nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> ) en leche cruda poco contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.....	68
10. Concentración de Nitrito iónico (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) en leche cruda poco contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	69
11. Concentración de nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> ) en leche cruda muy contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
12. Concentración de Nitrito iónico (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) en leche cruda muy contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	70
13. Concentración de nitrito iónico (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) presente en leche en presencia de bacterias Coliformes Totales. ....	73
14. Cinética de crecimiento para bacterias Coliformes Totales en leche adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	74
15. Concentración de nitrito iónico (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) presente en leche con <i>E. coli</i> . ....	75
16. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en leche adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.....	76
17. Concentración de nitrito iónico (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) presente en leche con <i>Lactobacillus</i> . ....	78
18. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en leche adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
19. Concentración de nitrito iónico (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) presente en leche con <i>Streptococcus</i> . ....	81
20. Cinética de crecimiento de <i>Streptococcus</i> en leche adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones. ....	82

## GLOSARIO

Sigla	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
BAL	Bacterias ácido lácticas
BPM	Buenas prácticas de manufactura
BPP	Buenas prácticas pecuarias
CFR	Código de regulaciones federales
(CS)	Células somáticas
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EMB	Eosin methylene blue agar
EukNR	Eukaryotic nitrate reductase
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura food
FDA	and drug administration
GRAS	Generally recognized as safe
HACCP	Hazard analysis and critical control points
ICMSF	International commission on microbiological specifications for foods.
LAB	Bacterias ácido lácticas
MRS	Agar de man, rogosa y sharpe
mVOCs	Compuestos orgánicos microbianos
M17	Agar para cultivo y enumeración de estreptococos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nap	Periplasmic nitrate reductase
Nar	Respiratory nitrate reductase
Nas	Assimilatory nitrate reductase
NMP	Numero más probable
NOM	Normas oficiales mexicanas
OMS	Organización mundial de la salud
PDA	Agar de papa y dextrosa
PFO	Ferredoxina oxidorreductasa
RVBA	Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa
SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación
(ST)	Sólidos totales
UFC	Unidades formadoras de colonias
UHT	Ultra high temperature
UPLA	Unión de productores lácteos de aculco s.a. de c.v
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
WOF	Warmed over flavour
XLD	Agar xilosa, lisina, desoxicolato

## ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
a. C.	antes de Cristo
ppm	partes por millón
pH	potencial de iones hidrógeno
%	porcentaje
G	gramo
$a_w$	actividad acuosa
$\mu\text{m}$	micras
nm	nanómetro
$\text{NH}_4^+$	amonio
CoA	coenzima A
$\text{CO}_2$	dióxido de carbono
NaCl	cloruro de sodio
$\text{NO}_3^-$	nitrato
$\text{NO}_2^-$	nitrito
$\text{HNO}_3$	sales de ácido nítrico
$\text{HNO}_2$	sales de ácido nitroso
$\text{H}_2\text{SO}_3$	ácido sulfuroso
$\text{NaNO}_3$	nitrato de sodio
$\text{KNO}_3$	nitrato de potasio
$\text{NaNO}_2$	nitrito de sodio
$\text{KNO}_2$	nitrito de potasio
mg	miligramo
kg	kilogramo
NO	óxido nítrico
Eh	potencial redox
$\text{O}_2$	oxígeno
$\text{SO}_2$	dióxido de azufre
$(\text{N}_2)$ ,	nitrógeno
$(\text{N}_2\text{O})$	óxido de nitrógeno

## RESUMEN

En la fabricación de quesos frescos artesanales los productores utilizan leche cruda con una flora microbiana variada y elevada, en especial en bacterias coliformes. Este hecho implica un riesgo de inocuidad grave. Los artesanos intentan resolver este problema adicionando a la leche cruda nitrato como antimicrobiano; aunque los resultados de varios estudios reportan que el nitrato tiene efecto antimicrobiano solo en especies de *Clostridium*. La presencia de altas concentraciones de este aditivo puede poner en riesgo la salud del consumidor. El objetivo de esta investigación fue evaluar el posible efecto antimicrobiano que ejerce el nitrato sobre 7 grupos microbianos representativos presentes en la leche cruda.

Se evaluó el efecto de la adición de nitrato de potasio grado agrícola y grado alimenticio a leche cruda en dos concentraciones (15 y 80 g/100L de leche) sobre el crecimiento de coliformes totales y fecales, bacterias ácido lácticas (lactobacilos y estreptococos), mesófilos y psicrótrofos, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y hongos y levaduras, en tres tiempos (0, 1 y 5 h). También se evaluó la acción reductora y el efecto del nitrato sobre el crecimiento de bacterias representativas aisladas de leche cruda (lactobacilos y estreptococos, coliformes totales y *E. coli*) a 4 tiempos (0, 1, 3, y 5 h). La reducción de nitratos a nitritos se determinó mediante espectrofotometría.

Los resultados obtenidos indican que la adición de nitrato como antimicrobiano tiene efectos limitados sobre el crecimiento de las 7 especies microbianas estudiadas. En ningún caso se alcanzó una reducción de las poblaciones de al menos un ciclo logarítmico. El efecto global de la flora de la leche sobre la reducción de nitratos y por ende el aumento de nitritos, presentó una relación directamente proporcional en función de la calidad microbiológica de la leche: con una carga mesófila de 6.26 UFC/mL hubo un aumento de 2.9 ppm de  $\text{NO}_2^-$ , en tanto que una carga mesófila mayor de 8.35 UFC/mL permitió una mayor reducción de nitrato (245 ppm de  $\text{NO}_2^-$ ).

Se concluye que el empleo de nitrato de sodio (o potasio) en la elaboración de quesos frescos artesanales no tiene efecto sobre las bacterias presentes, por lo que el uso de este aditivo en quesos frescos no se justifica y su uso debe ser controlado. Se corroboran los reportes sobre el escaso efecto del nitrato como antimicrobiano sobre la mayoría de las especies microbianas presentes en leche y otros alimentos.



## INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos la inocuidad es una prioridad de salud pública y engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Estas acciones se refieren a políticas y actividades que persiguen dicho fin y abarcan toda la cadena alimenticia, desde la producción hasta el consumo (OMS, 2015) ya que los alimentos insalubres plantean amenazas de tipo físicos, químicos y biológicos contra la salud a escala mundial y ponen en peligro la vida de los consumidores.

Los quesos artesanales se elaboran principalmente con leche sin pasteurizar, en consecuencia, la población microbiana de la leche cruda utilizada en la elaboración de queso implica un grave riesgo de inocuidad. Entre los quesos más representativos elaborados con leche sin pasteurizar encontramos al Oaxaca, Adobero, Molido y Sierra (Villegas de Gante, 2004; Cervantes *et al.*, 2006). Los artesanos intentan resolver este problema adicionando a la leche nitrato como antimicrobiano. El nitrato inhibe la producción de gas (hidrógeno); y debido a este efecto los productores artesanales tienen la creencia de que inhibe la proliferación de microorganismos. Los nitratos y nitritos se utilizan como agentes de curado y antimicrobianos. Su propósito principal como agente antimicrobiano es inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la producción de la toxina botulínica en alimentos (Mani-López *et al.*, 2016). Los nitratos también pueden utilizarse en productos lácteos, como la leche y quesos semiduros en pequeñas dosis para evitar el hinchamiento (producción de gas) que podría producirse por fermentaciones secundarias por *Clostridium tirobutyricum* (Cubero *et al.*, 2002).

Aunque el nitrato y nitrito se emplean juntos como antimicrobianos, se sabe que la eficiencia se debe a los nitritos. Los nitratos son inertes por sí mismos y sólo actúan de “reserva” pues se convierten lentamente en nitritos por efecto de algunas bacterias presentes en la carne o quesos madurados (Barros, 2009). En la leche existe una flora microbiana muy variada (bacterias coliformes, enterobacterias patógenas, lactobacilos, estreptococos, estafilococos, bacterias mesófilas y psicrótrofas, mohos, levaduras, entre otros) y cada grupo microbiano tiene diferentes habilidades para transformar el nitrato en nitrito.

Estudios previos (Alva, 2014) han mostrado que la adición de nitrato a la leche destinada para la producción de queso hace descender la población coliforme de sólo un ciclo logarítmico, posteriormente estos microorganismos retoman su actividad y alcanzan poblaciones semejantes a las de un queso control.

Por otro lado, la NOM-121-SSA1-1994, acepta la adición de 15g/100L de nitrato sólo en quesos madurados. Los artesanos adicionan hasta 80 g/100L de leche. Los quesos artesanales son productos frescos con una población elevada de bacterias coliformes

y por su alto contenido de humedad se puede esperar que retengan una concentración elevada del nitrato, lo cual representa un doble riesgo de inocuidad para la población.

# I. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Queso: definición, orígenes y producción

La FAO define al queso como un producto fresco o madurado, sólido, semisólido o blando y que puede estar recubierto. Obtenido de la leche, de la leche entera o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con hidrólisis previa de la lactosa o sin ella, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche (Gil y Sánchez, 2010).

Existen muchas historias referentes a la primera vez que se elaboró el queso en el mundo. Una de ellas se sitúa al Sureste de Asia a principios de la revolución Neolítica (9000 a.C.). Los pastores colectaban y guardaban la leche en vasijas de cerámica, lo cual en un clima cálido producía una fermentación rápida y una coagulación espontánea generando la producción de ácido láctico mediante las bacterias presentes en la leche, que generaba la separación de la cuajada del lactosuero. No paso mucho tiempo antes de descubrir que este producto podía ser consumido; sin embargo, al ser un proceso no controlado formaba un producto con alto contenido de humedad, poco firme y por tanto se contaminada fácilmente.

Otra posibilidad sobre el descubrimiento de la coagulación de la leche es el mito frecuentemente citado sobre el viajero nómada que llenó su cantimplora, que consistían en una bolsa hecha de estómago de cabra u oveja (o de otro mamífero) con leche fresca al inicio de su viaje y cuando se detuvo a beber un poco notó que la leche estaba coagulada (Kindstedt, 2012).

Un hallazgo arqueológico en la zona próxima a Ur, una antigua ciudad al sur de Mesopotamia, llevada a cabo por Sir Leonard Woolley reveló en 1924 que el primer queso había sido hecho allí a partir de la leche tanto de vacas como de cabras (Woolley y Hall 1931; Robinson y Wilbey, 2002).

La fabricación del queso comenzó hace unos 8.000 años, ahora existen más de 1.000 variedades en todo el mundo (Sandine y Ellieker, 1970); cada uno es único con respecto a su sabor y forma. La fabricación de la mayoría de las variedades de queso implica la combinación de cuatro ingredientes: leche, cuajo, microorganismos y sal, que se procesan a través de un número de pasos comunes, tales como la formación del gel, la expulsión de suero de leche, la producción de ácido y adición de sal, seguido de un período de maduración (Beresford *et al.*, 2001).

Cerca de 700,000 toneladas de quesos elaborados con leche cruda son producidos anualmente en Europa, particularmente en Francia, Italia y Suiza y representan una

proporción significativa en la producción, (aproximadamente el 10% de la producción total en la Unión Europea y Suiza) (Grappin y Beuvier, 1997; Fox *et al.*, 2004). Debido a la producción a gran escala, el queso tiene gran importancia social y económica en varios países europeos (Fox *et al.*, 2004). Es por ello que el conocimiento sobre la calidad de la leche cruda es importante en la producción de quesos.

## **1.2 Quesos Mexicanos: Productos alimenticios artesanales**

Los quesos mexicanos tienen una fuerte raíz histórica nacional. Desde los tiempos de la Colonia se han venido elaborando, debido a que los conquistadores españoles trajeron los primeros rebaños de cabra, ovejas y ganado vacuno a la Nueva España. Actualmente el queso es muy utilizado en la gastronomía nacional. En México se elaboran cerca de 30 diferentes tipos de queso, la mayoría de forma artesanal. Por su tipo de pasta los quesos mexicanos pueden ser blandos (panela), semiduros (Chihuahua) y duros (Cotija), de pasta lavada (manchego) o de pasta hilada (Oaxaca y Asadero) (Villegas de Gante, 2004).

En México, la agroindustria quesera se caracteriza por ser el subsector de la agroindustria láctea con el mayor número de empresas. En Ocosingo, Chiapas, muchos de los queseros transforman la totalidad o parte de la leche que producen, en quesos. De la misma manera se han localizado ganaderos–queseros en cuencas de producción de lechería familiar o semi–tecnificada, esto desde las colonias menonitas en Chihuahua a Villaflores, Chiapas, pasando por Lagos de Moreno, Jalisco; Aculco, Estado de México; Tlaxco y Tetlatlahuca; Tlaxcala (Poméon y Cervantes, 2010).

La mayoría de las veces el producto de quesería artesanal se elabora con leche cruda (sin pasteurizar) y con procesos tradicionales. Generalmente, estos quesos son de circulación local o regional, tienen como nichos de mercado a consumidores de esos mismos espacios geográficos y, recientemente, una creciente población de clientes busca productos de calidad con evocación a tradicional y genuino, pero respetando las tradiciones locales y el medio ambiente (Villegas de Gante y Cervantes, 2011). Esta actividad es una estrategia factible para el desarrollo rural de las comunidades quienes llevan a cabo estas prácticas. Sin embargo, al tratarse de métodos artesanales en una etapa de la industrialización de leche y derivados lácteos, se advierten carencias como la insuficiente producción a precios competitivos, la insuficiente y deficiente operación de la red de frío, que incide en las mermas y calidad de los productos lácteos generando productos que no cumplen con la normatividad sanitaria.

Todo lo anterior les impide a los artesanos ser participantes en el mercado. Oficialmente existen en el Estado de México, alrededor de 1 500 queserías, que emplean cerca de 20 mil personas (Castro, 2001). Dentro de ellas se encuentran grandes empresas de la agroindustria láctea que también elaboran quesos, pero la gran mayoría son de imitación. Existen, incluso, empresas que sólo elaboran quesos

de imitación, por ejemplo: Chilchota Alimentos, S.A., Grupo Chen, Cuadritos, Schreiber, La Esmeralda, Kerry Ingredientes de México S.A., y Qualtia Alimentos (Poméon y Cervantes, 2010).

Por tal motivo la calidad de los quesos artesanales debe ser monitoreada, un caso particular es el Queso Oaxaca, que es elaborado en su mayoría a partir de leche cruda.

### **1.2.1 Queso Oaxaca**

Este tipo de queso también es conocido como quesillo, queso asadero y queso de hebra, es uno de los quesos que goza de la preferencia de los consumidores en México. Se elabora en varios estados de la Republica, tanto en el centro como en el sureste. Este queso puede clasificarse como fresco, de pasta blanda o hilada. Se presenta típicamente en forma de bolas o madejas de diferentes tamaños y pesos (Villegas de Gante, 2004).

La norma correspondiente define al queso Oaxaca como:

“Producto elaborado a partir de la cuajada proveniente de leche fresca o en polvo, entera o parcialmente descremada, sometida a tratamiento térmico que asegure su inocuidad, a la cual se le puede adicionar cloruro de calcio, cuajo, cultivos lácticos y/o ácido. La cuajada obtenida es fundida con agua caliente o calor indirecto y en su proceso la proteína es texturizada en forma de hilo o hebra, y es colocada en agua o salmuera frías, para ser posteriormente enredados los hilos o hebras en diversas formas. Es un queso fresco, que se consume preferentemente en los primeros 20 días a partir de su fecha de elaboración y requiere refrigeración para su conservación; de pasta blanda y fundible, cuya característica principal del hilo o hebra es la formación de filamentos que se deshilan o deshebran. El producto no puede contener grasa y proteínas de origen diferente al de la leche, ni almidones, ni féculas” (PROY-NMX-F-733-COFOCALEC-2012)

Para su fabricación, la leche utilizada es sometida a una acidificación donde las bacterias lácticas presentes llevan a cabo la degradación de la lactosa produciendo ácido láctico y en menor cantidad ácido acético, para alcanzar un pH de 5.3 a 5.2. Luego, la cuajada ácida se amasa y se le da forma. Esta acción da lugar a que el producto se convierta en un vehículo importante para el desarrollo de microorganismos indeseables y microflora natural de la leche (SAGARPA, 2011).

De acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010 en el queso fresco Oaxaca no deben exceder los límites de microorganismos señalados a continuación:

**Cuadro 1.** Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos

Microorganismo	Límite máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 UFC/g o mL
<i>Salmonella</i>	Ausente en 25 g o mL
<i>Escherichia Coli</i>	100 UFC/g o mL
<i>Listeria Monocytogenes</i>	Ausente en 25 g o mL
<i>Vibrio Cholerae</i>	Ausente en 25 g o MI
Enterotoxina estafilococica	Negativa
Toxina botulínica	Negativa
Mohos y levaduras	500 UFC/g o MI
Mesófilicos aerobios	-----
Coliformes totales	-----
Coliformes fecales	NMP/g 100 50

Fuente: NOM-243-SSA1-2010

### 1.3 Leche como materia prima

La leche se define como una secreción láctea, sin calostro, obtenida por el ordeño higiénico del líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos (Revilla, 1982); es blanca y opaca, posee un sabor dulce y un pH cercano a 7 (Hernández *et al.*, 2003). Está compuesta por agua, grasa y sólidos no grasos. Dicha secreción láctea debe tener no menos de 3.25% de grasa y no menos de 8.25% de sólidos no grasos de leche (Revilla, 1982). Los sólidos no grasos comprenden las proteínas, la lactosa y las cenizas, mientras que los sólidos totales (ST) incluyen el contenido de los sólidos no grasos y de la grasa (Hernández *et al.*, 2003). Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y es fuente de calcio y fósforo. La leche, contribuye significativamente en el aporte de los requerimientos de riboflavina (vitamina B2), vitamina A y B1 (tiamina) (Veisseyre, 1988). La composición de la leche no es estable a lo largo de la lactancia y puede verse afectada por factores internos y externos del animal, afectando en gran medida la calidad del producto (Agudelo y Bedoya, 2005).

La calidad de la leche es importante en la producción de todos los quesos, pero particularmente para los quesos hechos con leche cruda. La presencia de células somáticas (CS) en la leche cruda es el principal indicador de la salud de la ubre de la vaca. El valor normal en un animal sano oscila alrededor de 200 000 CS/mL y conteos superiores a 400 000 CS/mL indican problemas de mastitis en las vacas (Celis y Juarez, 2009); por lo tanto, cuando estos números incrementan, existe un mayor riesgo de la contaminación de leche y de obtener quesos de calidad microbiológica deficiente.

La implementación de las buenas prácticas pecuarias (BPP) en el establo lechero, tienen como objetivo primordial prevenir la contaminación de los alimentos destinados

al consumo humano y son usadas como una herramienta de apoyo para prevenir problemas de inocuidad y calidad en los alimentos; así mismo, constituye un soporte para implementar un plan de seguridad (HACCP) (Figueroa *et al.*, 2016). Las BPP contribuyen en la entrega un producto seguro, ya que, por su composición, la leche es muy susceptible de sufrir alteraciones debidas al crecimiento microbiano particularmente cuando la temperatura de conservación no es la adecuada o no se cuenta con los medios para su enfriamiento inmediato una vez obtenida. Estos cambios ponen en riesgo el cumplimiento del requisito de calidad para ser considerada como leche apta para consumo humano (Celis y Juarez, 2009). En general, cuando las cuentas de bacterias y las células somáticas son altas, podría existir un impacto negativo sobre la calidad del queso, pues puede reducir la aceptabilidad por el consumidor y el rendimiento del queso.

En el caso del queso artesanal, el tiempo de ordeño es muy corto y en algunos casos la leche se utiliza inmediatamente para hacer el queso en la granja sin enfriamiento. La reducción del tiempo de recolección de leche para queso disminuye también la oportunidad para el crecimiento de bacterias indeseables en la leche cruda. Por el contrario, cuando la leche es sometida a enfriamiento y retenida en transporte, la oportunidad para el crecimiento de patógenos, particularmente el crecimiento de psicrótrofos se aumenta (Fox *et al.*, 2004).

#### **1.4 Flora microbiana en leche destinada para queso**

La leche de bovino es altamente nutritiva, contiene lípidos, proteínas (caseína, suero), carbohidratos (lactosa), aminoácidos, vitaminas y minerales (calcio), esenciales para las necesidades nutricionales del ternero en crecimiento (Haug y Harstad, 2007). Sin embargo, debido a sus propiedades nutricionales, su alto contenido de agua y su pH cercano al neutro (Frank, 1997) puede soportar una rica carga microbiana. Estos microorganismos llegan a la leche de una variedad de fuentes de contaminación y, una vez en la leche, pueden desempeñar una serie de funciones, tales como facilitar las fermentaciones de los productos lácteos (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y las poblaciones de hongos), causar deterioro (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*) o promover la salud (lactobacilos y bifidobacterias) (Quigley *et al.*, 2013). Sin embargo, la leche es también una buena matriz de crecimiento para una variedad de microorganismos deterioradores y potencialmente patógenos (Hill *et al.*, 2012) por ejemplo, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* y hongos productores de micotoxinas. Por ello, es de importancia fundamental determinar la calidad higiénica y sanitaria de la leche y sus derivados, entre ellos el queso, por ser uno de los productos de mayor consumo (Castro *et al.*, 2013). En estudios comparando el queso hecho con leche cruda y el queso con leche pasteurizada, los quesos de leche cruda son caracterizados por una rica microflora natural, muy variable. Esta diversidad



microbiológica no ha sido encontrada en quesos elaborados con leche pasteurizada (Grappin y Beuvier, 1997; Fox *et al.*, 2004).

#### 1.4.1 Bacterias lácticas

Las bacterias de ácido láctico (BAL) se definen históricamente como un grupo microaerófilo, Gram-positivos que fermentan los azúcares de hexosa para producir principalmente ácido láctico. Esta clasificación funcional incluye una variedad de géneros industrialmente importantes, incluyendo especies de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, entre otras (Makarova *et al.*, 2006).

El metabolismo aparentemente simplista de las BAL se ha explotado a través de la historia para la conservación de alimentos y bebidas en casi todas las sociedades que datan de los orígenes de la agricultura. La domesticación de las cepas de BAL transmitidas a través de diversas tradiciones culinarias y el paso continuo en los alimentos han dado como resultado cultivos modernos capaces de llevar a cabo estas fermentaciones en condiciones controladas (Makarova *et al.*, 2006).

Existen varios estudios que han determinado el comportamiento de la flora láctica en leche cruda. Las BAL son muy conocidas por su uso como cultivos en la fabricación de productos lácteos como la leche ácida, el Yogur, el suero de leche, el requesón, los quesos duros (Cheddar, Provolone, Romano y Edam) y quesos blandos (Brie y Camembert) (Jay, 1986). Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, aeróbios, microaerófilos, o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002; Salminen, 2004).

La flora láctica constituye una considerable parte de flora total de leche cruda. De manera general una de las clasificaciones propias de las BAL en géneros diferentes, es basada en principio en la morfología y en el modo de fermentación de la glucosa (Homofermentativas y Heterofermentativas). En este tipo de microorganismos destacan los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ramírez *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que los quesos elaborados con leche cruda tienen una gran diversidad de microflora a nivel de género y de especies dentro del mismo género (Estepar *et al.*, 1999; Hatzikamari *et al.*, 1999; Mannu *et al.*, 2000; Callon *et al.*, 2001; Prodromou *et al.*, 2001; García *et al.*, 2002; Fortina *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2004). Se ha encontrado un gran de diversidad de lactobacilos en queso comercial italiano

producido con leche cruda (Angelis *et al.*, 2001), también en queso Pecorino Sardo, en queso Mozzarella, Camembert, y otro tipo de especies de lactobacilos en queso Avenat y Piemontese (Fox *et al.*, 2004).

Por lo tanto, se concluye que el uso de leche cruda para la producción de queso de granja permite la preservación de su microbiota silvestre y consecuentemente la diversidad natural microbiológica de *Lactobacillus* en queso (Fox *et al.*, 2004).

#### **1.4.1.2 Streptococcus**

El término *Streptococcus* fue empleado por primera vez por Billroth (1874) para designar a las bacterias que formaban cadenas que habían sido observadas en las heridas y en las secreciones de los animales. Consta de 97 especies y 17 subespecies. Aunque muchos géneros de estreptococos son patógenos, *S. thermophilus* es un microorganismo "GRAS" (Facklam, 2002) y se aísla con frecuencia de ambientes lácteos, incluyendo leche cruda, cultivos naturales de arranque y cuajadas de queso (Duthoit *et al.*, 2005; Randazzo *et al.*, 2006; Santarelli *et al.*, 2008; Quigley *et al.*, 2013).

Los *Streptococcus* son células bacterianas microscópicamente cocoides y se mantienen púrpura (Gram-positivo) cuando se aplica la técnica de tinción de Gram. No son motrices y no forman esporas. Los cocos miden entre 0,5 y 2 µm de diámetro. La división celular de *Streptococcus spp. occurs* es a lo largo de un solo eje o plano, estas bacterias crecen en parejas o cadenas. Después de 18-24 h de incubación a 35 - 37°C en agar de sangre, aparecen colonias típicas blancas grisáceas, lisas, brillantes. Las cepas de *Streptococcus* son anaerobios facultativos, pero la actividad hemolítica de estas bacterias aumenta en el ambiente anaeróbico. La hemólisis producida por muchas especies de *Streptococcus* se caracteriza por una disminución parcial de los glóbulos rojos en el medio, y se ve como una zona verde que rodea a la colonia resultante de la pigmentación de la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos. Son catalasa, oxidasa y nitrato negativas. Estas bacterias dependen en gran medida de la glucólisis para la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP). Su metabolismo es fermentativo, produciendo principalmente ácido láctico, etanol y acetato a partir de carbohidratos sin la producción de gas (Motarjemi *et al.*, 2014).

*Streptococcus thermophilus* es una BAL termofílica ampliamente utilizada como un cultivo de arranque en la fabricación de productos lácteos. A menudo se considera como el segundo más importante en la industria láctea después de *Lactococcus lactis*. Su importancia en los productos lácteos se debe a su capacidad para convertir rápidamente la lactosa en lactato; provocando una rápida disminución del pH; así como la producción de importantes metabolitos que incluyen bajos niveles de formiato, acetoína, diacetilo, acetaldehído y acetato (Ott *et al.*, 2000).

El género *Streptococcus* contiene una amplia variedad de especies homofermentativas con hábitats muy diversos y con actividades de mucha importancia para el ser humano. Algunas especies son patógenas primarias de mamíferos. Como productores de ácido láctico juegan un papel muy importante en la producción de leches fermentadas, ensilado y una pléyade de productos de fermentación (Madigan *et al.*, 2004).

#### **1.4.1.3 *Lactobacillus***

Los miembros del género *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas que no generan esporas, en su mayoría no móviles y generalmente en forma de varilla, aunque se pueden observar cocobacilos, las células se organizan a menudo en cadenas (Holzapfel y Wood, 2014) además de ser catalasa y oxidasa negativas. Son estrictamente fermentativos, aerotolerantes o anaeróbicos y acidúricos o acidófilos, y suelen tener complejas necesidades nutricionales. Su metabolismo de carbohidratos puede ser homofermentativo, produciendo principalmente ácido láctico, o heterofermentativo, produciendo una mezcla de ácidos láctico y acético y dióxido de carbono, algunas especies producen bacteriocinas que tienen un efecto antagónico sobre otras bacterias. Son capaces de crecer en una amplia gama de temperaturas y pueden tolerar los entornos aparentemente adversos (Wareing *et al.*, 2010). La temperatura óptima de crecimiento se encuentra principalmente entre 30 y 40°C, aunque la temperatura de crecimiento global puede oscilar entre 2 y 53°C. El intervalo de pH para el crecimiento está entre 3 y 8 (Holzapfel y Wood, 2014).

Los lactobacilos son fermentativos, aunque el análisis secuencial del genoma completo para *Lb. plantarum* WCFS1 (Brooijmans *et al.*, 2009), indicó el potencial para la respiración. Generalmente toleran el oxígeno, pero crecen bien bajo condiciones anaerobias.

La mayoría de *Lactobacillus spp.* importantes en los alimentos provienen probablemente de material vegetal. Por lo general, se asocian con ambientes que contienen grandes cantidades de carbohidratos fermentables. Algunas especies verdaderamente anaerobias están asociadas con las membranas mucosas y los tractos digestivos de los animales, pero raramente se encuentran en los alimentos. (Wareing *et al.*, 2010). Este género pertenece a un extenso grupo de bacterias ácido-lácticas y es bien sabido que este tipo de bacterias son cultivos comerciales que imparten ciertas características y cualidades a diferentes productos lácteos como alimentos fermentados que actualmente se consumen, entre los que se incluyen el Yogur, quesos, embutidos crudos curados, encurtidos y otros (Kosokowki, 1982).

En 1919 el género fue reorganizado por Orla-Jensen y se han dividido en varios grupos en función de las diferencias de temperatura de crecimiento óptima, las actividades de catalasa y de reducción de nitrito y fermentación de hexosas. Desde entonces, las

características metabólicas de los lactobacilos fueron utilizadas como distintivas y los términos de especies homofermentativas estrictas, heterofermentativas facultativas, heterofermentativas estrictas (Jay, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997; Sonomoto y Yokota, 2011) se introdujeron para distinguir los miembros del grupo (Sonomoto y Yokota, 2011; Stiles y Holzapfel, 1997).

**Cuadro 2.** Lactobacillus homo- y heterofermentativos

Homofermentativos		Heterofermentativos	
Organismos	Configuración del lactato	Organismos	Configuración del lactato
<b>Lactobacillus</b>			
<i>L. acidophilus</i>	DL	<i>L. brevis</i>	DL
<i>L. alimentarius</i>	L(D)	<i>L. buchneri</i>	DL
<i>L. bulgaricus</i>	D(-)	<i>L. cellobiosus</i>	DL
<i>L. casei</i>	D(+)	<i>L. coprophilus</i>	DL
<i>L. coryniformis</i>	DL	<i>L. fermentum</i>	DL
<i>L. curvatus</i>	DL	<i>L. hilgardii</i>	DL
<i>L. delbrueckii</i>	D(-)	<i>L. sanfrancisco</i>	DL
<i>L. helveticus</i>	DL	<i>L. trichoides</i>	DL
<i>L. jugurti</i>	DL	<i>L. fructivorans</i>	DL
<i>L. jensenii</i>	D(-)	<i>L. pontis</i>	DL
<i>L. lactis</i>	D(-)		
<i>L. leichmannii</i>	D(-)		
<i>L. plantarum</i>	DL		
<i>L. salivarius</i>	L(+)		

Nota: DL= 25%-75% del ácido láctico es de la configuración L; D o L = el isómero registrado constituye hasta el 90% o más del ácido láctico; D (L); L (D)= isómero entre paréntesis representa hasta el 15-20% del ácido láctico total. \*D(+)= Dextrógiro \*L(-)=Levógiro. Fuente: Jay, 2000.

#### 1.4.1.4 Bacterias lácticas presentes en leche cruda y quesos

Todos los quesos contienen lactobacilos, entre los más frecuentes son los *Lactobacillus casei* y *L. plantarum* y también *L. thermophilus*, que se utilizan como fermento en los quesos cocidos, además de su actividad acidificante, los lactobacilos son proteolíticos y desempeñan un importante papel en la maduración de muchos quesos (Amiot, 1991).

En quesos de leche pasteurizada se agregan como cultivos, pero en quesos de leche cruda la acidificación ocurre a partir de las BAL presentes en la leche. En quesos de leche pasteurizada, además de las BAL utilizadas como cultivos, crecen otras BAL, generalmente de las especies *Lactobacillus* y *Pediococcus*, pudiendo llegar a valores de Log 6 UFC/g. Su presencia parece contribuir al aroma de los quesos (Palacios, 2006).

La presencia de *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* se comprobó gracias a los resultados obtenidos de la investigación de Larios (2007) en quesos tipo Oaxaca mediante la técnica de Ribotipado.

En un estudio realizado en la región de Normandía, se analizaron muestras de leche cruda de 27 granjas por cerca de 6 meses y en el caso de las bacterias ácido lácticas hubo presencia en todas las muestras; éstas fueron el segundo grupo microbiano más importante. Los *Lactococcus* fueron predominantes en la mayoría de las muestras. Los lactobacilos eran de menor importancia con conteos que oscilaban entre  $<10$  mL y  $1.6 \times 10^4$  /mL. Se detectó *Leuconostoc* productores de dextrano en pocas muestras, 63 muestras tenían una cuenta  $<100$ /mL (Desmaures *et al.*, 1997).

Los conteos ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) microbianos según Castro *et al.* (2013) indican la prevalencia de la flora láctica en queso Oaxaca después de la cuajada, en el producto final con una media de  $9,8 \pm 0,8$ , mientras que Palacios (2006) reportó  $6,52 \pm 0,58$ .

La flora dominante durante la fabricación de queso y en los primeros momentos de la maduración son los estreptococos productores de ácido láctico, (*Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*) (Amiot, 1991). La presencia de *Streptococcus equinus* (23 cepas), *Enterococcus durans* (11), *Enterococcus faecium* (5), *Enterococcus gallinarum* (2) y *Streptococcus mitis* (1) fue identificada mediante la utilización del sistema Vitek en un estudio de queso tipo Oaxaca (Larios, 2007).

## **1.4.2 Bacterias Mesófilas y Psicrótrofas**

### **1.4.2.1 Bacterias mesófilas**

La mayor proporción de la flora bacteriana presente en leche cruda, son microorganismos mesófilos, es por ello que la inmediata refrigeración a temperaturas de 4°C a 5°C es fundamental para asegurar la calidad de la leche. Pero su almacenamiento no debe ser prolongado (máximo 24 horas) ya que entonces se favorecería el aumento en número de la flora psicrótrofa. Cuando la leche no vaya a ser procesada el mismo día de recepción, debe ser sometida a un proceso térmico (Heer, 2007).

Los microorganismos mesófilos son uno de los indicadores más generales de la calidad de los alimentos, que indica la adecuación de control de la temperatura y saneamiento durante el procesamiento, el transporte y el almacenamiento, revelando las fuentes de contaminación durante la fabricación (Spencer y Ragout, 2001).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Tienen un valor

limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento este exento de patógenos o de sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena. Exceptuando productos que se elaboran por fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos.

Una alta carga microbiana puede significar:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, por tratarse de microorganismos mesófilos de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que esta flora suele ser mesófila.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración de los productos. Tasas superiores a  $10^6$ - $10^7$  gérmenes por gramo suelen ser ya inicio de descomposición.

En general el recuento de la flora aerobia mesófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos (Pascual y Calderón, 1999). En microbiología alimentaria, mesófilos y psicrótrofos son generalmente de gran importancia. Los mesófilos tienen una temperatura optima cercana a los 37°C, son frecuentemente de origen animal o humano e incluye muchos de los patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* (Adams *et al.*, 2015).

La mayoría de las especies microbianas conocidas por el hombre son mesófilas, incluyen todas las bacterias resistentes en el cuerpo humano (*E. coli*), la mayoría de los microorganismos esporogenos y de los microorganismos causantes de enfermedades (Geeta y Mehrotra, 2009), así también la mayoría de la flora que se encuentra con mayor frecuencia en la leche, y principalmente las bacterias lácticas son mesófilas (Heer, 2007).

La habilidad de los mesófilos para sobrevivir a temperaturas frías o calientes ha sido relacionada con la composición de ácidos grasos en la membrana celular. Se observa que los ácidos grasos cambian en la membrana celular, alteran la viscosidad, la cual a su vez afecta el transporte de nutrientes y por último el crecimiento (Geeta y Mehrotra, 2009).

#### **1.4.2.2 Bacterias psicrótrofas**

En microbiología alimentaria el término psicrófilos o psicrótrofos es usado para identificar a los microorganismos que pueden crecer en alimentos almacenados a

bajas temperaturas de enfriamiento o refrigeración con un intervalo entre los  $-1^{\circ}\text{C}$  y  $7^{\circ}\text{C}$  (Ray y Bhunia, 2013). En la mayoría de los casos los microorganismos psicrótrofos presentan un desarrollo rápido teniendo un tiempo de generación a  $4^{\circ}\text{C}$  de 6 a 8 horas, pudiendo de esta manera multiplicar su población diez veces, en término de 24 horas (Román *et al.*, 2003), sin embargo, ciertos microorganismos mesófilos son también psicrótrofos ya que pueden crecer a menores temperaturas, aunque no sea su temperatura óptima. Estos microorganismos son los principales agentes de deterioro de la leche refrigerada y sus derivados, debido a su capacidad para producir enzimas exocelulares termorresistentes (Gutiérrez, 2006).

Los psicrótrofos incluyen bacterias Gram- negativas, Gram- positivas aeróbicas, anaeróbicas y facultativamente anaeróbicas, móviles y no móviles, formadoras o no de esporas, cocos y bacilos, así como muchas levaduras y mohos (Ray y Bhunia, 2013). Entre las bacterias psicrotróficas Gram negativas cultivables en la leche, están representadas predominantemente por *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* y *Flavobacterium spp.*, y en números mucho más bajos por géneros Gram-positivos incluyendo *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Microbacterium spp.* (Deoliveira *et al.*, 2015).

Los psicrótrofos más comunes en leche cruda son *Pseudomonas spp.* *Pseudomonas fluorescences* es la más predominante; otras especies incluyen *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas Aeruginosa* (Robinson, 2002), que son responsables del deterioro de la leche y los productos lácteos debido a su capacidad para producir enzimas proteolíticas y lipolíticas resistentes al calor y a temperaturas frías (Gilmour y Rowe, 1990), aunque en la leche cruda puede haber varios representantes de otros géneros como *Flavobacterium*, *Acinobacter- Moraxella*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Aeromonas*, *Klebsiella* y grupos de coliformes (Robinson, 2002).

Aunque las bacterias psicrotróficas no pueden resistir el calentamiento, sus enzimas pueden soportar tratamientos térmicos de pasteurización y tratamientos de temperatura ultra alta (UHT) (Griffiths *et al.*, 1981; Cousin, 1982; López-Fandino *et al.*, 1993; Koka y Weimer, 2001; Ercolini, 2009).

#### **1.4.2.3 Bacterias mesófilas y Psicrótrofas presentes en leche cruda y quesos**

Según Palacios (2006), la incidencia de flora aerobia mesófila viable en queso tipo Oaxaca fue de  $7,63 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$  ( $\pm 0,76$ ). En un estudio realizado en leche cruda la cuenta de las bacterias mesófilas aeróbicas totales osciló entre  $5.0 \times 10^3$  y  $6.0 \times 10^5$  UFC/mL (Ercolini, 2009).

En cuanto a los psicrótrofos, la presencia de éstos en queso tipo Oaxaca fue de  $6,78 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g} \pm 0.91$  (Palacios, 2006). En un estudio realizado en leche cruda la cuenta de las bacterias psicrótrofas se encontró entre  $1.2 \times 10^3$  y  $1.6 \times 10^5$  UFC/mL. Los recuentos de agar, la población de *Pseudomonas* varió entre  $5,4 \times 10^2$  y  $4,4 \times 10^5$  UFC/mL, mientras que *Enterobacteriaceae* mostró conteos que oscilaron entre  $3,0 \times 10^2$  y  $6,1 \times 10^3$  UFC/mL en todas las muestras. Los recuentos de mesófilos nunca sobrepasaron  $10^5$  UFC/ml, excepto para dos muestras, lo que sugiere que la calidad general de la leche fue buena (Barbano *et al.*, 2006). Particularmente, en una de las muestras los recuentos de bacterias mesofílicas aerobias tanto a  $30^\circ\text{C}$  como a  $7^\circ\text{C}$  coincidieron con las cargas contadas en el agar de pseudomonas indicando que *Pseudomonas spp* es uno de los principales contaminantes de la leche cruda (Cousin, 1982; Ercolini, 2009).

Los géneros predominantes de bacterias psicrótrofas encontradas en leche cruda (Vithanagea *et al.*, 2016) fueron: *Pseudomonas* (19,9%), *Bacillus* (13,3%), *Microbacterium* (5,3%), *Lactococcus* (8,6%), *Acinetobacter* (4,9%) y *Hafnia* (2,8%). Entre los miembros del género *Pseudomonas*, pseudomonas fluorescentes (*P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. poae*, *P. proteolytica*, *P. brennerii* y *P.s veronii*) y pseudomonas no fluorescentes (*P. fragi*, *P. lundensis*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. psychrophila* y *P. syringae*) se aislaron con frecuencia a partir de leche cruda. Además de pseudomonas, una proporción relativamente grande de *Acinetobacter spp.* (*A. johnsonii*, *A. iwoffii*, *A. baumannii* y *A. guillouiae*) fueron detectados con variadas proporciones. Entre los aislados entéricos, *Hafnia alvei*, *H. paralvei*, *Serratia liquefaciens*, *S. marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* fueron las especies más detectadas. Cuatro bacterias pertenecientes a la clase *Actinobacteria* fueron a menudo aisladas de leche cruda; que incluyen *Microbacterium oxydans*, *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium maritopicum*, *Micrococcus spp.*, *Arthrobacter spp.* y *Rhodococcus spp.*

### 1.4.3 Mohos y Levaduras

Los mohos y las levaduras pueden afectar a una amplia gama de productos que tienen un pH bajo o una alta actividad acuosa (aw). El deterioro causado por los mohos y las levaduras se manifiesta a menudo por su crecimiento visible en la superficie de alimentos como el queso y la carne, así como por la fermentación de los productos líquidos y semilíquidos. Los hongos frecuentemente vinculados al deterioro de alimentos y bebidas, y principalmente frutas y productos a base de frutas, incluyen especies de *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Las levaduras también pueden contribuir a la descomposición de alimentos de origen animal, como la carne y los productos lácteos, aunque en menor medida comparados con las bacterias (Subramaniam, 2016).



### **1.4.3.1 Mohos**

Los mohos son heterotróficos y se alimentan por absorción de nutrientes solubles, aunque muchos hongos pueden metabolizar materiales insolubles complejos, tales como lignocelulosa. Estos materiales tienen que degradarse mediante la secreción de enzimas apropiadas fuera de la pared. Algunos mohos son capaces de producir metabolitos tóxicos, conocidos como micotoxinas (Adams y Moss, 2008).

Están constituidos por filamentos tubulares microscópicos que se ramifican y entrecruzan. Cada filamento se denomina hifa, y un conjunto de hifas forman lo que se conoce como micelio. Las hifas de la mayoría de los hongos miden entre 5 y 10 micrómetros de diámetro y su longitud no es fija (García, 2004). Otras características de los mohos son su capacidad de sintetizar la lisina por la vía de biosíntesis del ácido L- $\alpha$ -adípico y poseer una pared celular de quitinosa y los microtúbulos formados por tubulina (McGinnis y Tyring, 1996).

Los hongos pueden clasificarse en dos grupos según la estructura de sus hifas: los septados, cuyas hifas poseen tabiques transversales que se dividen en varias celdillas y los no septados, en los que las hifas carecen de tabiques transversales. Las hifas no separadas poseen núcleos diseminados en toda su longitud. Las septadas pueden poseer uno o más núcleos en cada celdilla, pero existe un poro central en cada septo que permite que el citoplasma y núcleos pasen de un compartimiento o a otro (García, 2004).

Algunos mohos producen las células en forma de sacos especiales llamados esporangios (McGinnis y Tyring, 1996), haciendo esporas, pequeñas y ligeras, capaces de viajar por el aire, de resistir condiciones ambientales secas, adversas y capaces de vivir mucho tiempo. Algunos microorganismos, incluyendo mohos, también producen compuestos orgánicos volátiles (VOCs) o microbianos (mVOCs). Los mohos también contienen sustancias conocidas como beta glucano. Los mVOCs y beta glucanos son útiles como marcadores de exposición de los mohos (Friis, 2012).

Con frecuencia los mohos atacan a los alimentos, de hecho, algunos de los cambios provocados por el crecimiento de ciertos hongos en un alimento pueden ser organolépticamente deseables conduciendo a la fabricación de productos tales como quesos madurados en moho y salchichas maduradas mediante el uso de especies de *Penicillium* (Adams y Moss, 2008).

### **1.4.3.2 Levaduras**

Las levaduras son hongos verdaderos que han adoptado una morfología esencialmente unicelular, se reproduce asexualmente por germinación o, en el caso de *Schizosaccharomyces*, por fusión. Algunas, además de su forma unicelular o de levadura, pueden presentar micelio (García, 2004). La pared celular de las levaduras

es de 200 a 600nm de espesor con tres capas. La superficie interior es quitinosa, que contiene algo de  $\alpha$ -glucano, y la capa exterior contiene  $\alpha$ -glucano (McGinnis y Tyring, 1996). Las células de levaduras son relativamente grandes, su tamaño varía entre los 1-5 $\mu$ m de largo, aunque la mayoría oscila entre los 3 y 8 $\mu$ m de diámetro. Una levadura típica tiene forma ovoide pero también las hay alargadas, esféricas, de forma de pera, incluso triangulares (García, 2004). Su hábitat natural es frecuentemente en ambientes nutricionalmente ricos como los nectarios de plantas, exudados vegetales, frutos en descomposición y los fluidos corporales de animales.

Las levaduras muestran frecuentemente complejos requerimientos nutricionales con respecto a vitaminas y aminoácidos. Los azúcares constituyen el mejor alimento energético de las levaduras, muchas pueden catabolizar la glucosa de forma aerobia (fermentación alcohólica) o anaerobia (fermentación alcohólica) la cual da como resultado etanol y dióxido de carbono. Las levaduras pueden obtener nitrógeno para la síntesis de proteínas tanto de sustancias orgánicas como inorgánicas y pueden utilizar el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (García, 2004).

Un estudio taxonómico importante de las levaduras por Kreger-van Rij (1984) describe alrededor de 500 especies divididas en 60 géneros de los cuales 33 se consideran *Ascomycetes*, 10 *Basidiomycetes* y 17 *Deuteromycetes*. Un número de levaduras, aunque ciertamente no todos son capaces de crecer anaeróbicamente con un metabolismo fermentativo para generar energía (Adams y Moss, 2008). La morfología se utiliza principalmente para distinguir las levaduras a nivel de género, mientras que la capacidad de asimilar y fermentar diferentes fuentes de carbono y de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno se utiliza en conjunción para identificar las especies (McGinnis y Tyring, 1996).

En vista de la gran diversidad de taxones y del carácter frecuentemente ambiguo de su taxonomía, la identificación correcta de las especies de levadura es a menudo un desafío. Sin embargo, las especies de levadura que se han asociado principalmente con el deterioro de productos con bajo pH o un alto contenido de azúcar o sal (por ejemplo, bajo aw), tales como refrescos, jarabes, salsas, aderezos para ensaladas y vinos, son miembros de los géneros *Candida*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* (Subramaniam, 2016).

#### **1.4.3.3 Mohos y Levaduras presentes en leche y queso**

La flora del queso incluye también levaduras, que se desarrollan principalmente en la superficie de las pastas blandas (Amiot, 1991). En los conteos más elevados según el estudio de Castro *et al.* (2013) se encontró en el queso Oaxaca como producto terminado  $9,9 \pm 0,9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$  de mohos y levaduras. Este resultado llama la atención ya que según otros autores la prevalencia de levaduras es más común en quesos

madurados, sin embargo, este comportamiento se atribuye a otros aspectos como el ambiente y el proceso de elaboración.

Palacios (2006) reportó en queso Oaxaca  $4,82 \pm 5,52 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ . En el estudio realizado por Desmaures *et al.* (1997) las levaduras y los mohos estaban presentes en todas las muestras, en leche cruda el 75% tenía conteos de levadura de 100 UFC/mL y el 94% tenía un recuento de mohos  $< 100/\text{mL}$ . Se encontró *Geotrichum candidum* ( $> 1/\text{mL}$ ) en sólo 27 muestras (39%), pero sólo cuatro suministros tuvieron recuentos de  $10/\text{mL}$ .

Las levaduras y los mohos son responsables de la descomposición de muchos de los productos lácteos, dando como resultado un importante desperdicio de alimentos y pérdidas económicas. Hay pocos estudios sobre la diversidad de hongos de deterioro encontrados en los productos lácteos (Garnier *et al.*, 2017). Se ha puesto mucho más énfasis en las levaduras que en la diversidad de mohos. Según la literatura, los principales géneros implicados en el deterioro de los productos lácteos son *Candida*, *Galactomyces* y *Yarrowia*, y *Penicillium*, *Mucor* y *Cladosporium* para levaduras y mohos, respectivamente (Deak, 2008; Pitt y Hocking, 2009). Estos microorganismos proceden principalmente del medio ambiente lácteo, incluyendo el aire, las superficies, el equipo y el personal, así como las materias primas y los ingredientes (Kure *et al.*, 2004; Vacheyrou *et al.*, 2011; Garnier *et al.*, 2017).

El deterioro fúngico puede ser visible debido principalmente al crecimiento del organismo (colonia o talo), como los defectos de "piel de sapo" o "pelo de gato" causados por *Galactomyces*, *Geotrichum* y *Mucor spp.*, respectivamente, o no visibles, a través del metabolismo fúngico, que da como resultado en la producción de olores no deseados y, producción de gas o alteración de textura (Ledenbach y Marshall, 2010). Aunque las levaduras de descomposición nunca han estado implicadas en brotes de alimentos, algunas especies se consideran patógenos oportunistas y pueden representar un riesgo para las personas inmunocomprometidas (Jacques y Casaregola, 2008). Además, varias especies de descomposición de moho, como *Aspergillus* y *Penicillium spp.* son capaces de producir micotoxinas que también pueden ser tóxicas para los seres humanos (Filténborg *et al.*, 1996; Huis in't Veld, 1996; Westall y Filténborg, 1998). Sin embargo, vale la pena mencionar que hasta la fecha no se han documentado casos de intoxicación alimentaria relacionados con el consumo de productos lácteos contaminados con micotoxinas (Hymery *et al.*, 2014; Garnier *et al.*, 2017).

#### **1.4.4 Bacterias patógenas**

Un grupo importante de bacterias patógenas se puede definir como un grupo de eubacterias Gram negativas no fotosintéticas. Sus células son pequeñas, de forma bacilar, recta o curva, con una anchura que no excede de  $0,5 \mu\text{m}$ . Algunos son

inmóviles de forma permanente, otros se mueven mediante flagelos peritricos, polares o tienen flagelación mixta. Estas bacterias se pueden distinguir del resto de las Eubacterias Gram negativas de estructura similar por la propiedad de anaerobiosis facultativa. En condiciones anaeróbicas obtienen energía por fermentación de carbohidratos, mientras que en condiciones aeróbicas pueden utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como sustratos para la respiración. El representante clásico de este grupo es *Escherichia Coli*, le siguen *Shigella* y *Salmonella*; también con una ecología diferente pero perteneciente al mismo grupo están los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* y *Ewinia* (Stainer *et al.*, 1996).

La leche cruda ha sido un vehículo conocido para patógenos durante más de 100 años (Potter *et al.*, 1984; Prevention, 1999; Gillespie *et al.*, 2003; Jayarao *et al.*, 2006). Existe una creciente demanda por la industria lechera de leche cruda de alta calidad, libre de microorganismos patógenos, particularmente cuando se utiliza para hacer queso. Mejoras de higiene han dado como resultado la producción rutinaria de la leche que contengan menos de 50,000 microorganismos por mL y menos de 250,000 células somáticas por mL (Desmaures *et al.*, 1997).

La pasteurización de la leche comercialmente distribuida ha reducido en gran medida el riesgo de infección resultante del consumo de leche contaminada (Cohen, 2000). Sin embargo, una parte de la población estadounidense continúa consumiendo leche cruda y productos elaborados a partir de ella, un ejemplo son los quesos blandos (Rohrbach *et al.*, 1992; Headrick *et al.*, 1997; Headrick *et al.*, 1998; Hegarty *et al.*, 2002; Jayarao *et al.*, 2006).

El consumo de leche cruda es un comportamiento de alto riesgo y continuará causando morbilidad y mortalidad hasta que la gente deje de consumir leche y productos de leche cruda (Keene, 1999). De acuerdo a Grappin y Beuvier (1997), el crecimiento de patógenos en la leche cruda destinada para la producción de queso es altamente dependiente de las variedades de queso y la tecnología involucrada para su elaboración, pues está bien documentado que los patógenos crecerán con mayor facilidad en el queso con alto contenido de humedad, pH alto y bajo contenido de sal, que en quesos madurados cocidos.

Por lo tanto, la ocurrencia de bacterias patógenas se ha encontrado en algunos quesos frescos producidos con leche cruda, debido a su alto contenido de humedad (Ryser y Marth, 1987; DeBuyser *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2004).

#### **1.4.4.1 Flora Butírica**

La flora butírica está constituida por bacilos esporulados anaerobios del género *Clostridium*, que fermentan el lactato y producen ácido butírico, ácido acético y gas principalmente (Villegas de Gante, 2004). Estos microorganismos pueden provocar

hinchamiento tardío en los quesos acompañados de defectos en el sabor. En 1917 se adoptó el término *Clostridium* para designar a los bacilos anaeróbicos que presentaban un ensanchamiento fusiforme en el sitio de formación de las esporas. En la actualidad todo organismo que produce la toxina botulínica es asignado a la especie *Clostridium botulinum*. Tanto *Clostridium botulinum* como *Clostridium perfringens* causan serias intoxicaciones alimentarias. *Clostridium tyrobutyricum* (no patógeno) es responsable de la fermentación butírica.

Las esporas butíricas, altamente termorresistentes pueden hallarse en la masa de quesos, multiplicarse y fermentan lactato. Los productos de la fermentación producen rancidez a la pasta y un inflamiento del queso: la hinchazón tardía.

En la leche pueden existir esporas de *Clostridium botulinum* y sobrevivir a la pasteurización, pero las condiciones que reinan en el queso previenen la germinación y/o crecimiento, lo cual es necesario para la formación de la toxina.

*C. botulinum* es un bacilo Grampositivo, esporógeno, anaeróbico. Sus células miden 0.7-3.3 x 3.4-7.5µm y son móviles con flagelos peritricos. Sus esporas son ovales, subterminales y deforman el esporógeno (ICMSF, 1998). Con base en la especificidad antigénica de sus toxinas fueron identificados 7 tipos, A, B, C, D, F y G, implicados en el botulismo de hombres (tipo A, B, E, y F) y animales (C y D). La neurotoxina producida por *C. botulinum* (toxina botulínica) causante del botulismo, produce parálisis facial, afectando los nervios autónomos que controlan funciones del cuerpo, como la respiración y el latido del corazón.

*C. perfringens* es al igual que *C. botulinum* una bacteria alargada, anaeróbica, Grampositiva, formadora de esporas, que se encuentra comúnmente en el suelo. Vive en el tracto intestinal de muchos animales. *C. perfringens* es la causa más importante de intoxicación alimentaria en Estados Unidos, con un número estimado de casos anuales de 248 000. Las esporas de *C. perfringens* germinan en condiciones anaerobias, las cuales esporulan dentro del intestino, determinando la producción de la enterotoxina, la cual produce diarrea y calambres intestinales (Tortora *et al.*, 2013).

Se conocen bien los pasos y la bioquímica implicados en la génesis de ácido butírico y butanol a partir de azúcares. La glucosa se convierte en butirato a través de la vía Embden–Meyerhof y el piruvato es convertido en acetil–CoA e hidrogeno por la reacción fosforoclastica. El acetil CoA es entonces reducido a productos de fermentación utilizando para ello el NADH derivados de la ruta glucolítica. La producción de diferentes productos está influenciada por la duración y condiciones de las fermentaciones. En los estadios iniciales, los productos predominantes son los ácidos acético y butírico, pero a medida que cae el pH de la fermentación, cesa la síntesis de los ácidos y comienza la de acetona y butanol que son neutros (Madigan *et al.*, 2004).

#### 1.4.4.2 Coliformes

Son microorganismos de origen fecal, cuya presencia en la leche, los quesos y otros derivados, revela falta de higiene. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye un conjunto de gérmenes, cuya mayoría es habitante normal del intestino de los mamíferos. Existen especies patógenas para el hombre, por ejemplo, las salmonelas frecuentemente halladas en la leche, el queso (sobre todo crudo) y otros derivados lácteos. Las bacterias coliformes no son patógenas, con excepción de ciertas cepas enteropatógenas como *Escherichia coli* 0157:H7 (Villegas de Gante, 2004).

Las bacterias coliformes son aerobias o anaerobias facultativas, Gram- negativas, no forman esporas, en forma bacilar, fermentan la lactosa con producción de gas (CO<sub>2</sub> e hidrógeno) y ácidos, principalmente láctico dentro de 48hr a 35°C (Yousef y Carlstrom, 2003). Este grupo es representada por las bacterias: *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*. *Aeromonas hydrophila* y *Serratia mancegens* pueden ser incluidos en el grupo de coliformes (Erkmen y Bozoglu, 2016).

Dentro del grupo, son los coliformes fecales los que tienen significado sanitario y, por consiguiente, los de mayor interés en análisis microbiológico de alimentos. Se considera a *Escherichia coli* parte de los coliformes fecales. En general, niveles altos de *Enterobacteriaceae* lactato-positivas (coliformes) indican manipulación y elaboración deficiente de los alimentos (Pascual y Calderón, 1999).

##### 1.4.4.2.1 Bacterias coliformes presentes en leche cruda y quesos

En la elaboración de quesos la hinchazón precoz aparece durante las primeras etapas de prensado y salado, la cual consiste en un gran número de pequeños ojos similares a la pinchadura de un alfiler. El problema es de naturaleza biológica y se debe a la explosiva proliferación de bacterias coliformes o de levaduras provenientes de la leche de elaboración. Las causas de este problema deben buscarse en el uso de leche no pasteurizada, mala pasteurización o contaminaciones importantes con leche cruda (Reinheimer y Zalazar, 2006).

En quesos artesanales, en Lima (Perú) se encontró que el 58.6% de las muestras de queso fresco excedían la carga permitida de coliformes fecales teniendo un máximo de 8.3 Log<sub>10</sub> UFC/g y un mínimo de 1.1 Log<sub>10</sub> UFC/g (Delgado y Torres, 2003).

Castro *et al.* (2013) reportó una población de 9,0±0,9 Log<sub>10</sub> UFC/g en Queso Oaxaca tradicional, mientras que Palacios (2006) reportó una población de coliformes de 4,08±1,41 Log<sub>10</sub> UFC/g.

#### **1.4.4.3 *E. coli***

El género *Escherichia* lleva el nombre del bacteriólogo Alemán Theodor Escherich, quien aisló los tipos de especies de este género en 1885. *E. coli* es anaerobio facultativo con un tipo de metabolismo que es a la vez fermentativo y respiratorio (Torres *et al.*, 2010). La mayoría de las cepas fermentan lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. El género *Escherichia* es un miembro típico de los *Enterobacteriaceae* y habitan principalmente en los intestinos humanos y animales. *Escherichia coli* es un bacilo corto Gram – negativo, no esporulado, usualmente móvil con flagelos peritricos, se reproduce individualmente o en pareja en cultivos líquidos, de rápido crecimiento y su temperatura óptima es de 37°C (Sussman, 1997), tiene capacidad para crecer en presencia de sales biliares, y producir indol en agua peptonada (Pascual y Calderón, 1999).

La mayoría, aunque no todas las *E. coli* son inofensivas. Algunas causan infecciones tracto urinarias, otras causan enfermedades diarreicas y contribuyen a la mortalidad infantil, y una excepcionalmente desagradable, llamada O157: H7, que causa severas o fatales complicaciones neurológicas o renales (Berge, 2004).

En función del síndrome que provocan, se reconoce actualmente cinco grupos de *E. coli* productores de diarrea, cuyas diferencias están codificadas por plásmidos, las cuales son; *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC).

*E. coli* es conocida por ser un indicador de la contaminación con heces de animales y la posible presencia de otros microorganismos patógenos de origen fecal en los alimentos (Ghafir *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2016).

##### **1.4.4.3.1 *E. coli* presente en leche cruda y quesos**

La leche cruda puede estar contaminada con la toxina Shiga producida por *E. coli* (STEC). *E. coli* (STEC) se clasifica patotípicamente como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) STEC es con mucho el tipo más común de ECEH, por lo que los 2 términos son a veces utilizados como sinónimo (Allen *et al.*, 2015). El patógeno se alberga en el tracto gastrointestinal del animal, a menudo sin ninguna aparición de la enfermedad (Miszczycha *et al.*, 2013; Sarimhmetoglu *et al.*, 2009). Por lo tanto, la prevalencia de las cepas de STEC en los quesos de leche cruda se atribuye a la contaminación con heces de animales. Se ha informado que los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos relacionados con quesos de leche cruda se atribuyeron a cepas de STEC (Baylis, 2009; Espié *et al.*, 2006; Honish *et al.*, 2005). Además, casi todas las enfermedades asociadas al consumo de queso con STEC se han relacionado con queso de leche cruda, en vez de queso de leche pasteurizada (Yoon *et al.*, 2016).

La presencia de *E. coli* ha sido detectada en diferentes fases de producción del queso Oaxaca. Según el estudio de Castro (2013) hay una incidencia del 10.5% de un total de 38 cepas pertenecientes a coliformes de diferentes fuentes, una asilada de la leche, una de la cuajada y dos del queso Oaxaca. Mientras que en el estudio realizado por Palacios (2006), la presencia de *E. coli* se observó en queso tipo Oaxaca  $3,61 \pm 1,21$  Log<sub>10</sub> UFC/g.

#### **1.4.4.4 Salmonella**

La *Salmonella* forma parte de un complejo grupo de bacterias que constituyen dos especies, seis subespecies y más de 2500 serotipos (Porwollik, 2001). El género *Salmonella* se compone de bacterias móviles que pertenecen a la flora coliforme de la familia *Enterobacteriaceae*, como enterobacteria patógena, es nombrado bacilo ya que tiene forma de varilla. Los científicos utilizan otros términos que clasifican a la *Salmonella* y otras bacterias que comparten ciertas características, estos términos incluyen organismos Gram negativos, anaeróbica, lo que significa "capaz de vivir y crecer sin oxígeno", pero preferentemente crecen en un ambiente rico en oxígeno. Al igual que muchos otros tipos de bacteria, la *Salmonella* es capaz de producir infección cuando entra en el cuerpo de una persona (Brands *et al.*, 2006).

*S. entérica*, uno de los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos, es responsable por causar grandes brotes de salmonelosis humana en todo el mundo (Majowicz *et al.*, 2010). Se ha informado que la prevalencia de *Salmonella* en el queso es el resultado de la pasteurización ineficiente de leche utilizada para la fabricación de queso (D'Aoust *et al.*, 1985). En general, *Salmonella spp.* puede crecer incluso bajo condiciones desfavorables tales como baja temperatura, humedad y alta salinidad (El-Gazzar y Marth, 1992; Modi *et al.*, 2001).

##### **1.4.4.4.1 Salmonella presente en leche cruda y quesos**

Encuestas etiológicas revelaron que muchos brotes de salmonelosis han sido causados por serotipos de *Salmonella entérica*, tales como *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella dublin*, y *Salmonella montevideo*. Estos brotes se debieron al consumo de queso fresco o madurado fabricado a partir de leche sin pasteurizar (Yoon *et al.*, 2016).

La Escuela Superior Politécnica del Litoral realizó un "Análisis Microbiológico en Quesos Frescos que se expenden en supermercados en la Ciudad de Guayaquil" en el cual se encontró la presencia de *Listeria* y *Salmonella* en los quesos muestreados.

Los quesos blandos han causado brotes de intoxicaciones por *Salmonella* al igual que las variedades más duras. Cuando el queso se fabrica artesanalmente en malas condiciones, la contaminación de las cuajadas o del producto terminado, supone un riesgo importante (Varnam y Sutherland, 1995).



#### **1.4.4.5 Listeria**

*L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, considerada como más resistente al calor en comparación con *Salmonella* y *E. Coli* 0157:H7 (D'Aoust *et al.*, 1985; Fox *et al.*, 2004); a pesar de ello la pasteurización es un medio viable para erradicarla. Sin embargo, el peligro puede presentarse cuando la leche o cualquier otro producto lácteo se recontamina en pasos posteriores al proceso de pasteurización o cuando no se somete a procesos de calentamiento (Liu, 2008).

*L. monocytogenes* tiene la capacidad de adaptación a estrés y a estar bajo diferentes entornos hostiles, tales como ácido, el pH, la temperatura de refrigeración, y la alta salinidad (por ejemplo, queso) (Badaoui *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2016). Se sugiere que la contaminación con *L. monocytogenes* en leche cruda y queso pueden ocurrir de dos maneras; en primer lugar, por la transmisión de las heces del ganado o del entorno con higiene inadecuada, y en segundo lugar por la contaminación inmediata de los animales que sufren enfermedades como la listeriosis y la mastitis (Schoder *et al.*, 2012).

##### **1.4.4.5.1 Listeria presente en leche cruda y quesos**

Recientemente, brotes de *L. monocytogenes* han sido atribuidos a los quesos y han sido reportados en muchos países, entre ellos Francia, Japón, Suiza, EE.UU., Canadá y Austria (De Buyser *et al.*, 2001; Gaulin *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2011; Makino *et al.*, 2005; Schoder *et al.*, 2012).

Trabajos realizados por Pitt y Hocking (2009) han demostrado que el crecimiento de algunos microorganismos patógenos entre los cuales se encuentra *L. monocytogenes*, fue menor en leche cruda a condiciones de 37°C por 7h en comparación con leche pasteurizada a las mismas condiciones.

*L. monocytogenes* han sido responsables de dos brotes importantes de enfermedades transmitidas por alimentos en los EE.UU, debido a algunas variedades de quesos mexicanos, entre los que comprenden; queso blanco, queso fresco, Panela, Ranchero, queso de Hoja y queso suave Hispano (Bolton y Frank, 1999; Fox *et al.*, 2004).

#### **1.4.4.6 Staphylococcus aureus**

El género *Staphylococcus* incluye actualmente 42 especies diferentes. Algunas de ellas forman parte de la flora microbiana normal de la piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran solo entre la flora de animales mamíferos y aves. Las bacterias de este género son cocos (bacterias de forma esférica), Gram positivas, de 0.5 a 1.5µm de diámetro, se agrupan de forma irregular, son bacterias inmóviles, no forman esporas y generalmente no poseen cápsula salvo raras excepciones, son anaerobias facultativas (Peacock, 2005; Looney, 2000; Pahissa, 2009).

*S. aureus* a menudo reside en la membrana mucosa de la nariz y vaginas de animales lecheros, especialmente cabras. Este patógeno puede ser dispersado en las granjas lecheras y así transmitirse a la leche cruda y quesos de leche cruda (Mørk *et al.*, 2010). Por lo tanto, se suele sospechar de contaminación por *S. aureus*, ya que se ha encontrado en un alto porcentaje de muestras de queso de leche cruda (Cremonesi *et al.*, 2007; Rosengren *et al.*, 2010). La presencia de *S. aureus* en muestras de leche cruda procedentes de fuentes bovinas y caprinas es extremadamente alta, alcanzando niveles máximos de *S. aureus* en muestras tomadas entre las 5-6h después del primer prensado durante el proceso de fabricación del queso (Jakobsen *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2016).

#### **1.4.4.6.1 Staphylococcus aureus presentes en leche cruda y quesos**

Con respecto a la presencia de *Staphylococcus aureus*, Castro *et al.* (2013) reportan un recuento de  $8.6 \pm 0.6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ , no obstante, su presencia indica serias fallas en las condiciones higiénico-sanitarias debido a las malas prácticas de manufactura, ordeño, recolección y transporte de leche.

Es bien sabido que intoxicaciones por toxinas estafilocócicas se han atribuido al consumo de queso blando, pero los brotes son escasos y no hay datos epidemiológicos completos (Varnam y Sutherland, 1995).

#### **1.4.4.7 Otras bacterias patógenas importantes**

*Campylobacter jejuni* pertenece a la familia *Spirillaceae* y se encuentra en el tracto intestinal de muchos animales. *C. jejuni* suele producir enteritidis, cuyos principales síntomas son diarreas y calambres abdominales. Normalmente la leche se contamina a través del estiércol, probablemente por mastitis. El microorganismo puede continuar creciendo durante unos días en la leche cruda a baja temperatura, pero es termosensible y no sobrevive a pasteurización baja, además se destruye rápidamente en el queso debido al pH bajo (Walstra, 2001).

A pesar de lo anterior la campilobacteriosis ha sido registrada como la segunda enfermedad infecciosa de mayor incidencia transmitida por los alimentos, las cepas de *Campylobacter* han sido escasamente recuperadas y aisladas de los alimentos, ya que carecen de la capacidad para adaptarse a las condiciones ambientales hostiles tales como temperatura baja, NaCl alto y la presencia de oxígeno, lo que provoca proliferaciones pobres (Medeiros *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2016).

Con respecto a lo anterior existen cuatro patógenos que constituyen una amenaza en la seguridad del queso; *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonellas spp.*, y *E. coli* (Fox *et al.*, 2004)

## 1.5 Producción de quesos frescos artesanales

México se ubica en el noveno lugar mundial en producción de quesos con alrededor de 268 mil toneladas. En el municipio de Aculco, Estado de México se localiza una concentración geográfica de pequeñas agroindustrias orientadas a la fabricación de quesos tradicionales, cuya participación en la producción quesera nacional se estima en un 0.23% (Castañeda *et al.*, 2009). Por lo anterior este municipio se caracteriza principalmente por actividades económicas referidas a la producción de leche y quesos. Estas agroindustrias especializadas son de carácter rural y producen a niveles domésticos, desde la introducción colonial del ganado vacuno hasta nuestros días, pasando de generación en generación el sello familiar para su elaboración (UPLA, 2014).

En la cabecera municipal están localizados un gran número de expendios de queso, cuyo saber-hacer es tradicional, fundamentado en la fabricación de cuatro tipos de queso (molido, botanero, Oaxaca y Panela) (Castañeda *et al.*, 2009) que son acompañados de sus derivados como la mantequilla, las cremas, los dulces de leche, el pay de queso, etc. A pesar la participación en la producción primaria desde hace muchos años y la preparación de quesos de forma excepcional, existen factores que ponen en riesgo esta actividad y que la limitan a crecer como supondría por sus características.

Según González (2014), el seguimiento de los procesos evaluados en Aculco conlleva 5 etapas representativas en el proceso de elaboración de queso Oaxaca: 1. Obtención de leche cruda (que se ordeña de manera artesanal y se envía a un acopiador que lo distribuye a los pequeños productores), 2. Adición de nitratos, 3. Proceso de cuajado, 4. Malaxado y 5. Producto terminado

La etapa 1 representa el primer peligro de inocuidad por la falta de BPM y puntos críticos de control que monitoreen el proceso de ordeño, y la distribución sin cadena de frío, dando a los microorganismos la oportunidad de sobrevivir y multiplicarse (Battro, 2010).

La etapa 2 intenta contrarrestar lo anterior adicionando nitrato de potasio en grandes cantidades, pues tradicionalmente el nitrato ha sido adicionado a la leche destinada para producción de queso como un control en las fermentaciones ácido-butíricas (Walstra *et al.*, 2005); por lo que los artesanos tienen la creencia de que cumple una función antimicrobiana. Sin embargo, el uso de este aditivo solo es permitido para quesos madurados ya que la inhibición microbiana necesita de la transformación de nitrato a nitrito y de un elevado contenido de sal en agua (Beresford *et al.*, 2001).

## 1.6 Conservadores y Antimicrobianos

Los conservantes químicos se definen en el Código de Regulaciones Federales (CFR) por la Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU como "cualquier sustancia química que, cuando añadido a los alimentos, tiende a impedir o retrasar el deterioro de los mismos, pero no incluye la sal común, azúcares, vinagres, especias, o aceites extraídos de las especias, sustancias añadidas a los alimentos por contacto directo de exposición al humo de leña de los mismos, o los productos químicos aplicados como insecticidas o herbicidas" (FDA, 21 CFR 101.22). Los conservantes se utilizan para prevenir o retardar el deterioro químico o biológico de los alimentos. La FDA incluye en su lista de conservantes de alimentos (21 CFR 172, Subparte B) compuestos con diferentes funciones preventivas, tales como antioxidantes, colorantes, saborizantes, y retenedores de textura, así como agentes antimicrobianos (Mani-López *et al.*, 2016).

Un antimicrobiano se define como cualquier agente que interfiere con el crecimiento y la actividad de los microorganismos, si se refiere a grupos de microorganismos determinados se emplean los términos antibacterianos o anti fúngico, entre otros (Montoya, 2008).

La acción de los antimicrobianos puede explicarse por el tipo de efecto sobre el microorganismo ya sea en el ADN, en la síntesis de proteínas, la actividad enzimática, la influencia que ejerce sobre la membrana celular y el mecanismo de transporte de nutrientes, así como el daño a la integridad de las membranas o inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos (Lück y Jager, 2012), Consecuentemente algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos. Con todo, este último mecanismo también acarrea la muerte celular, excepto en el caso de las esporas de *Bacillaceae* (Mussel, 1983).

Por ser los microorganismos entes biológicos, muchas de sus características influyen sobre su comportamiento frente a un agente antimicrobiano, así también influyen ciertas condiciones del ambiente como: las características químicas y físicas del medio, pH, actividad de agua, temperatura, concentración, mecanismo de acción y tipo de microorganismo (García, 2004). Además de estos factores, algunos otros temas para la elección de un conservante para su uso en alimentos deben ser también considerados, tales como el género y la carga de microorganismos, el costo del conservante, y su efecto sobre la calidad del alimento en específico. Una evaluación adecuada de estos factores debe realizarse antes de la elección de un conservante para un alimento en particular. También es necesario revisar si se permite el uso del conservante para alimentos en particular, pues las agencias reguladoras también establecen restricciones. Además, debe revisarse la concentración máxima permitida de conservante destinado a ser utilizado.

Las concentraciones máximas permitidas en diferentes tipos de alimentos han sido reguladas en muchos países. Las concentraciones máximas de los conservantes de alimentos son establecidas por la FAO, OMS y la FDA entre otras agencias (Mani-López *et al.*, 2016).

Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos como GRAS (generally recognized as safe) por la FDA (Food and Drug Administration) son los siguientes:

**Cuadro 3** Antimicrobianos GRAS y su espectro de inhibición contra microorganismos

Antimicrobiano	Microorganismo
Ácido propiónico y propionatos	Mohos
Ácido sórbico y sorbatos	Mohos
Ácido benzoico y benzoatos	Mohos y Levaduras
Parabenos	Mohos y Levaduras
Dióxido de azufre y sulfitos	Mohos, Levaduras y Bacterias
Diacetato de sodio	Mohos y Levaduras
Nisina	Bacterias ácido lácticas y Clostridios
Nitrito de sodio	Clostridios

Fuente: Jay, 1991.

Durante muchos años se han recomendado sales eficaces contra el desarrollo de microorganismos, entre los cuales se encuentran los nitratos y nitritos (Reinheimer y Zalazar, 2006). En quesos madurados evitan la hinchazón tardía provocada por los esporulados anaerobios de la leche, estas sales también inhiben a las bacterias propiónicas que son las que le dan los “ojos” a determinados quesos (Battro, 2010). Sin embargo, en quesos frescos, el nitrato no cumple su función como lo haría en un queso madurado.

### 1.7 Nitrato y Nitrito

Los iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) son aniones inorgánicos de origen natural que forman parte del ciclo del nitrógeno. En este ciclo, los desechos que contienen nitrógeno orgánico se descomponen en el suelo o el agua, por acción de los microorganismos, para la formación de amoníaco en primera instancia. Posteriormente, éste se oxida para formar iones nitrito y éstos, a su vez, para dar nitratos (Olmos, 2012).

El nitrato es el compuesto de nitrógeno más oxidado y por lo tanto es estable a la oxidación, pero es un agente potencialmente oxidante (Addiscott, 2005). Los nitratos (sales de ácido nítrico,  $\text{HNO}_3$ ) son muy solubles en agua debido a la polaridad del ion; la estructura de este es plana y de alta estabilidad, con el nitrógeno en el centro y los oxígenos en las esquinas de un triángulo equilátero y, en ella, cada uno de los enlaces

N-O es un híbrido de un enlace sencillo y uno doble. Esta es la forma de nitrógeno más estable termodinámicamente en presencia de oxígeno (Flores y Albert, 1995). Los nitratos son muy estables, no son tóxicos y están implicados en la contaminación ambiental (suelos y capas freáticas) (Hernández y Sastre, 1999).

Los nitritos son muy reactivos y presentan numerosos efectos tóxicos. El problema surge del hecho de que los nitratos pueden en determinadas condiciones transformarse en nitritos (Hernández y Sastre, 1999). Los nitritos (sales de ácido nitroso  $\text{HNO}_2$ ) son solubles en agua. Se forman naturalmente a partir de los nitratos, ya sea por oxidación bacteriana incompleta del nitrógeno en los sistemas acuáticos y terrestres o por reducción bacteriana. El ion nitrito es menos estable que el ion nitrato, es muy reactivo y puede actuar como agente oxidante y reductor, por lo que sólo se encuentra en cantidades apreciables en condiciones de baja oxigenación (Flores y Albert, 1995).

Los nitratos y nitritos como aniones no son utilizados de manera directa, se necesita convertir estos compuestos en sales que permitan su utilización en la industria, de esta manera cuando esté etiquetado “para uso alimentario”, los nitratos y nitritos sólo pueden venderse en una mezcla con sal o sustituto de sal (Madrid y Madrid, 2000). Los nitratos y nitritos se utilizan como agentes de curado y antimicrobianos. Su propósito principal como un agente antimicrobiano es inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la producción de toxina botulínica en los alimentos. Hay cuatro sales admisibles de estos compuestos para su uso en los alimentos: nitrato de sodio, nitrato de potasio, nitrito de sodio y nitrito de potasio (Mani-López *et al.*, 2016).

### **1.7.1 Sales de nitrato y nitrito como aditivo en la industria alimentaria**

Desde tiempos muy antiguos los nitratos, en especial el potásico (salitre), se han utilizado junto a la sal y las especias en el curado de los derivados cárnicos para salar. En la actualidad está autorizado el uso de nitritos y nitratos de sodio y de potasio en la conservación de derivados cárnicos, queso y determinados productos de pesca (Gil y Sánchez, 2010).

En la industria alimentaria existen cuatro aditivos derivados del nitrito y nitrato (E29 al E252). El nitrito de potasio se conoce como E249, nitrito de sodio como E250, nitrato de sodio como E251 y nitrato de potasio como E252 (Heppner y Dorne, 2014). Solo se usan el E-250 nitrito sódico y el E-252 nitrato potásico en alimentos, puesto que el E-251 nitrato sódico es tan higroscópico que resulta engorrosa su dosificación y el E-249 nitrito potásico no se comercializa (Barros, 2009). El nitrato (E-251 nitrato sódico, E-252 nitrato potásico) es añadido en ocasiones junto con el nitrito como conservante, ya que sirve como reserva, al ir transformándose lentamente en nitrito (Almudena y Lizaso, 2001). El componente activo es el nitrito, que puede proceder de nitrato por

reducción catalizada por enzimas de las bacterias constituyentes de la microbiota (Gil y Sánchez, 2010).

Los nitratos y nitritos se han considerado los aditivos con mayor riesgo debido a que pueden dar lugar a la formación de nitrosaminas. Las nitrosaminas se forman en productos que contienen nitritos y se calientan a alta temperatura o que son ricos en ciertas aminas; algunas de estas moléculas son cancerígenas (Barros, 2009).

#### **1.7.1.1 Características fisicoquímicas del nitrato y nitrito**

El nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) de peso molecular 84.99 y el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) de peso molecular 101.11 (Cubero *et al.*, 2002), se presentan como cristales incoloros, transparentes o gránulos o polvo blanco cristalino, son ligeramente higroscópicos en el aire húmedo, libremente solubles en agua, y escasamente solubles en alcohol.

El nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) de pesos molecular 69.00 y el nitrito de potasio ( $\text{KNO}_2$ ) de peso molecular 85.1, se presentan como pequeños gránulos blancos a amarillos, higroscópicos en el aire, muy solubles en agua, pero escasamente solubles en alcohol (Madrid y Madrid, 2000). Cumple una función como fijador de color en la carne y productos cárnicos, como agente antimicrobiano y preservativo.

Se suelen utilizar nitratos o nitritos sódicos o potásicos, ya sea en forma pura o bien mezclados con sal común y otras sustancias (Cubero *et al.*, 2002). Cuando el nitrito sódico se etiqueta como «para uso alimentario», puede venderse en una mezcla con sal ( $\text{NaCl}$ ) o un sustituto de sales (Heppner y Dorne, 2014). Además de como aditivos, los nitratos como sustancias de origen natural pueden encontrarse en productos cárnicos frescos, leche y productos lácteos, cereales, frutas, bebidas alcohólicas y verduras. En la mayoría de estos alimentos se encuentran en bajas concentraciones, generalmente inferiores a 10 mg/kg y rara vez exceden los 100 mg/kg.

#### **1.7.1.2 Obtención**

El nitrato sódico se obtiene de forma pura haciendo pasar los gases procedentes de la combustión del amoníaco a través de solución de sosa. El nitrato potásico se puede conseguir de dos maneras, a partir de cloruro potásico y ácido nítrico en presencia de oxígeno o bien por reacción de carbonato de potasio con ácido nítrico (Cubero *et al.*, 2002). El nitrato de potasio también se encuentra como un producto natural en depósitos minerales chilenos (Coultate, 2009), así como en algunas plantas (remolacha, brócoli, espinacas) (Barros, 2009).

Los nitritos se obtienen por síntesis (Barros, 2009). El nitrito de sodio se crea cuando una mezcla de óxidos de nitrógeno se une con hidróxido de sodio. El nitrito cristaliza al enfriar una solución concentrada. Está disponible como solución y cristales, hay muy

poca producción de nitrito de potasio para la industria alimentaria, la mayoría del nitrito en el comercio es la sal de sodio (Coultrate, 2009).

### **1.7.1.3 Usos y aplicaciones del nitrato en la industria alimentaria**

Los nitratos, particularmente el potásico (salitre) se han usado desde hace al menos 3.000 años, al utilizar sal que procedía en muchos casos de desiertos salinos que solían estar impurificados con nitratos (Vázquez, 2001).

Los nitritos de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) y potasio ( $\text{KNO}_2$ ), y los nitratos de sodio y potasio son aditivos alimentarios utilizados en productos cárnicos (Decker *et al.*, 2010). Como aditivos alimentarios, se utilizan como agentes antimicrobianos, conservantes y fijadores de color en la carne y el pescado (Heppner y Dorne, 2014).

Habitualmente, se utiliza una mezcla de nitratos y nitritos, dada la inestabilidad de estos últimos (Gil y Sánchez, 2010), ya que en la preparación de productos cárnicos fermentados se requiere la utilización de nitratos para una liberación lenta de nitrito (Decker *et al.*, 2010), que puede proceder de la reducción de nitrato, catalizada por enzimas de las bacterias que constituyen la microbiota de maduración (Gil y Sánchez, 2010). El ion nitrito es el más importante de los dos en las carnes conservadas y en un ambiente ácido, se ioniza para producir ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) (Jay, 2000). Por lo tanto, aunque se emplean juntos, la eficiencia se debe a los nitritos; los nitratos son inertes por sí mismos y solo actúan de “reserva” (Barros, 2009).

El uso especializado de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) y potasio ( $\text{KNO}_2$ ) en productos cárnicos curados se les asocia a diversas funciones:

- Aditivo capaz de impedir la grave intoxicación por botulismo (Barros, 2009), al controlar la proliferación de *C. botulinum* (Villada, 2010). El crecimiento bacteriano y la división celular de los formadores de esporas se inhiben en presencia de nitrito. Si la concentración de esporas es alta, el efecto inhibitor del nitrito y otros aditivos de curado puede ser superado con el tiempo, dando lugar a la formación de toxina en un corto tiempo (Singhal y Kulkarni, 2000).
- La inhibición de microorganismos potencialmente patógenos, dando una considerable estabilidad bacteriológica al producto, aumentando su actividad con la disminución del pH (Roberts y Dainty, 1996).
- Estabilidad de la coloración: en el caso de carnes, mejoran el color al producir un color característico al reaccionar con los pigmentos en el músculo (Singhal y Kulkarni, 2000), pues como óxido nítrico (NO), el nitrito reacciona con la mioglobina de la proteína muscular para formar nitrosomioglobina, proporcionando y estabilizando el característico color de la carne curada (Doyle y Buchanan, 2013) que, de otro modo se iría oxidando y pardeando (Vázquez, 2001).



- Desarrollo de sabor y aroma: el nitrito da a la carne curada su color y sabor característicos (Roberts y Dainty, 1996).
- Efecto antioxidante: los nitritos retardan la oxidación de los lípidos y la formación del sabor sobrecalentado (WOF, Warmed Over Flavor) (Decker *et al.*, 2010) y por lo tanto la producción de aromas indeseables en carnes curadas al retardar la rancidez (este efecto se produce por la reducción del estado férrico activo al estado ferroso, que es inactivo en la oxidación de lípidos) (Singhal y Kulkarni, 2000).
- Para la salazón seca y húmeda (salmuera) suele emplearse el nitrato. En carne, el nitrito se emplea con mayor frecuencia para embutidos y otros productos de carne picada (Villada, 2010).

El potencial redox (Eh) afecta la actividad del nitrito en algunas bacterias, las condiciones anaeróbicas (disminución de Eh) aumentan su efecto inhibitorio. Gran parte de la respuesta al crecimiento microbiano puede explicarse por el pH y  $a_w$  del producto, la concentración de nitrito presente y la temperatura de almacenamiento (Roberts y Dainty, 1996).

En productos pesqueros los nitratos se pueden aplicar como conservador del color rosado, como es el caso de las anchoas (Cubero *et al.*, 2002). Los nitratos también pueden utilizarse en productos lácteos, como la leche y quesos semiduros para evitar el hinchamiento (fermentación tardía y producción de gas) por *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* o bacterias butíricas (Singhal y Kulkarni, 2000). Los nitratos se utilizan en un gran número de variedades de queso (Birkkjaer *et al.*, 1978; Chirkina, 1976; Dencov *et al.*, 1970). Sin embargo, pueden ejercer efectos importantes sobre la salud humana.

#### 1.7.1.4 Función del nitrato en queso

La adición de nitrato de sodio o potasio a la leche utilizada para la elaboración de quesos semiduros se efectúa para prevenir la fermentación butírica y el desarrollo de bacterias de las especies *Clostridium tyrobutyricum* cuyas esporas sobreviven a la pasteurización normal de la leche (Molina *et al.*, 1999), dando como resultado la hinchazón del queso (Fox, 2012). El hinchamiento tardío de los quesos resulta de la fermentación de lactato de calcio, con producción de ácidos (butírico y acético) y gases (hidrógeno y anhídrido carbónico). El hinchamiento tardío no se produce en los quesos de pasta blanda sino en los quesos de pasta dura y corteza sólida; la presencia de la corteza hace posible la retención de gases que da origen a una presión interna (Reinheimer y Zalazar, 2006).

Se ha determinado a través de varias investigaciones que una fracción del nitrato adicionado es reducido a nitrito bajo la acción de la enzima xantina-oxidasa, el cual

forma otros compuestos nitrogenados por acción de bacterias ácido lácticas (Glaeser, 1989). En la conversión de nitrato a nitrito en el queso participan también otros factores, tales como, cantidad de nitrato adicionado en la elaboración del queso, tiempo y temperatura de maduración, pH del queso y microflora presente (Molina *et al.*, 1999).

La adición máxima permitida de  $\text{NaNO}_3$  o  $\text{KNO}_3$  es de 15g/100 litros de leche destinada para queso (quesos semi duros) (Fox, 2012). El contenido habitual de nitratos en la leche fresca es inferior a 1mg/kg y en algunos casos puede alcanzar los 12mg/kg. En la leche fresca no se encuentran nitritos ni nitrosaminas (Del Castillo y Mestres, 2004).

Durante la fabricación de queso, parte del nitrato que es adicionado pasa al suero de leche o se difunde en la salmuera y otra parte es reducido a gases, así que solo una pequeña parte permanece como nitrito (Fox, 2012).

### **1.8 Efecto del nitrato sobre las bacterias**

El nitrato no tiene acción antimicrobiana sobre las bacterias; sin embargo, muchas bacterias contienen enzimas en sus diferentes compartimentos celulares que asimilan el nitrato (Moir y Wood, 2001).

Todas las nitrato reductasas son enzimas dependientes de molibdeno, y se han dividido en cuatro grupos principales: EukNR (de células procariotas), Nas, Nap, y Nar. Las nitrato reductasas se han clasificado de acuerdo a su función fisiológica, la localización subcelular (es decir, citoplasmática, periplásmico, o membrana) de la enzima y la estructura del sitio activo de molibdeno (por ejemplo, dioxo-Mo (VI) y monooxo-Mo (VI)) (Sparacino - Watkins *et al.*, 2014).

La nitrato periplasmático reductasa (Nap) tiene su sitio activo fuera del citoplasma, y por lo tanto no requiere un mecanismo biológico específico para el transporte de sustratos nitrogenados a su sitio de reducción. Por otro lado, dos tipos de nitrato reductasas tienen sus sitios activos dentro del citoplasma: nitrato reductasa respiratoria (Nar) que opera bajo condiciones anaerobias como enzima respiratoria y la nitrato reductasa de asimilación (Nas). Para llegar al sitio activo de estas enzimas, el nitrato debe cruzar la membrana citoplasmática, es ahí donde el producto de la reducción de nitrato, nitrito, puede ser reducido vía nitrato reductasas. Finalmente, el nitrito producido mediante la reducción de nitrato puede ser expulsado por el citoplasma en el ambiente extracelular (Moir y Wood, 2001).

#### **1.8.1 Microorganismos que degradan el nitrato**

Todas las bacterias que contienen enzimas nitrato reductasas, son capaces de degradar el nitrato transformándolo en nitrito. Entre las bacterias que tienen esta capacidad se encuentra *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstoniaeutropha*), *T. pantotropha* (*P.*

*denitrificans*), *E. coli*, y *Rhodobacter* (Conrado *et al.*, 1999) con un sistema nitrato reductasa periplásmica (Nap). También se han realizado estudios bioquímicos y genéticos que demuestran la existencia de la enzima Nar (Nitrato reductasa respiratoria) en *E. coli* y *Paracoccus denitrificans*. La enzima nitrato reductasa de asimilación (Nas) está presente en *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium perfringens*, y *Shaposhnikovii ectothiorhodospira* (Guerrero, 1981).

Especies de *Bacillus (stearothermophilus)* sintetizan la nitrato reductasa más rápidamente cuando se transfieren a medios anaeróbicos que contienen nitrato en comparación con células totalmente nutridas que se cultivan aeróbicamente antes de la transferencia, en tanto que *Haemophilus parainfluenzae* produce la síntesis de nitrato reductasa ya sea en presencia o ausencia de nitrato cuando la cantidad de oxígeno se reduce aproximadamente 100  $\mu$ M (Payne, 1973). *Proteus mirabilis* induce la producción de nitrato, por anoxia (DeGroot, 1970); sin embargo, la presencia de azida durante el crecimiento anaeróbico de *P. mirabilis* en ausencia de nitrato estimula la producción de la enzima 40 veces más que la obtenida sin azida.

*E. coli* K-12, reprime la biosíntesis de nitrato reductasa en ausencia de nitrato, pero la síntesis en presencia de nitrato se inicia cuando la tensión de oxígeno se reduce significativamente incluso antes de que se alcance la anoxia (Showe, 1968). En mutantes seleccionados por transporte de electrones, la nitrato reductasa se produce en presencia de oxígeno (Simoni, 1970). Por lo tanto, se sugiere que el oxígeno que actúa como aceptor de electrones es el agente represor bajo anaerobiosis, la presencia de nitrato induce en gran medida al incremento de nitrato reductasa en tipos silvestres.

Existen evidencias de que *L. plantarum* tiene un efecto significativo en la producción de nitrito y amoníaco en presencia de nitrato, y un efecto menor, pero todavía considerable, sobre la generación de nitrito en cultivos *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*. Cultivos de BAL que crecieron a niveles de O<sub>2</sub> equivalentes o superiores al 6% no mostraron cambios significativos en nitrito o amoníaco. Sin embargo, bajo condiciones anaerobias el nitrito y el amoníaco fueron generados y excretados en los medios y alcanzaron las concentraciones más altas (Tiso y Schechter, 2015).

**Cuadro 4.** Organismos patógenos nitrato y nitrito reductasas y su relación con óxido nítrico (NO)

<i>Organismo</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Nitrato reductasa</i>	<i>Nitrito reductasa</i>	<i>Producto final</i>	<i>Relación con NO</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax	NarG	NirA, NasB	NH <sub>3</sub>	Produce NO por NOS
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis, artritis	NapA	NrfA	NH <sub>3</sub>	No sensible al NO
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	Nh	NirA	NH <sub>3</sub>	Sensible al NO
<i>Clostridium difficile</i>	Colitis pseudomembranosa	Nh	NirA	NH <sub>3</sub>	Produce NO
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea	NarG, NarZ, NapA	Nrf, Nir	NH <sub>3</sub> , NO	Desintoxicación de NO vía Nrf
<i>Helicobacter pylori</i>	Cáncer gástrico y úlceras	Nh	nh	na	Sensible al nitrito y NO
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Diarrea	NapA	Nrf	NH <sub>3</sub>	Uk
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	Nh	nh	Na	Uk
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	NarG	NirBD	NH <sub>3</sub>	Resistente a NO
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	STD	Nh	NirB, NirK	NO	Resistente a NO
<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningitis bacterial	Nh	NirB	NO	Produce NO
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Infección pulmonar	NapA, NarG, NasA	NirBD, NasB	NH <sub>3</sub> , NO	Produce NO
<i>Salmonella typhimurium</i>	Salmonelosis	NapA, NarG, NarZ	Nrf, Nir	NH <sub>3</sub> , NO	Uk
<i>Shigella dysenteriae</i>	Shigelosis, disentería	NapA, NarG, NarZ	Nrf, NirB	NH <sub>3</sub> , NO	Uk
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación alimentaria	NarG	NasD	NH <sub>3</sub>	Produce NO
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Meningitis bacterial	Nh	Nh	Na	Uk
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera, diarrea	NapA	Nh	Uk	Produce NO
<i>Yersinia pestis</i>	Pneumónica, septicemia, peste bubónica	NapA	NirBD	NH <sub>3</sub>	Sensible

uk = desconocido, nh = no homólogo, na = no aplicable

Fuente: Sparacino - Watkins *et al.*, 2014.

## 1.8.2 Mecanismo de acción de nitrito como antimicrobiano

El mecanismo de inhibición del nitrito en microorganismos ha sido estudiado por 50 años (Gibson y Roberts, 1986; Genigeorgis y Riemann, 1979). La inhibición de la respiración ha sido considerada como el posible mecanismo de acción bacteriostática del nitrito por lo menos para organismos aerobios. El mecanismo de inhibición en cambio no ha sido satisfactoriamente explicado particularmente respecto a bacterias anaerobias y anaerobias facultativas en condiciones anaerobias (Yarbrough *et al.*, 1980).

### 1.8.2.1 Acción sobre bacterias aerobias

Los nitritos al igual que toda una gama de ácidos lipófilos, han sido utilizados como aditivos alimentarios (Freese *et al.*, 1973). Concentraciones variables de nitrito han inhibido el crecimiento celular y disminuido la captación de O<sub>2</sub> y el contenido de ATP de células de *Bacillus subtilis*, pero no la oxidación de NADH o 3-glicerofosfato por membranas vesiculares preparadas de los mismos cultivos. Estas oxidaciones son

citocromo dependientes y se ha postulado la inhibición por consumo de O<sub>2</sub> y por lo tanto la reducción del contenido de ATP provocada por la deficiencia de sustratos oxidables dentro de las células.

Meijer *et al.* (1979) concluyeron que el nitrito ejerce un efecto inhibitorio en la absorción de O<sub>2</sub>, la síntesis de ATP asociada al transporte de electrones y el transporte activo de glucosa y prolina en *P. aeruginosa* (Rowe *et al.*, 1979) y del transporte activo de prolina en *Escherichia coli* (Yarbrough *et al.*, 1980) relacionadas a la disminución observada de H<sup>+</sup>/O. Por lo tanto, la transferencia de sustrato activo y la síntesis de ATP asociada al transporte de electrones dependen de la formación y mantenimiento de gradientes de protones transmembrana. Procesos de transporte que no dependen de gradientes de protones, como el grupo de translocación-fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa dependiente de la glucosa en *E. coli* y *Streptococcus faecalis*, no son inhibidos por el nitrito (Yarbrough *et al.*, 1980), lo que añade mayor peso a la importancia de la inhibición del proceso de transporte activo. En aras de lo anterior se han descrito otros sitios de acción inhibitoria del nitrito en aerobios, incluyendo aldolasa en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. faeculis* (Yarbrough *et al.*, 11, 1980) y el metabolismo del piruvato.

Tanto *Vibrio comma* (Bernheim, 1943) como *Fusarium sp.* (Nord y Mull 1945) acumularon piruvato al crecer en glucosa en presencia de nitrito, mientras que *Staphylococcus aureus* produjo menores niveles de acetoina en favor del acetato en presencia de nitrito (Buchanan y Solberg, 1978). Se ha especulado que el nitrito inhibe a *S. aureus* al reaccionar con los grupos sulfhidrilo de la coenzima A o cofactores de ácido lipoico implicados en el metabolismo del piruvato, aunque no se han expresado pruebas (Buchanan y Solberg, 1972). La piruvato descarboxilasa de la levadura de cerveza ha demostrado ser inhibida por el nitrito, e incluso más activamente por el NO (McMindes y Siedler, 1988). Esta enzima no depende ni del ácido lipoico ni de la coenzima A.

### **1.8.2.2 Acción sobre bacterias anaerobias**

El metabolismo del piruvato en anaerobios ha sido casi exclusivamente el centro de atracción para los estudios del efecto inhibitorio del nitrito. McMindes y Siedler (1988) investigaron los efectos del nitrito y el NO en el piruvato: ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) de *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes* (Woods *et al.*, 1981) y *C. botulinum* tipos A, B (proteolítico y no proteolítico), C, D y E (Woods y Wood 1982). En ambos estudios, el piruvato se acumuló cuando se añadió nitrito a cultivos que metabolizaban la glucosa. En *C. sporogenes* la tasa de crecimiento de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> también se redujo y hubo una rápida y marcada disminución en el contenido de ATP de las células. Estas observaciones proporcionan una fuerte evidencia de la inhibición de la división fosforoclastica de piruvato en sistemas anaeróbicos. En los sistemas libres de células de *C. sporogenes* (Woods *et al.*, 1981) la formación del piruvato dependiente del

fosfato de acetilo no fue inhibida a las concentraciones de nitrito más altas ensayadas, pero en la reducción dependiente de piruvato de NAD, tal como la ferredoxina dependiente y la producción de ATP, se vio afectada a concentraciones muy bajas. Para tratar de definir el sitio de acción más estrechamente, los extractos libres de células de *C. sporogenes* se fraccionaron en ferredoxina pura y extractos de proteína libre de ferredoxina después del crecimiento en presencia y ausencia de nitrito, esto llevó a los autores a concluir que la enzima PFOR era el sitio principal de la actividad inhibitoria.

Tompkin *et al.* (1978) conjeturaron que la reacción de nitrito (NO) con los centros de hierro no-haem de ferredoxina y PFO era el lugar probable de la inhibición. Tales sitios de hierro no-haem se caracterizan por la presencia de átomos de azufre. Nitrito y NO también han demostrado inhibir la actividad de la nitrogenasa, otra proteína que contiene hierro no hemo, en *C. pasteurianum* (Meyer, 1981).

En resumen, la evidencia apunta actualmente a diferentes mecanismos en aerobios y anaerobios, las proteínas de transferencia de electrones tal vez sean importantes en ambos tipos de organismos, sin embargo, se debe recalcar la reactividad inherente (Williams, 1988) de nitrito o NO con los grupos -SH, -NH<sub>2</sub> y -OH característicos de tantas moléculas biológicas, ya que puede significar que en última instancia ningún mecanismo de inhibición será de importancia fundamental. Por ejemplo, a pesar de toda la atención prestada al metabolismo del piruvato en aerobios, Woods *et al.* (1981) demostraron que el transporte de glucosa en *C. sporogenes* fue inhibido junto con el sistema fosforoclastico. Si los dos estaban vinculados o no es independiente, pero es posible que el transporte de glucosa haya sido un resultado de la inhibición de los sulfhidrilos de membrana (Buchman y Hansen 1987; Roberts y Dainty 1991).

### **1.8.2.3 Acción sobre bacterias formadoras de esporas**

El efecto inhibitor de nitrito en formadores de esporas bacterianas se debe aparentemente a la inhibición del crecimiento y durante la división celular (Cook y Pierson, 1983; Genigeorgis y Riemann, 1979). El nitrito no inhibe la germinación de esporas en un grado significativo. Inmgram (1939) postuló por primera vez la inactividad de enzimas asociadas con la respiración. Desde entonces se ha encontrado que el nitrito afecta a una variedad de enzimas y a sistemas de enzimas.

Después de muchos años de investigación sobre el preciso modelo de acción del nitrato todavía no hay nada seguro y se han considerados algunos posibles sitios de acción en la célula microbiana. Los primeros modelos de acción incluyen; la inhibición de la respiración por la inactivación de enzimas clave; liberación de ácido nitroso y óxidos nítricos; formación de compuestos S - nitrosos, por la reacción de nitrito con proteínas de jamón (Singhal y Kilkarni, 2000; Surekha y Reddy, 2000).

Como muchos preservantes de comida, los nitritos trabajan mejor bajo condiciones ácidas que favorecen la producción de ácido nitroso no disociado, permitiendo la entrada en la célula bacteriana. En el estudio del nitrito como antimicrobiano para la inhibición de esporas han sido reconocidos cofactores o enzimas que contienen hierro. El ion nitrito ejerce su acción sobre el sistema fosforoclástico de las enzimas que causa la conversión del piruvato en acetato. El nitrito hace que la concentración de ATP en la célula microbiana disminuya rápidamente y conduzca a la excreción de piruvato. El NO funciona como un ligando para el hierro NO-hemo, así como el hierro hemo de la citocromo oxidasa en las bacterias aerobias, y provoca la inhibición. La inhibición de la enzima hierro-azufre, ferredoxina y/o piruvato ferredoxina oxidoreductasa, en *Clostridium botulinum* y *C. pasteurianum* es el mecanismo final de esta acción antimicrobiana. Los agentes quelantes tales como EDTA, eritorbato, ascorbato de sodio y polifosfatos aumentan la eficacia antibotulinal del nitrito secuestrando el hierro. A altas concentraciones de nitrito, la S-nitrosación de enzimas sulfhidrilas es también una posible causa de inhibición (Singhal y Kulkarni, 2000).

Woods y Wood (1982) estudiaron el efecto del nitrito en el metabolismo, particularmente el de la glucosa de células de *C. botulinum*. Ellos encontraron que cuando el nitrito es adicionado a una suspensión de células de *C. sporogenes* incubadas en un medio que contiene glucosa, hay un descenso grande y rápido en la concentración intracelular de ATP y una excreción de piruvato de las células. En última instancia, se determinó la inhibición para seguir la conversión de nitrito en NO y la subsiguiente interacción de NO con hierro no proteico localizado en proteínas (Woods y Wood, 1982). El incremento de piruvato implica que la acción inhibitoria del nitrito se da en el sistema fosforoclástico que es una fuente importante de ATP en clostridios.

El sistema fosforoclástico convierte el piruvato en CO<sub>2</sub>, hidrogeno y acetil fosfato, que se convierte en acetato mediante la acetato quinasa + ADP. El sistema está compuesto de tres proteínas: piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), ferredoxina e hidrogenasa (Cammack *et al.*, 1999).

Se ha confirmado que el nitrito inhibe la ferredoxina y la PFOR en *C. botulinum* y *Clostridium pasteurianum* cuando los cultivos se incuban con 1.000 pg de NaNO/mL, informando que la inhibición in vivo de la ferredoxina es mayor que la de la piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) (Carperter *et al.*, 1987; Doyle y Buchanan, 2013).

#### **1.8.2.4 Bacterias inhibidas por nitrito**

El nitrito ha demostrado inhibir el transporte activo, el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la oxidación del hierro por el transporte de electrones, tales como la citocromo oxidasa a la forma férrica (Rowe *et al.*, 1979).

El nitrito también inhibe el transporte activo de prolina en *Escherichia coli* pero no al grupo de translocación por la fosfoenolpiruvato: sistema fosfotransferasa (Yarbrough *et al.*, 1980).

El crecimiento de *Clostridium sporogenes* y *C. botulinum* fue inhibido por el nitrato mediante su interferencia con el sistema fosforoclastico (Woods y Wood, 1982). La inhibición es debido a la reacción de óxido nítrico con el hierro no hemo de piruvato ferredoxina oxidoreductasa.

El nitrito inhibe la enzima hierro-sulfuro ferredoxina, de *C. botulinum* y *C. pasteurianum* (Carperter *et al.*, 1987). McMIndes (1988) reportó que el óxido nítrico era el principal antimicrobiano activo del nitrito y que la piruvato descaboxilasa podría ser adicional para la inhibición del crecimiento por nitrito. Roberts *et al.* (1991) también confirmaron la inhibición del sistema fosforoclastico, encontrando que el ascorbato mejoraba la inhibición, además demostraron que otras enzimas de *Clostridium botulinum* que contienen hierro fueron inhibidas incluyendo otras oxidoreductasas y proteínas de hierro-azufre e hidrogenasa. Se ha sugerido que la inhibición de ferredoxina y/o piruvato ferredoxina oxidoreductasa es el mecanismo final de la inhibición del crecimiento de clostridios (Carperter *et al.*, 1987; Tompkin, 1993). Estas observaciones están respaldadas por el hecho de que la adición de hierro a las carnes que contienen nitrito reduce el efecto inhibidor de los compuestos.

Los mecanismos de inhibición contra los microorganismos no esporulantes pueden ser diferentes que para los formadores de esporas. El nitrito ha demostrado inhibir el transporte activo, el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa por oxidación de hierro ferroso de un transportador de electrones, tales como la citocromo oxidasa, a la forma férrica (Muhoberac y Wharton, 1980). Yang (1985) indica que la inhibición de la citocromo oxidasa de *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* y *S. lactis*, bacterias que no dependen de transporte activo o citocromos, no fueron inhibidas por nitrito. Rowe *et al.* (1979) y Woods y Wood (1982) teorizaron que los nitritos inhiben a las bacterias aeróbicas mediante la unión del nitrito al hierro hemo de la citocromo oxidasa.

Algunos reportes de Nielsen (1983) muestran que *Enterobacteriaceae*, *Broch. thermosphacta*, y *Moraxella spp.* fueron inhibidas hasta con 200 ppm de nitrato de sodio en salchichas Bolonga, mientras que las levaduras y BAL fueron solo ligeramente inhibidas, por lo tanto, tienden a predominar en esos productos.

Estudios realizados por Gibson y Roberts (1986) reportan que el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* a temperaturas entre 10°- 35°C no fue impedido por combinaciones de sal (1-6% w/v), pH (5.6, 6.2 y 6.8) y nitrato de sodio (0-400ppm). La inhibición ocurre bajo extremas condiciones de pH (5.6), temperatura (10°C) y nitrato (400ppm).



*Clostridium botulinum* es bastante sensible a los cambios en niveles de sal. Aparentemente el nitrito actúa sinérgicamente con la sal para inhibir *Clostridium botulinum*. La cantidad requerida para la inhibición varía entre los diferentes alimentos, pero en productos con un bajo contenido de sal y prolongada maduración, la adición de entre 50 y 150 mg/kg de nitrato es necesaria (Barros, 2009). Sofos *et al* (1979) encontraron que 80 mg/kg de nitrito son menos efectivos en productos de pollo que en otros hechos con carne de cabra o puerco. Es importante destacar que el tipo de proteína de carne sometida a tratamiento con nitratos afecta la tasa de depresión de nitrito y también los efectos antibotulínicos.

Gibson y Roberts (1986) observaron la combinación del efecto de la sal y nitrato en *Clostridium perfringens* a diferentes temperaturas y pH. Durante el almacenamiento a 20° y 35°C, se encontró que el crecimiento de este organismo fue prevenido por los niveles de sales de curado usados comercialmente (200 mg/kg) siempre que el pH fuera de 6.2 o menor.

El nitrito ha mostrado la inhibición de *Listeria monocytogenes* en productos de carne curada. Los efectos inhibitorios dependen de la interacción de cinco variables entre las que destacan las tasas de crecimiento exponencial y las duraciones de la fase de lag en combinación de pH ácido, envasado al vacío, altas concentraciones de sal y refrigeración adecuada (Buchanan *et al.*, 1989).

Benedic *et al.* (1993) reportaron que el crecimiento de *Bacillus cereus* fue solo afectada por la combinación de pH, sal y nitrito, por ejemplo, a 12°C, pH 6.75 y 50 mg/kg de nitrito.

Datos similares fueron encontrados en *Shigella flexneri* por Zaika *et al.* (1994) donde bajo condiciones adversas de temperatura o pH, la adición de sal y nitrito fue suficiente para prevenir el crecimiento de este microorganismo.

### **1.9 Nitrito como sustancia peligrosa resultante de una transformación secundaria del nitrato**

Tanto los organismos relacionados con la higiene, como Salud Pública se preocupan por la presencia de nitratos en la leche y los productos lácteos. Los quesos, y sobre todo el lactosuero, contienen cantidades no despreciables de nitratos cuando la fabricación implica la adición de nitrato potásico o sódico en la leche. En algunos países se tolera una dosis de 20g/100L. Alrededor del 90% de este aditivo pasa al lactosuero, que, una vez desecado, puede contener hasta 0.3%. El mismo queso, una vez desuerado, contendrá 50 y 80 mg/Kg, cantidad que irá disminuyendo progresivamente. La leche cruda contiene en general pocos nitratos de 0.1 a 0.2 mg/kg. En las leches concentradas, el contenido, en nitratos se sitúa en unos 5 mg/kg de extracto seco; por el contrario, en los productos desecados pueden encontrarse

concentraciones de nitratos muy elevadas. Los tratamientos térmicos industriales de conservación aumentan el contenido de los componentes valorados como nitrito. Así se ha observado que en el caso de la leche pasteurizada y luego esterilizada (120°C 4 min), el porcentaje se multiplica por 4. También se ha visto que la concentración en nitratos del lactosuero en polvo es mayor que en el lactosuero líquido correspondiente. Los nitratos son sospechosos a causa de la reducción a nitritos que sufren en los quesos, como en otros productos fermentados, ya que ciertos *Lactobacillus* reducen eficazmente los nitratos. Se teme que los nitritos dan origen a N-nitrosaminas por reducción, los cuales son compuestos tóxicos y algunos cancerígenos (Alais, 1985).

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del nitrato sobre siete grupos microbianos representativos presentes en la leche cruda y valorar la capacidad reductora de los microorganismos en la transformación del nitrato en nitrito para relacionar el posible efecto antimicrobiano de este aditivo.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de dos proporciones de nitrato (150 y 800 mg/L) adicionado a leche cruda sobre la supervivencia de la microflora presente: bacterias coliformes totales, fecales y *E. coli*; bacterias lácticas (lactobacilos y estreptococos), bacterias mesófilas y psicrótrofas, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, hongos y levaduras.
2. Evaluar el efecto de dos tipos de nitrato, grado alimenticio y agrícola (en las cantidades citadas), sobre la supervivencia de la microflora mencionada.
3. Evaluar el efecto del tiempo de contacto, 0, 1 y 5 horas (en las cantidades y tipos citados), sobre la supervivencia de la microflora en estudio.
4. Evaluar el efecto del nitrato en las condiciones citadas en los puntos 1 y 2 sobre cultivos extraídos de leche cruda de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, *E. coli* y coliformes totales a diferentes tiempos (0, 1, 3 y 5 horas).
5. Establecer una curva patrón para determinar nitrato/nitrito por espectrofotometría.
6. Evaluar el efecto reductor global de la flora microbiana presente en la leche para transformar el nitrato en nitrito en las condiciones citadas en los puntos 1-3.
7. Evaluar el efecto reductor de bacterias lácticas (lactobacilos y estreptococos), bacterias coliformes y *E. coli* aislados de la leche para transformar el nitrato en nitrito en las condiciones citadas en el punto 1, durante 0,1 ,3 y 5 horas de contacto.

## HIPÓTESIS

El nitrato no tiene efecto antimicrobiano evidente sobre los principales grupos microbianos presentes en leche cruda.

## JUSTIFICACIÓN

Los derivados de la leche obtenidos de manera artesanal, simbolizan historia y cultura y son una estrategia de desarrollo para productores rurales de países con economías emergentes (Cervantes, 2008). Estos productos están accesibles a consumidores tanto del área rural como del área urbana. Sin embargo, debido a su naturaleza y tecnología rudimentaria, carecen de características de calidad estandarizada, lo que debilita su venta frente a los alimentos industrializados (Díaz-Ramírez *et al.*, 2016).

La inocuidad en estos productos, en su mayoría quesos frescos, es dudosa ya que poseen un alto grado de contaminación microbiana y por tanto implican un riesgo a la salud de los consumidores. Aunado a la calidad microbiana deficiente, los artesanos adicionan a la leche sales de nitrato con la intención de reducir las poblaciones microbianas, en especial la flora coliforme. No hay evidencia de que este aditivo tenga algún efecto antimicrobiano sobre la flora presente en la leche.

Aunque los conservantes que se permiten en los alimentos se consideran sin efectos adversos potenciales, ha habido preocupaciones sobre la seguridad de los nitritos. El nitrito, en altas concentraciones, es indudablemente tóxico para los seres humanos (Cammack *et al.*, 1999). Se han observado efectos agudos por ingestión accidental en agua potable (Bradberry *et al.*, 1994), salchichas (Kennedy *et al.*, 1997) y medicamentos (Ellis *et al.*, 1992). El principal efecto tóxico es la oxidación de la oxihemoglobina a ferrihemoglobina, lo que conduce a la metahemoglobinemia. Esto puede ser fatal, especialmente en los recién nacidos en los que la capacidad de reducción de metahemoglobina es baja, lo que lleva al denominado síndrome del "bebé azul" (Fan y Steinberg, 1996). Además, el nitrito puede transformarse en nitrosaminas, consideradas como agentes cancerígenos.

En México, la NOM-121-SSA-1 1994, establece que la adición de sales de nitrato debe ser como máximo 15 mg/100L y sólo en la elaboración de quesos madurados. La mayoría de los productores artesanales (de quesos frescos) adicionan hasta 80g/100L. Desde el punto de vista tóxico-higiénico, implica que los quesos elaborados bajo estas condiciones representan un riesgo para la salud del consumidor.

En este estudio se pretende comprobar la baja eficiencia del nitrato como antimicrobiano cuando se adiciona a leche destinada a la producción de queso fresco

artesanal, así como poner en evidencia que la flora microbiana presente tiene poca capacidad para transformar el nitrato en nitrito.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

## II. MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química, Unidad El Cerrillo. La parte experimental se describe enseguida:

### 2.1. Materiales

- Se utilizó leche cruda proveniente de 3 regiones del Estado de México; Aculco, Ocoyoacac y la posta de la FMVZ, UAEMex. Las muestras fueron tomadas utilizando material y frascos de dilución esterilizados en autoclave, según lo indica la norma NOM-109-SSA1-1-1994.
- Se emplearon 2 tipos de nitrato: Nitrato de potasio grado alimenticio (99.4%  $\text{KNO}_3$ ) (Xiamen Vastral Chemical) y nitrato de potasio de uso agrícola (5% Sulfitos) (Rs Maxunite Fertilizer, Hunan).

### 2.2. Diseño del experimento

El diseño del experimento considera la adición de nitrato alimenticio y agrícola a diferentes concentraciones como se muestra en el cuadro 5. Se utilizó leche cruda con una abundante flora microbiana; y leche UHT a la cual se adicionaron colonias típicas de un grupo microbiano (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, coliformes totales o *E.coli*). En estos estudios se realizó el monitoreo del crecimiento de la flora microbiana y se cuantificó el nitrato y nitrito a diferentes tiempos como se presenta a continuación en los apartados 2.2.1 y 2.2.2.

#### 2.2.1 Estudio del efecto del nitrato sobre la flora microbiana presente en leche cruda

Se utilizó un experimento factorial 2x3 como se describe en el siguiente cuadro:

**Cuadro 5.** Diseño experimental para leche cruda adicionada con nitrato alimenticio o agrícola

Tiempo (h)	Nitrato Alimenticio		Nitrato Agrícola	
	150ppm	800ppm	150ppm	800ppm
0	T <sub>0</sub> A <sub>150</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>800</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>150</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>800</sub>
1	T <sub>1</sub> A <sub>150</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>800</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>150</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>800</sub>
5	T <sub>5</sub> A <sub>150</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>800</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>150</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>800</sub>

T=Tiempo, A= Nitrato alimenticio, AG= Nitrato agrícola

Cada tipo de nitrato y concentración se adicionó a 100mL de leche cruda en un tiempo inicial 0 y su subsecuente monitoreo hasta las 5 horas. La concentración de nitrato se eligió en función de las proporciones que indica la legislación mexicana (150 ppm) y el empleado por los artesanos (800ppm). Los 12 experimentos se realizaron por triplicado.

Se hicieron análisis microbiológicos para evaluar el crecimiento de la flora microbiana presente: Mesófilos, Psicrótrofos, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, Coliformes Totales, Coliformes fecales “*E.coli*”, *Staphylococcus aureus*, Hongos y Levaduras, y *Salmonella* en los tiempos indicados, realizando siembras en medios de cultivo selectivos. Durante los experimentos todas las muestras se mantuvieron a temperatura constante de 37°C.

De manera paralela al estudio microbiológico se cuantificó el nitrato, así como su reducción a nitrito en los tiempos señalados, como se describe más adelante.

### 2.2.2 Estudio del efecto del nitrato sobre bacterias lácticas, coliformes totales y *E. coli* en leche UHT

En esta etapa se sembró leche cruda en medios de cultivo selectivos (apartado 2.3) para obtener cultivos de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, coliformes totales y *E.coli*. Se seleccionaron 10 colonias típicas de cada bacteria citada. Cada grupo microbiano se inoculó por separado en matraces de 100mL de leche esterilizada (UHT). A cada matraz se adicionó nitrato alimenticio o agrícola a las concentraciones citadas en el cuadro 6 y se realizó el seguimiento hasta las 5 horas de contacto.

**Cuadro 6.** Diseño experimental para colonias típicas de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, Coliformes totales o *E.coli* en leche UHT adicionada con nitrato alimenticio o agrícola

Tiempo (h)	<i>Lactobacillus</i>				<i>Streptococcus</i>				Coliformes totales				<i>E. coli</i>			
	Nitrato Alimenticio (ppm)		Nitrato Agrícola (ppm)		Nitrato Alimenticio (ppm)		Nitrato Agrícola (ppm)		Nitrato Alimenticio (ppm)		Nitrato Agrícola (ppm)		Nitrato Alimenticio (ppm)		Nitrato Agrícola (ppm)	
	150	800	150	800	150	800	150	800	150	800	150	800	150	800	150	800
0	T <sub>0</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> AG <sub>2</sub>
1	T <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> AG <sub>2</sub>
3	T <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> AG <sub>2</sub>
5	T <sub>5</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> A <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> AG <sub>2</sub>

T=Tiempo, A<sub>1</sub>= Nitrato alimenticio 150ppm, A<sub>2</sub>= Nitrato alimenticio 800ppm, AG<sub>1</sub>= Nitrato agrícola 150ppm, AG<sub>2</sub>= Nitrato agrícola 800ppm

En esta etapa se llevaron a cabo 64 experimentos en los cuales se determinaron las poblaciones de los grupos microbianos indicados en el cuadro a las 0, 1, 3 y 5 h de contacto con el nitrato. De igual forma se evaluó la capacidad reductora de estos grupos microbianos para transformar nitrato en nitrito a los tiempos mencionados.



Los experimentos para estimar la flora microbiana se llevaron a cabo por triplicado y la cuantificación de nitrito por duplicado.

### 2.3. Técnicas microbiológicas

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo según las condiciones establecidas en la NOM-110-SSA1-1994.

Se tomó una alícuota de 10 mL de muestra y se adicionó a un frasco que contenía 90 mL de agua peptonada previamente esterilizada. Se realizaron las diluciones convenientes y se llevó a cabo la siembra por vaciado en placa. Las condiciones y medios de cultivo selectivos para cada grupo microbiano se describen a continuación:

- Mesófilos: se utilizó agar cuenta estándar, incubando a 32°C, durante 24 a 48 h (NOM-092-SSA1-1994).
- Psicrótrofos: se empleó agar cuenta estándar, incubando a 7°C, durante 7-10 días (NOM-092-SSA1-1994).
- Bacterias lácticas: se utilizó agar M17 para *Streptococcus* y agar MRS para *Lactobacillus*, incubando ambos a 37°C, durante 24-48 h.
- *Staphylococcus aureus*: por la técnica de extensión en superficie utilizando agar Baird-Parker e incubando de 45-48 h a 35°C (NOM-115-SSA1-1994).
- Coliformes totales: por la técnica de doble capa y utilizando agar-rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA), incubando a 35±1°C por 24 h (NOM-113-SSA1-1994).
- Coliformes fecales: por la técnica de NMP. Se realizó una prueba presuntiva utilizando caldo lactosado e incubando por 48 h a 35 ±1°C, posteriormente mediante una prueba confirmativa a partir de las muestras positivas por inoculación en caldo EC e incubación a 44.5°C por 48 h.
- *E coli*: para la estimación de *E coli*, las muestras positivas en caldo EC de coliformes fecales fueron inoculadas por estría en medio EMB, incubación a 35±1°C por 24 h (NMX-112-SSA-1994; NTE INEN 1529-8-1990).
- *Salmonella*: pre enriquecimiento en caldo lactosado e incubación a 35 - 37°C por 18-24 h. Enriquecimiento en caldo Rappaport y caldo tetratonato a 35±1°C (para alimentos fuertemente contaminados) con incubación a 42°C por 18-24 h. Siembra en placa utilizando medio de

cultivo diferencial (XLD) e incubación a 35-37°C, 24-48 h (NOM-114-SSA-1994).

- Mohos y levaduras: se utilizó agar PDA (agar papa y dextrosa) e incubación a 25°C, 48-72 h (NOM-111-SSA1-1994).

El conteo de las colonias representativas para cada grupo microbiano se llevó a cabo de manera visual en placas que tuvieran entre 30 y 300 colonias, o bien dividiendo las cajas en los cuadrantes necesarios cuando el número de colonias fuera mayor al número mencionado (NOM-092-SSA1-1994).

#### **2.4 Determinación de nitratos y nitritos por espectrofotometría**

Se evaluó la capacidad de la flora microbiana presente en la leche para reducir el nitrato a nitrito. Se tomó una alícuota de 2 mL de la muestra de leche adicionada con nitrato (grado alimenticio o agrícola) en los tiempos indicados en el diseño experimental.

Los nitratos y nitritos se determinaron por espectrofotometría, utilizando un Kit colorimétrico para determinación de nitrato y nitrito (Nitrite/nitrate, Colorimetric Method kit. Roche, Mannheim, Germany), un espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Genesys 10s) realizando la lectura a 540 nm. Se elaboró una curva patrón de nitrato/nitrito utilizando nitrato de potasio (Merck, 99.0%) y nitrito de sodio (Sigma-Aldrich, 99.0%) (**Anexo 1**). El procedimiento completo para cuantificar nitrato/nitrito se presenta en el **Anexo 2**

#### **2.5 Determinación de pH**

El pH se determinó en todos los experimentos en los tiempos 0, 1 y 5 horas y 0, 1, 3 y 5 horas, utilizando un potenciómetro (OHAUS, Starter 2100) (NMX-F-317-S-1978).

#### **2.6 Tratamiento estadístico de los datos**

El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 16, los conteos de las colonias estudiadas se transformaron en valores Log<sub>10</sub> calculando las medias logarítmicas con desviación estándar. Los resultados fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA).

# **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Crecimiento de la flora presente en leche cruda en presencia de nitrato

Como se indicó en el apartado de materiales y método, se estimaron las poblaciones de los grupos microbianos: mesófilos y psicrótrofos, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, bacterias lácticas (*Lactobacillus* y *Streptococcus*), Coliformes totales, *E.coli*, hongos y levaduras en las muestras de leche adicionadas con nitrato grado agrícola y alimenticio.

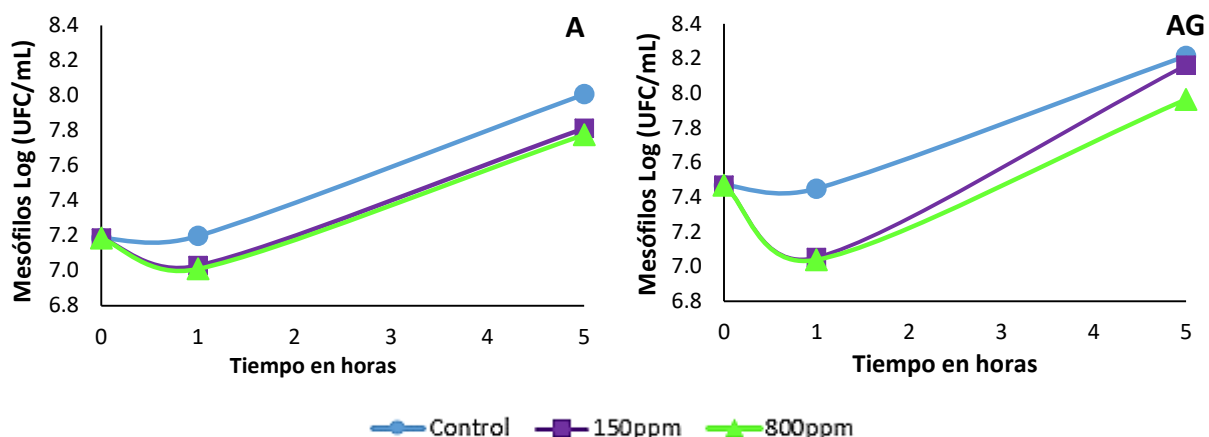
El estudio se llevó a cabo por triplicado con diferentes muestras de leche. El crecimiento de los microorganismos estimados fue variables, como se observa en las figuras que se presentan enseguida. Los resultados se cambiaron a logaritmo base 10 (Log UFC/mL) y se calculó la desviación estándar (**Anexo 3**).

Todas las especies microbianas analizadas presentaron crecimiento durante las 5 horas de contacto con los dos tipos de nitrato (A y AG) y en ambas concentraciones utilizadas (150 y 800 ppm) (**Anexo 3**). El efecto del nitrato adicionado en la hora 1, se determinó con respecto a las poblaciones microbianas iniciales; y a las 5 horas de contacto, con respecto al control (sin nitrato). De manera general hubo un descenso en la mayoría de las poblaciones microbianas en la primera hora; luego, los microorganismos “se recuperan” y retoman el crecimiento (ver figuras).

#### 3.1.2 Crecimiento de bacterias mesófilas en presencia de nitrato

La leche es un medio ideal para el crecimiento microbiano por su alto contenido de agua, pH neutro y un alto valor nutricional (Barbaros y Gülsün, 2014). Las bacterias mesófilas aerobias (BAM) son uno de los principales grupos de indicadores de higiene en el procesamiento y manipulación de los alimentos. Estas bacterias crecen a temperaturas cercanas a la temperatura corporal. Dentro de este grupo se encuentran una amplia gama de géneros saprofitos y patógenos como bacterias Gram+ (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, y *Staphylococcus*), Gram- (*Brucella*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Alcaligenes*), bacterias esporuladas (*Bacillus cereus*), coliformes (*Escherichia coli* y *Enterobacter*) (Walstra et al., 2001).

El crecimiento de bacterias mesófilas sigue una cinética semejante tanto en nitrato grado alimenticio (A) como en nitrato grado agrícola (AG) (Figura 1).



**Figura 1.** Cinética de crecimiento de bacterias mesófilas en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

La calidad sanitaria de la leche se observa en el tiempo 0 (Figura 1). La evolución de la población mesófila en leche cruda adicionada con nitrato grado alimenticio (A) y agrícola (AG) es similar al control sin nitratos. Durante la primera hora de contacto se observa un descenso poblacional de 7.18 a 7.0 Log UFC/mL en el caso de nitrato A, en ambas concentraciones (150 y 800 ppm), con respecto al control donde se observa un aumento de 7.18 a 7.19 Log UFC/mL. De manera similar, con el nitrato AG se observó una disminución de bacterias mesófilas durante la primera hora, de 7.47 Log UFC/mL (población inicial) a 7.0 Log UFC/mL en ambas concentraciones de nitrato, en comparación con el control (7.45 Log UFC/mL). Este comportamiento durante la primera hora de estudio se puede atribuir a la destrucción de alguna especie bacteriana más sensible al nitrato. Se obtuvo una disminución bacteriana notable con la utilización de nitrato AG durante la primera hora de contacto, en comparación con el nitrato A. Esto puede atribuirse a que el nitrato AG utilizado contiene 5% de sulfitos. Los sulfitos, en la forma  $\text{SO}_2$  son agentes antimicrobianos de amplio espectro, con efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de microorganismos, como levaduras y bacterias (Henderson *et al.*, 2009). A partir de la primera hora, las bacterias mesófilas se recuperaron y crecieron de manera semejante al control. Al final de la incubación alcanzaron poblaciones máximas de 7.81 y 7.77 Log UFC/mL en presencia de 150 y 800 ppm de nitrato A, respectivamente, mientras que en el control la población fue de 8.0 Log UFC/mL. Así mismo, la utilización de nitrato AG a 150 y 800 ppm (8.16 y 7.96 Log UFC/mL) alcanzó recuentos similares con respecto al control (8.21 Log UFC/mL).

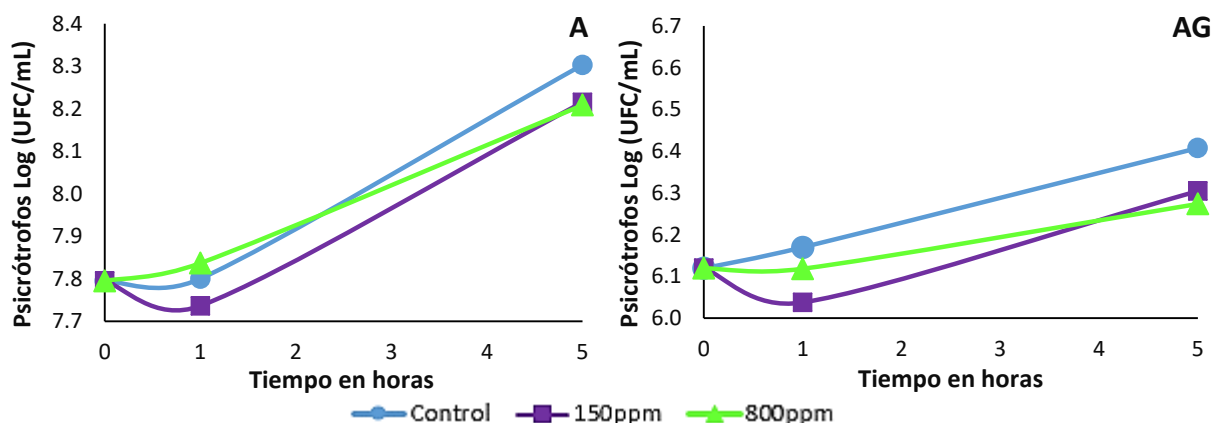
Teniendo en cuenta que no existió una disminución de al menos un ciclo logarítmico y que el nivel de significancia para ambos nitratos a sus dos concentraciones es mayor a 0.05, no hay diferencia significativa en la cinética de crecimiento para todas las

pruebas. Por tanto, los efectos del nitrato dependerán de la dominancia de una especie y de su sensibilidad hacia las sales de nitrato adicionadas (Birzele *et al.*, 2005).

Bayne y Michener (1975) llevaron a cabo la estimación de la cuenta total de bacterias en salchichas con y sin nitrito en un tiempo y temperatura semejantes. Encontraron que la cuenta total al final de los tratamientos alcanzó  $10^6$  UFC/g en los dos tipos de salchicha, concluyendo que el nitrito no impide el crecimiento de BMA en salchicha.

### 3.1.3 Crecimiento de bacterias psicrótrofas en presencia de nitrato

Las bacterias psicrótrofas son aquellas que crecen a temperaturas de refrigeración. Entre ellas se encuentran los miembros del género *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Bacillus*.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de bacterias psicrótrofas en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Un comportamiento semejante al de las bacterias mesófilas se observó en las bacterias psicrótrofas (Figura 2) con un ligero descenso poblacional en la primera hora de contacto. La adición de 150 ppm de nitrato A indujo una disminución bacteriana 7.79 a 7.73 Log UFC/mL y con 800ppm de 7.79 a 7.83 Log UFC/mL. En el caso del nitrato AG la población inicial de 6.11 Log UFC/mL disminuyó a 6.03 Log UFC/mL con 150ppm y se mantuvo en 6.11 Log UFC/mL con 800ppm. Durante las 5 horas de contacto los resultados obtenidos entre el control y las muestras adicionadas con nitrato grado A y AG, indicaron que, con respecto al control, la población microbiana disminuyó de 8.3 a 8.21 Log UFC/mL y de 8.3 a 8.20 Log UFC/mL en el caso de nitrato A 150 y 800ppm, respectivamente. Con el nitrato AG se observó una disminución de 6.40 a 6.30 Log UFC/mL y de 6.40 a 6.27 Log UFC/mL en presencia de 150 y 800ppm,

respectivamente. Sin embargo, el descenso de la población fue inferior a un ciclo logarítmico y no existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

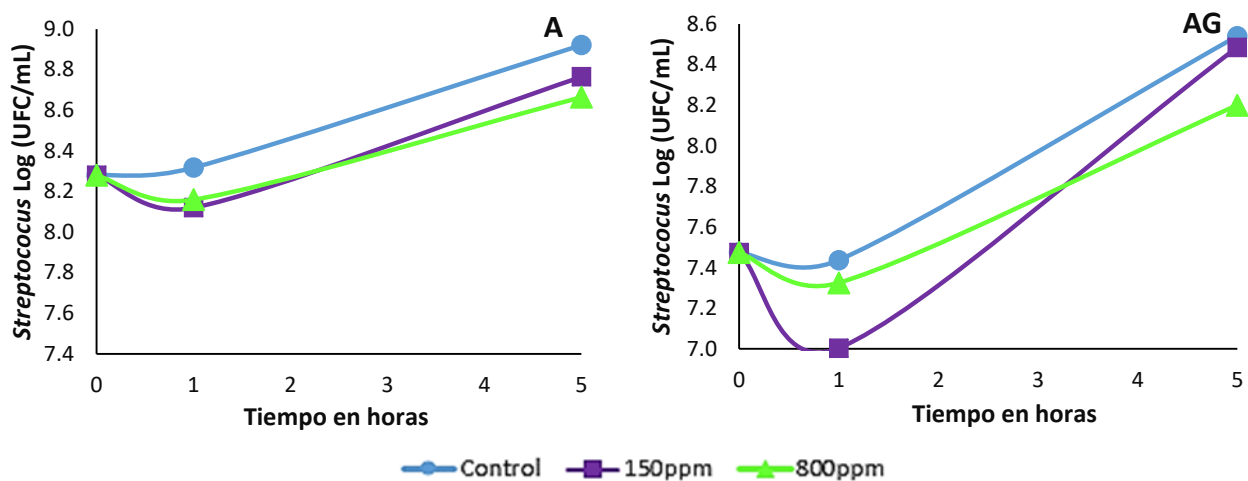
Dentro del grupo microbiano mencionado, el género *Pseudomonas* es el más frecuentemente reportado en leche cruda (Lisandro *et al.*, 2008). Esta bacteria es capaz de generar energía en la ausencia de oxígeno a través de la desnitrificación, proceso durante el cual el oxígeno molecular es remplazado por nitrato como aceptor de electrones. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es reducido en cuatro pasos consecutivos, vía nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico (NO), y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a dinitrogeno ( $\text{N}_2$ ). Este proceso es vital en su crecimiento y supervivencia bajo condiciones anaerobias y microaerobias (Arai *et al.*, 2005).

Ghaffari *et al.* (2006) han demostrado que el gas NO es un agente antimicrobiano eficaz contra *S. aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*. Así mismo en un estudio realizado por Major *et al.* (2010), se evaluó la eficacia general de A- $\text{NO}_2$  (nitrito acidificado) por su capacidad para inhibir tres principales patógenos, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. cepacia*, en condiciones anaeróbicas a pH 6.5, demostrando que el A- $\text{NO}_2$  (nitrito acidificado) inhibe a estas bacterias 1 a 2 logaritmos, después de dos días de incubación. La presencia de óxido nítrico tiene un efecto bacteriostático.

No obstante, a pesar de los reportes anteriores no se ha reportado la inhibición mediante la adición de sales de nitrato ya que el proceso de conversión de nitrato a nitrito depende de muchos factores enzimáticos y de sitios activos (Cammack *et al.*, 1999) para la obtención de NO. Además, la adición intencionada de óxido nítrico para la inhibición es siempre en cantidades superiores a 7.24 mM (512  $\mu\text{g/mL}$ ) (Major *et al.*, 2010) y en el presente estudio es poco probable llegar a esa concentración solo con la conversión enzimática de nitrato.

### **3.1.4 Crecimiento de *Streptococcus* en presencia de nitrato**

Una parte integral de la microflora de leche cruda son las bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL utilizadas en tecnología lechera pertenecen a los géneros siguientes: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leconostoc* y *Pediococcus* (Tamime, 2009), las cuales son un grupo de bacterias que fermentan la lactosa a lactato (Quigley *et al.*, 2013) en la producción de quesos frescos artesanales. En el presente estudio se cuantificaron las poblaciones pertenecientes al género *Streptococcus* durante las 0, 1 y 5 horas de contacto de leche cruda con nitrato grado A, AG y en el control sin nitrato.



**Figura 3.** Cinética de crecimiento para *Streptococcus* en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Al igual que en los grupos bacterianos anteriores, se observó una disminución de *Streptococcus* durante la primera hora de contacto (Figura 3), siendo más evidente en presencia de nitrato AG. Durante la primera hora de contacto, se observó una disminución de nitrato A 150 ppm y 800 ppm de 8.27 a 8.11 y 8.15 respectivamente. Para el caso de nitrato AG a la 1h en comparación con el control existió una disminución de 7.43 a 7.00 Log UFC/mL con 150 ppm, mientras que en presencia de 800 ppm hubo una disminución de 7.43 a 7.32 Log UFC/mL. De manera similar, se observó un descenso poblacional a las 5 horas de contacto, con la adición de nitrato A 150 ppm (de 8.92 a 8.76 Log UFC/mL) y 800 ppm (de 8.92 a 8.66 Log UFC/mL). A las 5 horas de contacto, las poblaciones de *Streptococcus* fueron de 8.48 y 8.20 Log UFC/mL, respectivamente, con la adición nitrato AG 150 y 800ppm. En el control fue de 8.54 UFC/mL. Es notable que existe un descenso bacteriano más evidente con la utilización de nitrato AG, similar al comportamiento observado con las bacterias mesófilas. Esto puede atribuirse al contenido de sulfitos en el nitrato AG utilizado, que pueden ejercer una acción antimicrobiana sobre diversos mohos, levaduras y bacterias (Acero, 2006). Sin embargo, tanto la adición de nitrato A como AG en ambas concentraciones no representó una disminución significativa ( $P > 0.05$ ). Por tanto, la adición de este aditivo a la leche cruda no afecta el crecimiento normal de *Streptococcus* durante las 5 horas de contacto.

En la adición de sales de nitrato como antimicrobiano el ingrediente activo es el nitrito que es transformado por bacterias nitrato reductoras (Tortora *et al.*, 2007) o durante la maduración de quesos por la xantina oxidasa presente en la leche o cuajada (Fox *et al.*, 2004). *Streptococcus* ha mostrado ser altamente resistente al nitrito, por lo tanto,



se acepta que estos organismos son impermeables al nitrito (Yarborough *et al.*, 1980). El nitrito inhibe el transporte activo, el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa por la oxidación de hierro ferroso de un portador de electrones tal como la citocromo oxidasa a su forma férrica (Erkmen y Bozoglu, 2016). *Streptococcus faecalis* y *S. lactis*, son bacterias que no dependen del transporte activo o del citocromo y por tanto no son inhibidas por nitrito (Rowe *et al.*, 1979).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado por Radcliffe *et al.* (2002) quienes realizaron un estudio para determinar el efecto del nitrato y nitrito de sodio a diferentes concentraciones (0.2, 2.0, 20 y 200 mM) sobre *Streptococcus mutans* en los tiempos de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0 y 24 h, encontrando que el nitrito a concentraciones de 20 y 200 mM es altamente bactericida para *S. mutans*, inhibiendo la producción de ácido, en cambio todas las concentraciones de nitrato de prueba fueron ineficaces. En este estudio, las pruebas se realizaron únicamente con sales de nitrato, por lo tanto, la transformación a nitrito implicaba la presencia de bacterias nitrato reductasas en el medio, además de una eficiencia de transformación alta (del cien por ciento). La producción de nitrito (se aborda más adelante) por medios enzimáticos para la inhibición de *Streptococcus* fue menor a la reportada por Radcliffe *et al.* (2002) por ello, es que no existe una inhibición significativa.

### 3.1.5 Crecimiento de *Lactobacillus* en presencia de nitrato

El género *Lactobacillus* forma parte de las BAL presentes en la microflora de leche cruda. Entre los más importantes de su género se encuentran: *Lactobacillus casei subsp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* (Bluma y Ciprovcica, 2015). La producción higiénica de leche cruda contiene  $10^2$  UFC/mL (McSweeney *et al.*, 1999). La evolución o multiplicación de lactobacilos presentes en leche cruda adicionada con nitrato A y AG se observa en la figura 4.

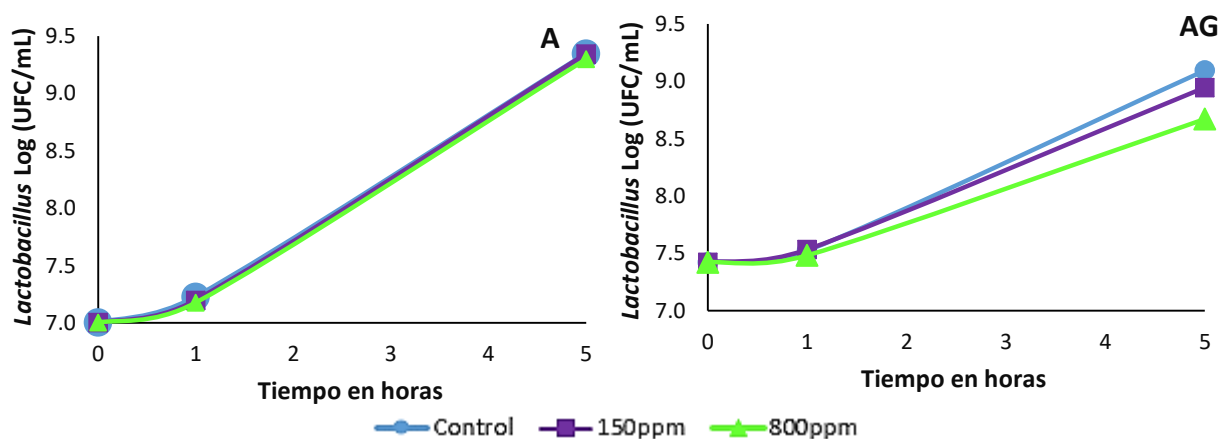


Figura 4. Cinética de crecimiento para *Lactobacillus* en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Los resultados muestran que las poblaciones de *Lactobacillus* fueron similares durante la primera hora de contacto. Durante las 5 horas de contacto con la adición de 150ppm y 800ppm de nitrato A, a la leche cruda, los conteos fueron de 9.34 y 9.30 Log UFC/mL, respectivamente, en comparación con el control con poblaciones de 9.34 Log UFC/mL. No existe variación considerable ( $p > 0.05$ ) entre el control y la adición de nitrato A. De igual forma la adición de nitrato AG no alteró el crecimiento normal de *Lactobacillus*, ya que la leche control (9.0 Log UFC/mL) presentó poblaciones similares a las muestras adicionadas con nitrato AG a 150ppm (8.94 Log UFC/mL) y 800ppm (8.67 Log UFC/mL).

La ineficacia de este aditivo como antimicrobiano sobre las bacterias en estudio es debido a que los nitratos y el producto de la transformación de este por bacterias nitrato reductasa ( $\text{NO}_2^-$ ) no afectan el crecimiento de bacterias ácido lácticas (Fox, 2012), puesto que los nitritos solo inhiben bacterias aerobias al unirse al hierro hemo de la citocromo oxidasa (Woods, 1989) y el género *Lactobacillus* carece de citocromos ya que no utiliza oxígeno como aceptor de electrones (Tortora *et al.*, 2007) por lo que el nitrato y sus productos de transformación no pueden ejercer una acción bactericida sobre este género.

En un estudio realizado por Castellani y Niven (1955) las especies de BAL: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus lactis*, y *Enterococcus* probadas fueron relativamente tolerantes al nitrito. Por otra parte, la cepa de *Streptococcus pyogenes* probada fue extremadamente sensible. Muy inesperadamente, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mitis* fueron relativamente sensibles en condiciones anaerobias (con presencia de glucosa estéril en el medio), pero eran resistentes en condiciones aerobias. Estas dos especies, se consideran "indiferentes" al oxígeno con respecto a sus requerimientos de crecimiento y no poseen los sistemas de enzimas respiratorias que contienen hierro hemo para obtener energía aeróbicamente. En consecuencia, de este comportamiento Barron y Singer (1945) teorizaron que el nitrito inactiva ciertos sistemas enzimáticos bacterianos que poseen un grupo sulfhidrilo activo, inhibiendo así la producción de piruvato para la obtención de energía.

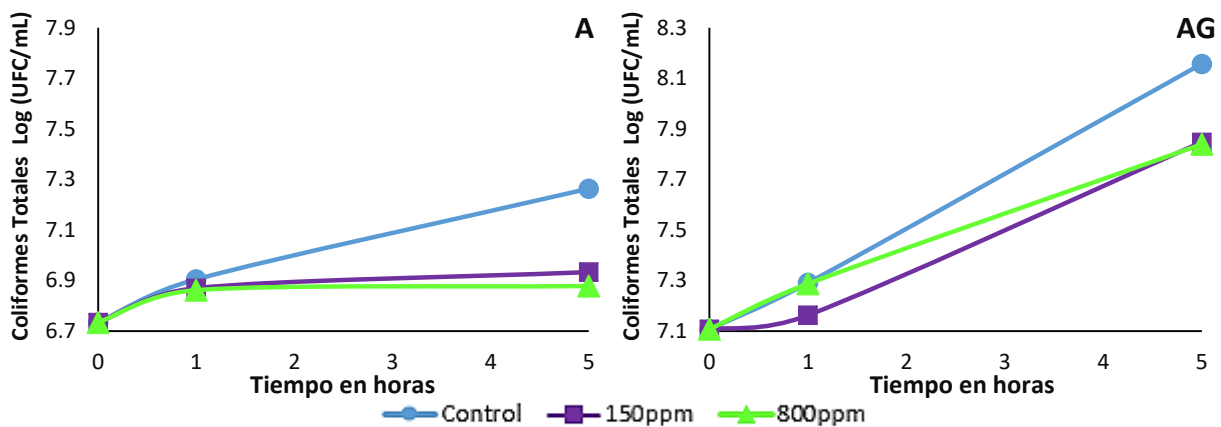
Por lo tanto, la eficiencia del nitrato como antimicrobiano depende en gran medida de la transformación de nitrato a nitrito, la presencia o ausencia oxígeno y la afinidad del nitrito sobre los sistemas enzimáticos bacterianos.

### **3.1.6 Crecimiento de coliformes totales en presencia de nitrato**

La presencia de coliformes es un indicador del grado de contaminación fecal. En el caso de la leche cruda, se convierte en un evaluador del grado de limpieza de las manos de los operarios, de la limpieza y desinfección de la piel de los pezones y de las pezoneras, entre otras. Se afirma que en leches crudas no se pueden encontrar más de 1000 coliformes/mL. La legislación americana reconoce como norma 750

UFC/mL y se establece que la leche considerada como ideal debe contener menos de 50 UFC/mL, mientras que la NOM-184-SSA1-2002, indica que los organismos coliformes totales en el punto de venta (producto sometido a pasteurización) deben ser menores a 20 UFC/mL (Calderón *et al.*, 2006).

La figura 5 muestra las poblaciones de coliformes totales provenientes de leche cruda estimadas durante 5 horas de contacto con nitrato A y AG.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento para bacterias Coliformes totales en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

A las 5 horas de contacto del nitrato A (150 ppm y 800 ppm) se obtuvieron poblaciones de 6.93 Log UFC/mL y 6.87 Log UFC/mL de bacterias coliformes totales respectivamente (Figura 5), y fueron menores a las obtenidas en el control (7.26 Log UFC/mL). En el caso de nitrato AG (150 ppm y 800 ppm) se observó una disminución similar, de 8.15 a 7.84 Log UFC/mL y 8.15 a 7.83 Log UFC/mL, respectivamente, con respecto al control. A pesar de existir una disminución en la población presente, ésta no es significativa ( $p > 0.05$ ). Por tanto, el nitrato no puede considerarse como un antimicrobiano eficaz contra coliformes totales, pues solo retrasa el crecimiento bacteriano, sin embargo, no lo impide.

La disminución bacteriana podría deberse a diferentes factores. Yarbrough *et al.* (1980) determinaron que el efecto del nitrito sobre bacterias anaerobias facultativas se debía a que el nitrito inhibe el transporte activo de prolina, un ejemplo de ello es *E. coli*. Sin embargo, existen otros mecanismos de obtención de energía para este tipo de bacterias. Además, aunque está demostrado que *E. coli* cuenta con nitrato reductasas formadoras de nitrito, y nitrito reductasas que transforman el nitrito a óxido nítrico (NO), que ha probado tener un efecto antimicrobiano, existe evidencia de que bacterias como *E. coli* cuentan con mecanismos de resistencia al óxido nítrico, como flavohemoglobina que desempeña un papel en la protección contra agentes nitrosantes y las especies

relacionadas con el óxido nítrico y el estrés oxidativo (Membrillo *et al.*, 1999). Otras investigaciones también han revelado la presencia de un importante sistema inducible involucrado en la reducción y desintoxicación de NO (Poock *et al.*, 2002).

Aunado a lo anterior existen otras bacterias que pertenecen a este grupo, entre las cuales se encuentra *Enterobacter* y *Citrobacter*. Ridley *et al.* (2006) han señalado que *Enterobacter cloacae* cuenta con enzimas nitrato reductasas que transforman el nitrato a nitrito tal y como lo hacen las enzimas nitrato reductasas en *E. coli*; mientras que Huang y Tseng (2001) demostraron que *Citrobacter diversus*, un microorganismo aerobio desnitrificante, usa el nitrato como aceptor terminal de electrones reduciendo los nitratos hasta nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>), lo cual también es un factor directo para imposibilitar la inhibición de bacterias de este grupo.

Sanz *et al.* (1997) realizaron un estudio para determinar el efecto de nitrato y sales de nitrito sobre los cambios microbianos en embutidos curados, encontrando que *Enterobacteriaceae* muestra niveles máximos de 10<sup>5</sup> UFC/g en la fermentación, pero durante la maduración, al cuarto día de proceso, los niveles disminuyeron a 10<sup>4</sup> UFC/g.

Tsai y Chou (1996) determinaron que la adición de 200 o 400 mg/L de nitrito de sodio a 37 °C y pH 5.0 inhibían completamente el crecimiento de *E coli* 0157: H7, mientras que a pH 7.0 y 8.0, el nitrito no ejercía ninguna acción inhibitoria sobre las cepas de *E coli* 0157: H7 probadas en un período de cultivo de 24 h.

En comparación a los resultados obtenidos por Sanz *et al.* (1997) donde se observó inhibición; Tsai y Chou (1996) destacaron que para dichos experimentos se adicionaron sales de nitrito y no nitrato como en nuestros experimentos, además de que las condiciones fueron distintas, pues se llevó a cabo un proceso de fermentación y maduración en el primer caso y en el segundo caso, el pH que presentaba la muestra era menor al utilizado en este estudio.

### **3.1.7. Crecimiento de coliformes fecales en presencia de nitrato**

Al examinar los efectos del nitrato de potasio sobre bacterias coliformes fecales se observó una disminución cuando se utilizó nitrato AG a 800 ppm durante la primera hora de contacto en comparación con los otros experimentos (Figura 6), volviendo a retomar su crecimiento y alcanzando cuentas similares al control al final del tratamiento. Esto puede deberse a la composición del nitrato AG el cual contiene 5% SO<sub>2</sub>. Debe considerarse la posibilidad de que exista reactividad de los sulfitos que contenían las sales de nitrato AG utilizados, ya que se ha documentado que la forma SO<sub>2</sub> tiene un efecto antimicrobiano en hongos, levaduras y bacterias (Fugensalg y Edwards , 2007), lo que podría explicar la causa de este comportamiento.

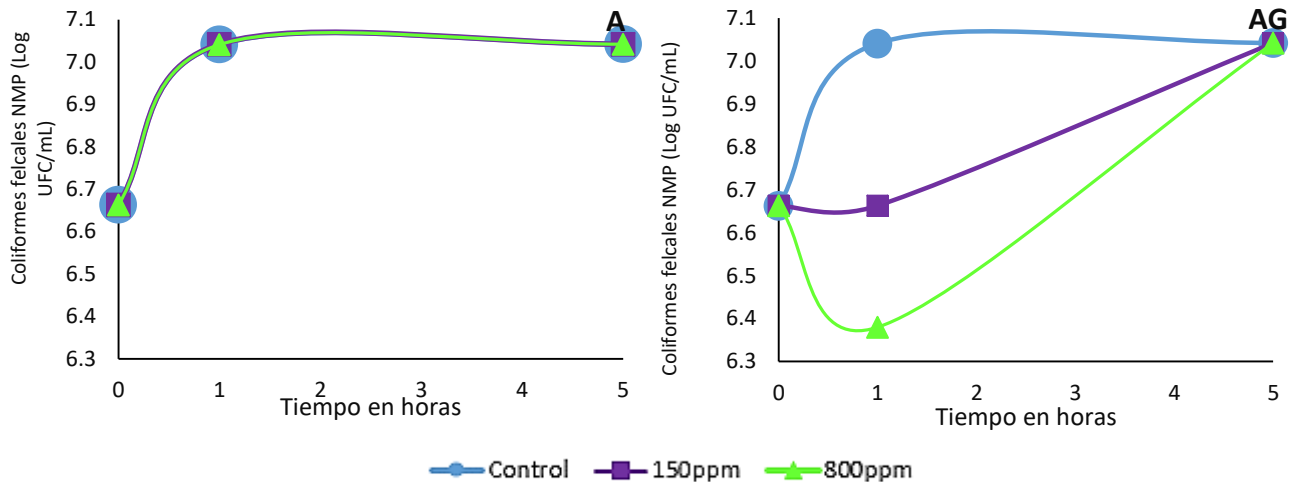


Figura 6. Crecimiento para coliformes fecales en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Patógenos entéricos transmitidos por los alimentos tales como *Escherichia coli* sintetizan tres diferentes enzimas nitrato reductasas (Lundberg *et al.*, 2004), las cuales catalizan la reducción del nitrato al nitrito (Potter, 2001). En primer lugar, se encuentra en el citoplasma una nitrato reductasa asimilable soluble (NAS). En segundo lugar, las nitrato reductasas que conservan energía y cuentan con sitios catalíticos localizados en el citoplasma, están asociadas con la membrana citoplasmática de la cual reciben electrones para la reducción de nitratos (NAR) (Berks, 1995) y en tercer lugar, las nitrato reductasas solubles y periplasmáticas (NAP); los tres tipos son molibdo proteínas (Richardson, 1999).

Asimismo, en función de sus requerimientos se ha demostrado que *Escherichia coli* ha desarrollado mecanismos de desintoxicación cuando está en presencia de NO para asegurar su supervivencia. Se han encontrado tres enzimas en particular que han sido implicados en la eliminación de NO; flavohemoglobina, flavorubredoxina, y el citocromo c nitrito reductasa (Justino y Vicente, 2005).

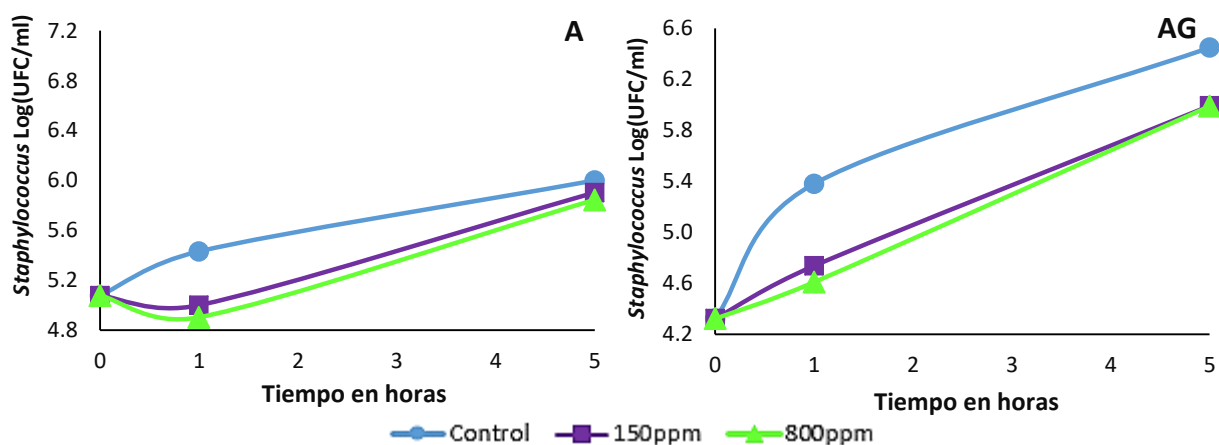
La flavohemoglobina es una proteína citoplásmica expresada en presencia de nitrato durante el crecimiento aeróbico y anaeróbico (Gardner, 2005). En presencia de oxígeno la flavohemoglobina convierte el nitrato en NO, mientras que, en ausencia de oxígeno, la flavohemoglobina convierte el NO a nitroxilo (NO<sup>-</sup>). Sin embargo, las tasas de reducción de NO son significativamente inferiores a las de oxidación de NO y pueden no ser suficientes para su efectiva desintoxicación. Bajo tales condiciones anóxicas la flavorubredoxina y el citocromo c nitrito reductasa podrían proporcionar catalizadores alternativos para la extracción de NO (Gardner *et al.*, 2002). La flavorubredoxina es una proteína citoplasmática que reduce el NO; sin embargo, hay relativamente poca información disponible sobre la cinética de eliminación de NO por

el citocromo c nitrito reductasa periplásmica, esta puede representar la primera línea de defensa hacia el NO generado de forma exógena (Wonderen *et al.*, 2008).

### 3.1.8. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de nitrato

En el caso de *Staphylococcus* la presencia de éstos en leche cruda es muy recurrente, donde *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico podría encontrarse desde el momento de su obtención, o bien llegar potencialmente a dichos productos a partir de su manipulación, encontrando en ellos medios adecuados para su multiplicación (Faría *et al.*, 1999). Los estafilococos son agentes etiológicos importantes en la producción de mastitis infecciosa, la cual ha causado grandes pérdidas económicas por su significativa presencia en la mayoría de los países (Fox y Gay, 1993).

Los resultados obtenidos muestran que esta bacteria no fue inhibida (Figura 7). El efecto del aditivo disminuyó la población ligeramente y luego de las primeras horas de contacto, las bacterias retomaron su actividad y crecieron de manera similar al control.



**Figura 7.** Cinética de crecimiento para *Staphylococcus* en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Con respecto al control, se observó que el crecimiento de estafilococos disminuyó en la primera hora de contacto, de 5.43 a 5.00 Log UFC/mL y 5.43 a 4.90 Log UFC/mL, respectivamente, en presencia de 150 ppm y 800 ppm de nitrato A. Sin embargo, estas igualaron el crecimiento a las 5 horas de contacto. De igual manera, cuando se adicionaron 150 ppm y 800 ppm de nitrato AG la población de estafilococos disminuyó en la hora 1 de 5.38 a 4.73 Log y 5.38 a 4.60 y de UFC/mL respectivamente; no obstante, a las 5 horas el crecimiento fue similar al control.

La disminución bacteriana observada en la primera hora de estudio puede deberse a la sensibilidad al nitrito de alguna especie del género *Staphylococcus*. Por otro lado, existe una clara tendencia en la disminución microbiana con la utilización de nitrato AG (a las 5 horas, con respecto al control). Esta tendencia se ha visto en otros grupos

microbianos considerados en este estudio, y se puede atribuir a que este tipo de nitrato contiene sulfitos, el cual es un agente antimicrobiano o de acción bacteriostática sobre algunas bacterias (Bello, 2000). Aun no se conoce totalmente el modo de acción de los sulfitos. Algunas teorías se basan en que el  $H_2SO_3$  entra en la célula microbiana, reaccionando con el acetaldehído de la célula, reacciones con enzimas que presentan enlaces bisulfuro o interferencia con los mecanismos de respiración en los que interviene el dinucleótido de nicotinamida (Acero, 2006).

Se ha señalado que el pH, oxígeno presente y la adición de un sustrato (glucosa) en el medio, influye en la acción bacteriostática del nitrito de sodio sobre *S. aureus*. Buchanan y Solberg (1972) realizaron un estudio sobre la interacción del nitrito de sodio sobre *S. aureus*, encontrando que la eficiencia del nitrito como antimicrobiano solo se presentaba en condiciones anaerobias a pH menores a 6.3. Castellani y Niven (1955) demostraron que *S. aureus* era más resistente a la inhibición al adicionar sustratos en el medio bajo condiciones anaerobias. La inhibición puede darse por diferentes mecanismos de acción, como la reacción del nitrito con los grupos sulfhidrilo de la coenzima A o cofactores de ácido lipóico involucrados en el metabolismo del piruvato, aunque no se presentó evidencia (Buchanan y Solberg, 1972).

Otros factores que destacan son la influencia del nitrito sobre la disponibilidad de sustancias con grupos sulfhídrico que son requeridos por las bacterias para su metabolismo, como cisteína o glutatión (Castellani y Niven, 1955)

Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Bayne y Michener (1975), quienes realizaron un experimento en salchichas con y sin nitrito, inoculadas con *Staphylococcus*; encontraron que el nitrito no es un inhibidor. Asimismo Castellani y Niven (1955) hallaron evidencia de que el nitrito no es un inhibidor fuerte contra *Staphylococcus* y que puede multiplicarse en presencia de concentraciones extremadamente altas de nitrito de sodio, bajo condiciones aerobias e incluso a pH bajos (menor a 5.4) en presencia de 140  $\mu g$  de nitrito por gramo.

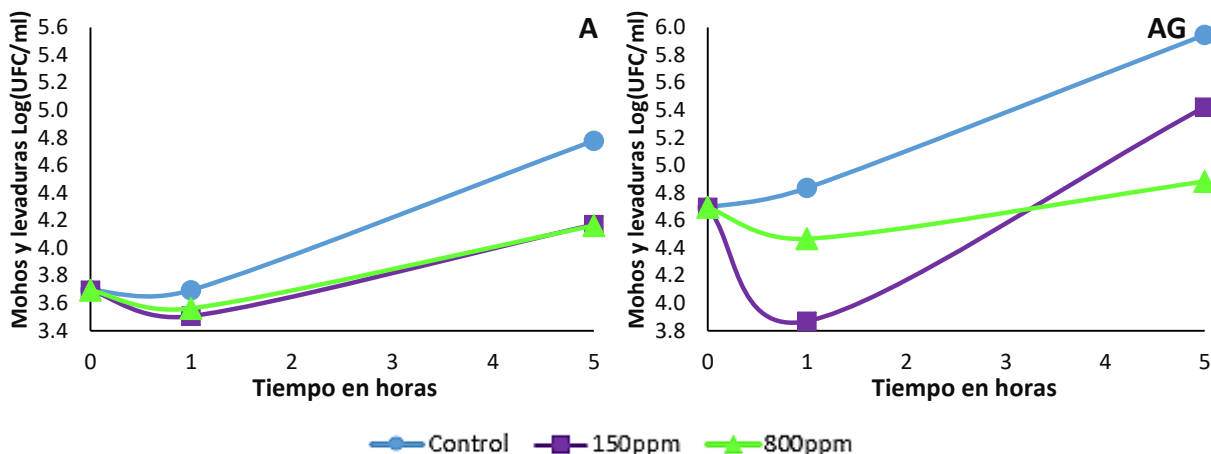
Pese a lo anterior, los microorganismos que son relativamente tolerantes al nitrito a diversas condiciones son capaces de utilizar otras fuentes de azufre para su nutrición, eliminando así la disponibilidad limitada de una fuente de azufre en presencia de alguna concentración de nitrito, dando una respuesta más objetiva al comportamiento de *Staphylococcus* en el presente experimento, ya que el medio es una fuente de aminoácidos con grupos sulfhídrico disponibles.

### **3.1.9 Crecimiento de mohos y levaduras en presencia de nitrato**

Los mohos y las levaduras están ampliamente distribuidos en el ambiente y pueden ser encontrados como parte de la flora normal de un producto alimenticio, sobre los

equipos inadecuadamente sanitizados, o como contaminantes del ambiente (APHA, 1992). La presencia de mohos y levaduras en leche cruda son un indicador de contaminación.

En el caso particular de las levaduras, éstas poseen determinadas características que les permiten crecer y contaminar alimentos de origen lácteo, entre ellas la fermentación/asimilación de la lactosa, producción de enzimas proteolíticas extracelulares, por ejemplo: lipasas, asimilación de ácido láctico y cítrico, crecimiento a bajas temperaturas y halo tolerancia (Ratón y Milagros, 2004).



**Figura 8.** Cinética de crecimiento para mohos y levaduras en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Los recuentos obtenidos para mohos y levaduras observados en la figura 8 muestran que con la utilización de nitrato A, a la hora 1, hubo una disminución de 3.69 a 3.50 con 150 ppm y de 3.69 a 3.56 Log UFC/mL con 800 ppm. Por otro lado, existe una inhibición en el crecimiento de estos microorganismos en la primera hora de contacto con nitrato AG 150 ppm y 800 ppm, obteniendo un descenso de 4.69 Log UFC/mL (población inicial) a 3.86 y 4.46 Log UFC/ mL respectivamente; en el control no hubo efecto (4.83 Log UFC/mL). Durante las 5 horas de contacto con nitrato, la población de mohos y levaduras aumenta como en el caso de todas las especies microbianas analizadas. Las poblaciones de mohos y levaduras disminuyeron a las 5 h con nitrato AG, respecto al control (5.94 UFC/mL), con 150 ppm descienden a 5.42 Log UFC/mL y con 800 ppm a 4.88 Log UFC/mL, sin presentar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Con nitrato A hubo un descenso a 4.1 Log UFC/mL en ambas concentraciones de nitrato (150 y 800 ppm) con respecto al control (4.7 Log UFC/mL).

Es bien sabido que el nitrato o nitrito no es considerado como un eficaz antimicrobiano contra hongos y levaduras. Sin embargo, la utilización de otros ácidos débiles como sulfitos, sorbatos y benzoatos, se utilizan ampliamente para prevenir el deterioro de



alimentos. Éstos no matan a los mohos y levaduras, sino que inhiben el crecimiento causando fases de retardo muy prolongadas.

Existe una disminución microbiana de al menos un ciclo logarítmico a las 5 horas de contacto con nitrato AG 800 ppm (con respecto al control). Se puede considerar que la presencia de sulfitos y otros componentes ácidos en este tipo de nitrato (usado como fertilizante) ejercen la acción antimicrobiana. Esto se fundamenta en el hecho de que las levaduras y los mohos son más sensibles a la acción de los sulfitos que las bacterias, teniendo acción fungicida aunque se encuentre en concentraciones muy bajas (Bello, 2000). Por lo tanto, la inhibición observada en los resultados obtenidos podría deberse a la composición del nitrato de potasio utilizado.

Gallón (2015) ha reportado que la utilización de sulfato de zinc a concentraciones mayores del 7% ejerce una acción antimicrobiana contra *Candida albicans* afectando directamente sus células, produciendo lisis y generando un cambio en su morfología, lo cual impide un crecimiento normal. Esto coincide con lo visto por Lambert y Stratford (1999) quienes realizaron un modelo de inhibición microbiana, mediante el uso de cuatro ácidos débiles (nitrito, sulfito, benzoato y sorbato) demostrando que su adición en el medio provoca un efecto bacteriostático contra *Saccharomyces cerevisiae*.

### **3.1.10 Crecimiento de *Salmonella* en presencia de nitrato**

La leche cruda puede albergar *Salmonella* y ser causa de brotes de salmonelosis. Este producto se contamina a través de los personas o la mama, así como a partir de las manos del ordeñador. La pasteurización de la leche reduce considerablemente su presencia y se destruyen o inactivan durante la fermentación de productos lácteos de alta acidez como el queso de pH inferior a 4,5 (Pascual, 2005).

En la realización de las pruebas para determinar la efectividad de nitrato como antimicrobiano, todas las muestras utilizadas estuvieron ausentes de *Salmonella*.

Bayne y David (1975) inocularon salchichas con *Salmonella* después de su procesamiento, simulando así la ruta probable por la cual podría ocurrir la contaminación en el manejo comercial y en el hogar. El crecimiento de *Salmonella* no fue evitado por la concentración de nitrito residual (39 µg/mL) y el pH (5,5) en salchichas. Por lo tanto, no se encontró evidencia alguna de que el nitrito, añadido al nivel máximo permitido antes del procesamiento, impidiera el crecimiento de estos organismos por sí mismo o a través de la formación de productos de reacción antibacterianos. Por lo cual, a pesar de que no se encontró *Salmonella* en las muestras, existe evidencia de que esta bacteria patógena consta de mecanismos que la protegen contra el estrés oxidativo y nitrosativo (Membrillo *et al.*, 1999).

Mühlig *et al.* (2014) mostraron que el pH citoplásmico de *S. typhimurium* se reduce después de la adición de  $\text{NaNO}_2^-$  a pH 5.5. Este estudio proporcionó la primera evidencia de que la acidificación intracelular es un modo de acción antibacteriano adicional. Los cambios de la transcripción observadas en la respuesta adaptativa afectan principalmente a genes implicados en la homeostasis del hierro y la respiración anaerobia. Por otra parte, la lisina descarboxilasa CadA juega un papel importante en la protección de *S. typhimurium* contra  $\text{NaNO}_2^-$  acidificado, mediada por el estrés. Esto implicaría que  $\text{NaNO}_2^-$  acidificado de alguna manera perturba el pH intracelular de *S. typhimurium* (Mühlig *et al.*, 2014). La descarboxilación de la lisina a cadaverina poliamina consume un protón intracelular, y la cadaverina posteriormente se exporta a cambio de lisina extracelular a través del antiporter (Park *et al.*, 1996). Ambas reacciones contribuyen a la homeostasis del pH y del medio extracelular.

### 3.2. Reducción del nitrato por la flora presente en la leche

En la industria láctea la adición de nitrato de sodio o potasio a la leche utilizada para la elaboración de quesos semiduros, se efectúa para prevenir la fermentación butírica y el desarrollo de bacterias de las especies *Clostridium tyrobutyricum* cuyas esporas sobreviven a la pasteurización normal de la leche (Fox *et al.*, 2004).

Según Munksgaard y Werner (1987) se ha determinado que el nitrato en el queso se reduce a nitrito por la presencia de xantina oxidasa en la leche o por la nitrato reductasa producida por microorganismos. Sin embargo, en la conversión de nitrato a nitrito en el queso participan también otros factores, tales como la temperatura de almacenamiento, cantidad de nitrato adicionado en la elaboración del queso, tiempo y temperatura de maduración y pH del queso (Gray *et al.*, 1979).

Uno de los objetivos de la presente investigación fue estimar el efecto del tiempo de contacto en la reducción de nitratos a nitritos por la flora presente en leche cruda destinada para queso, adicionada con distintas dosis y tipos de nitrato.

De acuerdo al apartado de materiales y métodos, el contenido de nitrato residual se etiquetó como nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), asimismo el contenido de nitrito determinado en el ensayo se reportó como nitrito iónico.

Debido a las condiciones de este estudio, la leche cruda utilizada para los experimentos fue catalogada en dos tipos ya que, dependiendo de la carga microbiológica de éstas, el nitrato tiene un comportamiento distinto. Las muestras de leche en estudio se reportan como “leche poco contaminada” (coliformes 4.6 Log UFC/mL, mesófilos 6.6 Log UFC/mL) y “leche muy contaminada” (coliformes 8.26 Log UFC/mL, mesófilos 8.35 Log UFC/mL) como se observa en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Población microbiana de leche poco contaminada y muy contaminada

Microorganismo	Leche poco contaminada	Leche muy contaminada
<b>Log UFC/mL</b>		
Mesófilos	6.26	8.35
Psicrótrofos	4.65	8.75
<i>Streptococcus</i>	6.00	9.04
<i>Lactobacillus</i>	6.90	9.49
Coliformes totales	5.30	8.20
Mohos y Levaduras	2.30	5.94
<i>Staphylococcus</i>	3.60	7.33
<i>Salmonella</i>	0	0 *
		*Klebsiella

Los resultados para nitrato y nitrito en “leche poco contaminada” se observan en las figuras 9-10 y para “leche muy contaminada” se presentan en las figuras 11-12.

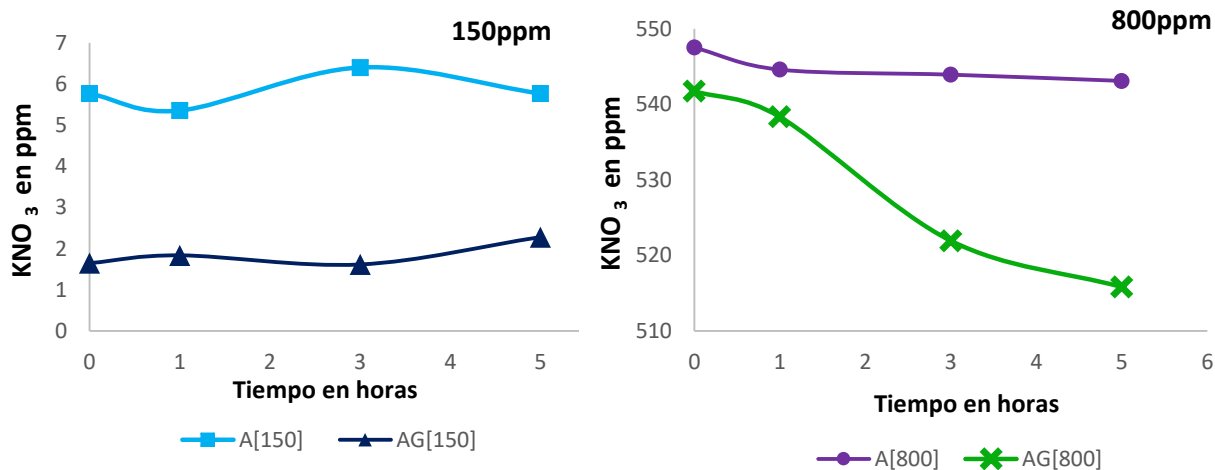
### 3.2.1 Comportamiento del nitrato en leche poco contaminada

En la figura 9 se muestra el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) detectado en el análisis espectrofotométrico durante 5 horas de contacto del  $\text{KNO}_3$  con leche cruda poco contaminada.

A la hora 0 de la adición de nitrato 150 ppm y 800 ppm se realizó la lectura de las respectivas concentraciones, dando como resultado lecturas menores. Para el caso de nitrato AG 800 ppm se leyeron 541.7 ppm de  $\text{KNO}_3$ , y para el nitrato A 800 ppm se detectaron 547.5 ppm. Con 150 ppm con nitrato A y AG adicionados, solo se lograron detectar por espectrofotometría 5.7 y 1.6 ppm de  $\text{KNO}_3$  respectivamente. Existe una pérdida aproximada de 250 ppm en las lecturas con la adición de 800 ppm A y AG. En tanto que al adicionar 150 ppm A y AG hay una pérdida aproximada de 146 ppm.

Se esperaba que la cuantificación de nitrato a la hora 0 fuera semejante a la concentración adicionada, pero fue menor. La disminución en la detección puede atribuirse al tratamiento al que es sometida la muestra (leche). En la técnica utilizada (Anexo 2) la muestra se somete a diversas condiciones que pueden propiciar la pérdida del nitrato adicionado: el volumen específico de muestra, calentamiento, dilución y filtración. Éste último es un factor determinante ya que es probable que se queden trazas de  $\text{KNO}_3$  en el proceso de filtración. Puesto que los resultados obtenidos a la hora 0 de contacto no son iguales a las concentraciones adicionadas, se infiere que la manipulación de la muestra es un factor fundamental en la

cuantificación de nitratos y se estima que se pierden entre 140-250 ppm. Por otro lado, el nitrato AG adicionado no solo contenía  $\text{KNO}_3$ , sino también 5% de sulfitos.



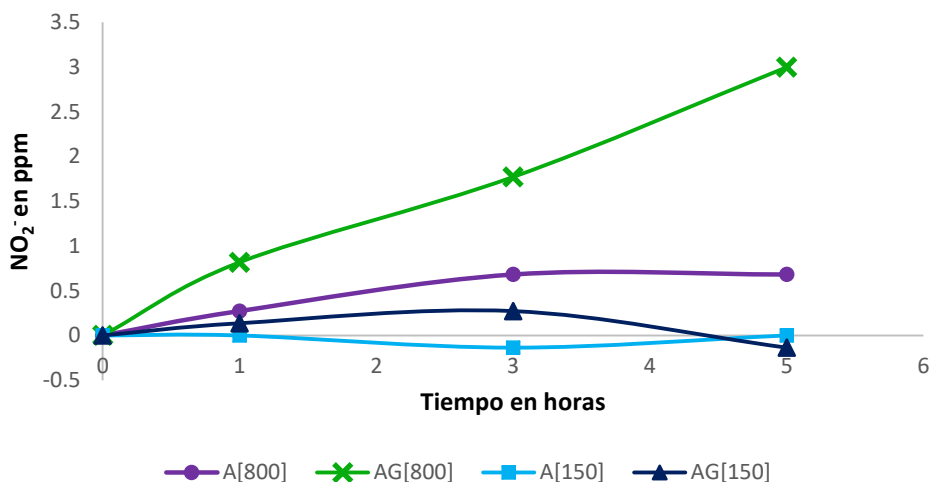
**Figura 9.** Concentración en nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) en leche cruda poco contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones  
A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

En una proporción de 150 ppm, el nitrato A adicionado se mantuvo constante en 5.7 ppm, durante las 5 horas de contacto, mientras que el nitrato AG se mantuvo entre 1.6 y 2.3 ppm. No existe una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) para 150 ppm, en ambos tipos de nitrato.

En una proporción de 800 ppm, el nitrato A se mantuvo en un intervalo de 547.5 ppm y 543.1 ppm, y no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). El nitrato AG disminuyó de 541 a 515 ppm ( $P < 0.05$ ) habiendo diferencia significativa.

En la gráfica izquierda de la figura 9 se observa que el contenido de nitrato es bajo durante las 5 horas de contacto, lo cual se atribuye, como se dijo antes, a las pérdidas durante el tratamiento de la muestra. Lo anterior impidió observar el efecto de la flora presente sobre el nitrato. En cambio, con la adición de 800 ppm de ambos tipos de nitrato (gráfica derecha de la figura 9) se observó una disminución en el tiempo, a pesar de haberse presentado pérdidas durante la preparación de la muestra.

En la figura 10 se presenta la concentración de nitrito en función del tiempo y representa el nitrato transformado a nitrito.



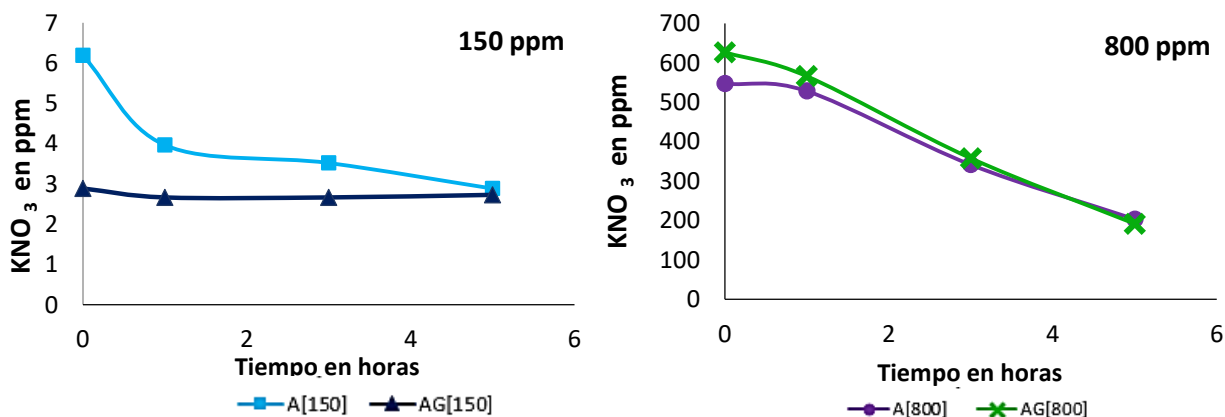
**Figura 10.** Concentración de nitrito iónico (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en leche cruda poco contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Existe un aumento de nitrito iónico durante las 5 horas de contacto (0.0 a 2.9 ppm) con la adición de nitrato AG 800 ppm (Figura 10) y representa el descenso de nitrato que se observa en la figura 9. A las dos concentraciones de nitrato A y con 150 ppm de nitrato AG no hubo un aumento de nitrito y no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en leche poco contaminada.

### 3.2.2 Comportamiento del nitrato en leche muy contaminada

En la figura 11 se observa la reducción de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) grado A y AG en ambas concentraciones en un tiempo de contacto de 5 horas en leche con una carga microbiana alta: 8.11 Log UFC/mL de coliformes totales y 8.15 Log UFC/mL de mesófilos.

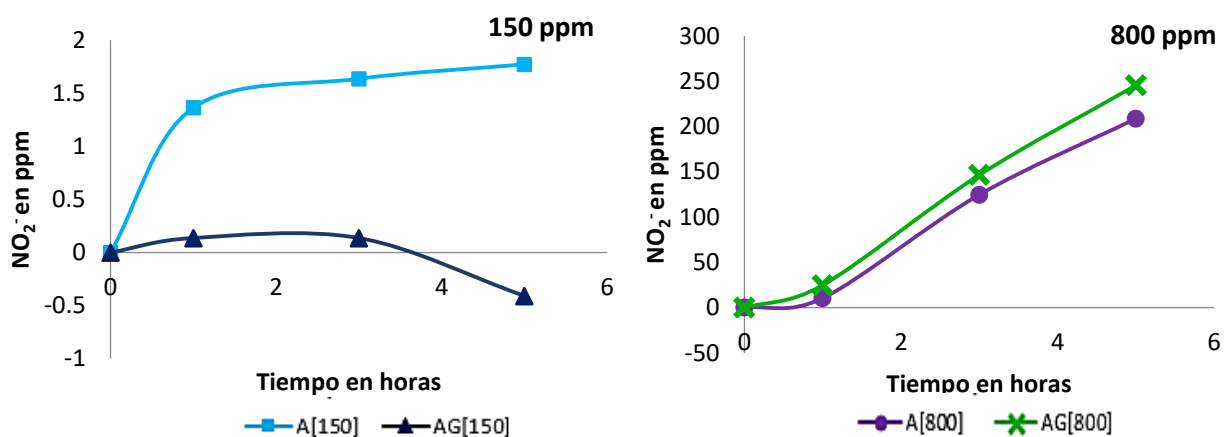


**Figura 11.** Concentración de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) en leche cruda muy contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

A= nitrato grado alimenticio; AG= nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Cuando se adicionaron 150 ppm de nitrato, hubo un descenso de 6.1 a 2.8 con nitrato A y diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), mientras que para el nitrato AG no existe una disminución significativa ( $P > 0.05$ ) durante las 5 horas de contacto. Se observó una disminución de  $\text{KNO}_3$  con la adición de 800 ppm para ambos tipos de nitrato. Hubo un descenso de 547.1 a 203 ppm de nitrato A, mientras que el nitrato AG descendió de 626.7 a 191.4 ppm, ambos con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

La reducción de los nitratos provocó un aumento en la concentración de nitrito en la leche durante el tiempo de contacto, el cual se observa en la figura 12.



**Figura 12.** Concentración de nitrito iónico ( $\text{NO}_2^-$ ) en leche cruda muy contaminada adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones  
A= nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Durante las 5 horas de contacto entre el nitrato y la leche se observó que en las muestras que contenían 800ppm, hubo un incremento de nitrito iónico de 0 a 245.3 ppm para el nitrato A, y de 0 a 208.6 ppm para el nitrato AG, habiendo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). También se observó un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de 1.7 ppm de  $\text{NO}_2^-$  en presencia de 150 ppm de nitrato A. En el caso de nitrato AG 150 ppm no hubo un aumento de nitrito iónico ( $\text{NO}_2^-$ ). Por lo tanto, considerando los resultados de la figura 12, la reducción de nitrato a nitrito coincide con los resultados de la figura 11 ya que existe un aumento de nitrito iónico en presencia de 800 ppm de ambos tipos de nitrato (A y AG) y en presencia de 150 ppm de nitrato A.

La leche constituye un excelente medio de cultivo para determinados microorganismos. La mayoría son no patógenos que pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus* (Hernández *et al.*, 2003). Es una materia prima susceptible a sufrir contaminaciones y su calidad microbiológica es afectada significativamente por el manejo de la ordeña y por la temperatura ambiente en la que se realiza esta actividad (Rojas Ronquillo *et al.*, 2014). Por tal motivo las condiciones de higiene durante la recolección de la leche

cruda pueden permitir la contaminación por vías externas de patógenos como *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *coliformes*, *Pseudomonas* (Magariños, 2000).

Los resultados observados en la figura 9 y 11 muestran que existe una reducción de nitrato en los experimentos realizados con leche poco y muy contaminada en al menos una de las concentraciones y tipo de nitrato. El análisis estadístico de Tukey, confirmó que en la leche con una mayor carga microbiana se produce una mayor reducción de nitrato. Algunas bacterias tienen la capacidad de reducirlo, utilizándolo mediante varios procesos como la asimilación, desaminación y desnitrificación (Rodríguez, 2005) entre las que destacan *Escherichia coli*, *Helicobacter hepaticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thypimurium*, *Shigella, dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Campylobacter jejuni* (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Los conteos microbiológicos de las leches utilizadas indicaron cargas microbianas variables encontrando la presencia de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* las cuales se consideran bacterias reductoras de nitrato pues contienen las enzimas nitrato-reductasas que catalizan la reducción de nitrato a nitrito (Stanier *et al.*, 1977). Por lo tanto, debido a la variabilidad, la leche con una mayor carga microbiana tuvo mayor oportunidad de contener bacterias con enzimas nitrato reductasas generando así una mayor reducción de nitrato a nitrito.

Lo anterior puede explicar el comportamiento en el aumento de nitrito que se observa en las figuras 10 y 12. Los nitratos que se ionizan en solución acuosa a ion  $\text{NO}_3^-$  son reducidos a ion nitrito  $\text{NO}_2^-$  por la acción de las enzimas nitrato reductasas (Bello, 2000) producidas por las enterobacterias encontradas en los análisis microbiológicos realizados.

Los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados por Flint *et al.* (2010) quien concluye que muchas bacterias entéricas, incluyendo cepas de *E. coli K12*, pueden usar el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como aceptor de electrones alternativo cuando el  $\text{O}_2$  es limitante y el nitrato es abundante, en tanto que Burke y Lascelles (1975) encontraron que *Staphylococcus aureus* realizó la conversión completa del nitrato añadido en sus experimentos, generando concentraciones altas de nitrito acumuladas en estos cultivos. Tiso y Schechter (2015) midieron concentraciones relativamente altas de nitrito y amoníaco en cultivos de *E. coli* y *L.plantarum* después de 24 h de crecimiento en presencia de nitrato. Trabajos previos sobre diferentes cepas de *E. coli* han sugerido que las reductasas de nitratos molibdenoenzimas inducidas durante el crecimiento anaerobio son responsables de la formación de nitritos (y posiblemente de NO).

### **3.3 Efecto del nitrato sobre bacterias representativas aisladas de leche**

La seguridad alimentaria implica el cumplimiento de estándares de calidad más exigentes. En la producción de quesos parece complicado alcanzar dichos estándares, en el cual se han encontrado una diversidad de microorganismos patógenos, debido a que la mayoría son elaborados con leche cruda. La composición química de este alimento es una fuente rica en nutrientes para los microorganismos y durante el proceso de elaboración son altamente manipulados (Heredia-Castro *et al.*, 2017). Las bacterias coliformes (totales y fecales) y *E. coli* son dos indicadores de contaminación de origen fecal o falla en la higiene durante el proceso. Esta aseveración permite vislumbrar el riesgo del consumo de quesos y sustenta la presencia de microorganismos patógenos en estos productos (Carrillo y Lozano, 2008).

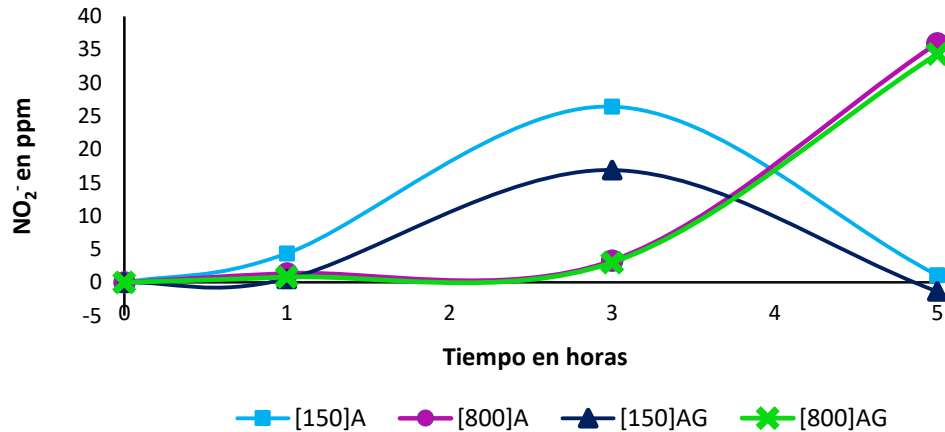
Dentro de las bacterias de mayor importancia económica en la leche, se encuentran las bacterias ácido lácticas, pues debido a sus propiedades contribuyen significativamente a la formación de metabolitos tales como ácidos orgánicos (ácido láctico y acetaldehído), polisacáridos y bacteriocinas (Parra y Adolfo, 2010). Por lo tanto, estos microorganismos son utilizados como cultivos en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, Yogur, mantequilla, crema, kéfir y quesos (Ramírez *et al.*, 2011). En la elaboración de los distintos tipos de quesos se utiliza una gran variedad de microorganismos y los de uso más generalizado son los géneros de *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Valencia, 2001).

#### **3.3.1 Comportamiento de bacterias coliformes totales en presencia de nitrato**

Como se mencionó antes, existen bacterias que se utilizan como indicadores de contaminación en los alimentos y el agua, estas bacterias presentan características fenotípicas, y bioquímicas similares a *E. coli*. Este grupo es representado por *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* y *Klebsiella spp.* Como consecuencia de su gran similitud se utiliza este criterio de coliformes totales para este grupo de bacterias entéricas. Estas bacterias por lo tanto son el objeto de estudio en el siguiente experimento. En el apartado siguiente se visualiza de manera más objetiva el comportamiento de coliformes totales y su interacción con el nitrato en leche UHT.

En los siguientes párrafos se indica la actividad que tienen las bacterias coliformes totales sobre el nitrato A o AG, para reducirlo a nitrito en leche UHT durante 5 horas de contacto. Los resultados se representan en la siguiente figura.



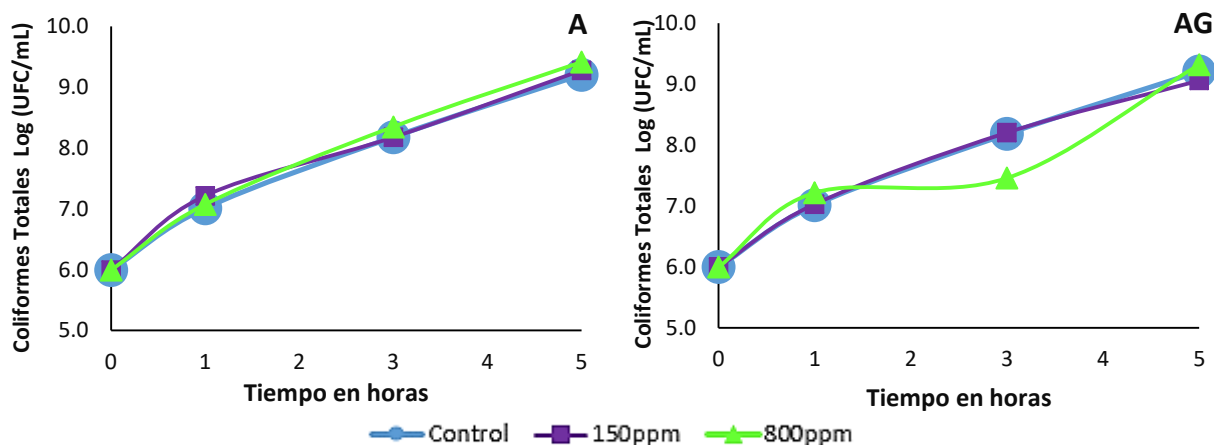


**Figura 13.** Concentración de nitrito iónico ( $\text{NO}_2^-$ ) en leche UHT inoculada con bacterias coliformes  
 Tipo de nitrato: A=grado alimenticio; AG=grado agrícola. Concentración de nitrato: 150 y 800 ppm.

La figura 13 muestra que existe una reducción de nitrato a nitrito en los experimentos realizados en leche UHT. Con una concentración de 150 ppm de nitrato se observa un aumento en la concentración de nitrito (26.44 y 16.9  $\text{NO}_2^-$  ppm) a las 3 horas de contacto, luego van disminuyendo hasta llegar a 0 a las 5 horas. El comportamiento cambia con una concentración de 800 ppm de nitrato: el nitrito aumenta ligeramente hasta las 3 horas y llega a una concentración máxima a las 5 horas de contacto. Esta respuesta en relación a la concentración de nitrato podría indicar que a menor concentración éste se transforma rápidamente en otros productos y puede ser consumido y transformado en NO o amoníaco. En cambio, a mayores concentraciones de nitrato (800 ppm) el nitrito que se va formando pudiera también transformarse en NO y amoníaco, pero como hay suficiente nitrato, éste es reducido a nitrito a una mayor velocidad (que la transformación en NO) y aumenta progresivamente. Así a las 5 horas la concentración de nitrito alcanza 40 ppm en ambos tipos de nitrato. Estos resultados se soportan en los hallazgos reportados por Sparacino-Watkins *et al.* (2014) que reportaron la formación de amoníaco a partir del nitrato, proponiendo que esta reducción se presentaba en dos pasos elementales sucesivos, reduciendo nitrato a nitrito y reducción del nitrito por otras vías (tanto químicas como enzimáticas), ya que sus resultados indicaban curvas asimétricas en forma de campana. Este resultado es comprobable con lo obtenido en este estudio, pues sugiere que el nitrato se convierte primero en nitrito y después de su acumulación se reduce a amoníaco u otros compuestos de nitrógeno reducido.

En este caso los resultados, aunque indirectos, pueden sugerir también la ocurrencia de la fosforilación acoplada al sistema de transporte de electrones entre la deshidrogenasa y la nitrato reductasa ya que *E. coli* tiene la capacidad de utilizar el nitrato como aceptor de electrones. (Takahashi *et al.*, 1956).

### 3.3.1.2 Efecto del nitrato sobre el crecimiento de coliformes totales



**Figura 14.** Cinética de crecimiento para bacterias Coliformes Totales en leche UHT adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

En la figura 14 se presenta la tasa de crecimiento de coliformes totales en presencia de nitrato. Con una concentración de 150 ppm de ambos tipos de nitrato se observó un aumento de tres ciclos logarítmicos de bacterias coliformes, lo cual demuestra que este aditivo no afecta su crecimiento. El mismo comportamiento se observó con 800 ppm (en nitrato A y AG), aunque se presentó una disminución en el crecimiento de la población coliforme a la tercera hora de contacto. Este comportamiento puede ser explicado por la forma en que los coliformes se desarrollan, ya que en un ambiente en presencia de una concentración alta de nitrato serán ligeramente inhibidos, por la sustitución del nitrato como aceptor de electrones en lugar de oxígeno. Luego del descenso de crecimiento, retoman su desarrollo y alcanzan cuentas similares al control al final de los tratamientos. Esto puede sustentarse por lo descrito por Aubel y Egami (1936) quienes sugirieron que el nitrato se usa como agente oxidante en lugar de oxígeno molecular, en otras palabras, que está ocurriendo la "respiración de nitrato". Además, la ausencia de inhibición se fundamenta en que las bacterias coliformes tienen un sistema de extrusión de enzimas nitrato y nitrito reductasas en el que todo el nitrato convertido a nitrito será expulsado de la célula bacteriana y así evitará su muerte (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014).

En el estudio realizado por Takahashi *et al.* (1956), se demostró un comportamiento similar al observado en este estudio. Los autores que usaron bacterias con características aerobias y anaerobias facultativas indicaron que las bacterias mostraron un crecimiento rápido en presencia de nitrato en condiciones anaeróbicas inferiores. Por tanto, es razonable considerar que las bacterias coliformes muestran una respiración típica de nitrato, es decir fosforilación junto con la reducción de nitrato.

### 3.3.2 Comportamiento de *E. coli* en presencia de nitrato

El primer indicador de contaminación fecal fue *Escherichia coli*. Cuando el concepto de indicador fecal se aplicó a la inocuidad de los alimentos, se adicionaron otros criterios. *Escherichia coli*, conocida anteriormente como *Bacterium coli commune* fue identificada por el pediatra Theodoro Escherich cuando intentaba aislar el agente etiológico del cólera (Erich, 1885). Al aislarla y estudiarla, este investigador determinó que es un bacilo anaerobio facultativo y que predomina en el intestino, ya que estaba presente en las heces de los enfermos examinados. Este microorganismo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Schardinger en 1892 fue el primero que propuso el uso de este microorganismo como índice de contaminación fecal porque se pudo aislar con mayor facilidad que cualquiera de los microorganismos patógenos transmitidos por el agua. En los siguientes apartados (3.3.2.1 y 3.3.2.2) se presenta a la bacteria *E. coli*, como representante del grupo coliforme fecal y su interacción con nitrato AG y A en leche UHT.

#### 3.3.2.1 Actividad de *E. coli* sobre el nitrato

En la figura 15 se observa el comportamiento de nitrato A y AG en presencia de *E. coli* en leche UHT. La actividad de *E. coli* sobre nitrato es visualizado en su reducción y cuantificado como nitrito iónico.

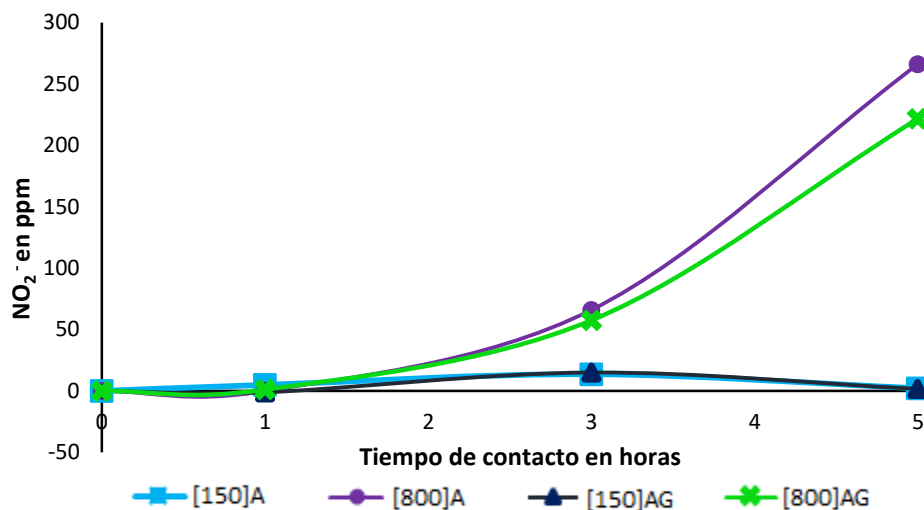


Figura 1513. Concentración de nitrito iónico ( $\text{NO}_2^-$ ) presente en leche UHT con *E. coli*.

A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

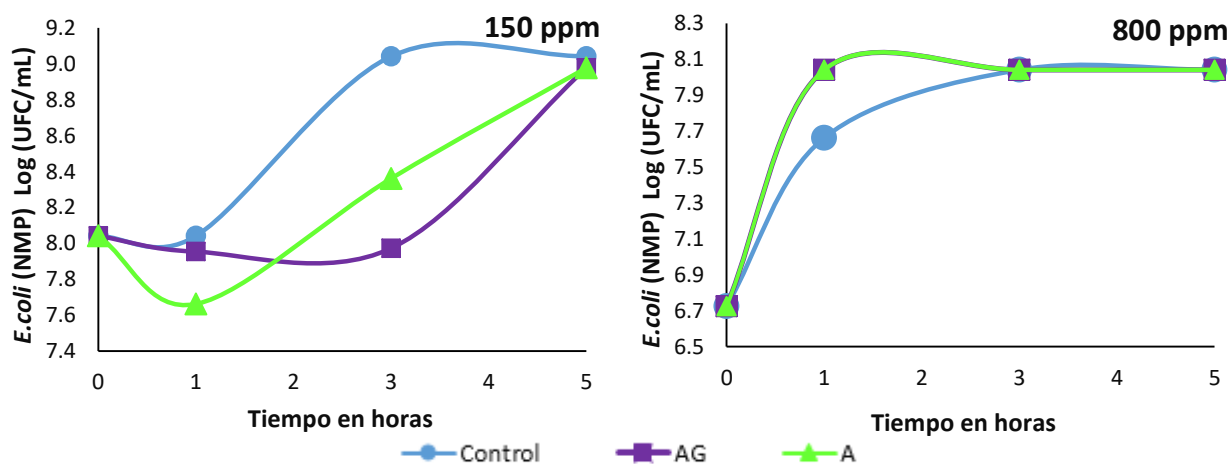
Los hallazgos principales de esta investigación coinciden con lo reportado por Tiso y Schechter (2015) quienes afirman que *E. coli*, como anaerobio facultativo, convierte el

nitrito en nitrito cuando lo tiene disponible y posteriormente, tiene la capacidad de transformar el nitrito en algunas otras moléculas nitrogenadas. Esta afirmación explicaría el comportamiento de *E. coli* sobre el nitrato en la figura 15 ya que se observa un aumento de nitrito de 0 a 266.04 ppm y 221.61 ppm cuando se adicionó nitrato A y AG 800 ppm. Al ser el nitrato el aceptor de electrones preferido para la respiración anaeróbica de esta bacteria se explicaría que en la concentración de 800 ppm todo el nitrato transformado a nitrito pudo excretarse de la célula y se pudo detectar en el experimento como  $\text{NO}_2^-$ . A una concentración de 150 ppm el nitrito detectado empieza a desaparecer con el tiempo debido a que este nitrito puede ser transformado a otras moléculas. Aunado a lo mencionado anteriormente se ha demostrado que en condiciones aeróbicas el único sistema que se logra inducir es el de la nitrato reductasa que se expresa solamente en la fase de crecimiento estacionario.

Por lo tanto, es posible que *E. coli* fuera capaz de emplear mecanismos reguladores eficientes para detectar y reaccionar a cambios en su ambiente, como es el caso de la respiración utilizando aceptores de electrones alternativos, sugiriendo que una de las vías energéticamente favorables para esta bacteria es la respiración de nitrato. En esta vía, se hacen presentes las enzimas nitrato reductasas que convierten el nitrato en nitrito, y nitrito reductasas que favorecen la transformación del nitrito reduciéndolo aún más en amonio u otras moléculas (Gennis y Stewart, 1996). De este modo se puede indicar que la naturaleza de la regulación de las enzimas en *E. coli* puede permitir que la célula aproveche el nitrato de manera eficiente como un aceptor de electrones alternativo bajo condiciones aeróbicas asociadas con el estrés.

### 3.3.2.2 Efecto del nitrato sobre el crecimiento de *E. coli*

En este segmento del estudio se evaluó el efecto del nitrato para disminuir la población de *E. coli* en leche UHT, durante 5 horas de contacto (figura 16).



**Figura 1614.** Cinética de crecimiento de *E. coli* en leche UHT adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Como se observa en la figura no existe inhibición de crecimiento de *E. coli*. La tasa de crecimiento es cercana a un ciclo logarítmico, en ambas concentraciones y tipos de nitrato. Lo anterior puede deberse a las características de la bacteria. Una de ellas es que el genoma de *E. coli* codifica al menos tres tipos de enzimas nitrato reductasas (Lundberg *et al.*, 2004). Se sabe que carece de nitrato reductasas asimilables lo que le da la oportunidad de eliminar el nitrato reducido que utiliza en su sistema (Berks *et al.*, 1995), manteniendo de esta manera el potencial de oxidación-reducción celular, es decir, equilibrio redox, y eliminación de nitratos en forma de nitritos o en otras moléculas (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Estas enzimas utilizan el nitrato como aceptor de electrones y producen nitritos que se vuelven tóxicos para la célula al alcanzar altas concentraciones intracelulares, es por ello que una de sus enzimas, el nitrato reductasa periplásmica (NAP), transporta todos los nitratos reducidos fuera de la de la pared celular evitando así su intoxicación (Jia y Cole, 2005). Junto con el transporte antes mencionado, *E. coli* expresa también dos enzimas nitrito reductasa, la nitrito reductasa periplásmica y nitrito reductasa citoplasmática (Nrfy Nir) de esta forma tiene dos vías de desintoxicación que eliminan el  $\text{NO}_2^-$  convirtiéndolo rápidamente en amoníaco (Lundberg, 2004).

Por lo tanto, a pesar de que se observa una disminución, esta no es cercana al ciclo logarítmico. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Rowe *et al.* (1994) quienes proponen que las enzimas presentes en *E. coli* funcionan como un sistema de extrusión de nitrito en el que se impide que la concentración intracelular de nitrito suba a niveles tóxicos para la célula bajo condiciones anaeróbicas, de este modo se puede comprender por qué se detecta nitrito residual, y por qué la bacteria no muere en el proceso de absorción y extrusión de nitrito.

Por ello, se podría indicar que este grupo de bacterias creció de manera favorable y a la vez produjo una cantidad apreciable de nitrito en un medio adicionado con nitrato bajo condiciones aeróbicas, sugiriendo la existencia de un sistema enzimático activador de nitrato. Estos resultados pueden explicarse por la naturaleza multifuncional del sistema de nitrato reductasa en microorganismos. La expresión máxima de reducción de nitratos se da en condiciones anaerobias y aunque nuestro experimento no se llevó a cabo bajo en estas condiciones, las enzimas nitrato reductasas presentes en *E. coli* están reguladas de manera diferencial, pues una se expresa bajo condiciones anaerobias y es inducida por el nitrato (NAR) (Showe y DeMoss, 1968), mientras que la otra es indiferente a la presencia de oxígeno o nitrato (NAS) (Lobi *et al.*, 1987); por lo tanto poseen la capacidad de reducir el nitrato en condiciones aeróbicas, y la respiración del nitrato puede ser ventajosa incluso cuando el oxígeno está disponible .

En este sentido, se ha sugerido que en *E. coli* la enzima indiferente a la presencia de oxígeno simplemente facilita la adaptación rápida a las posibles condiciones

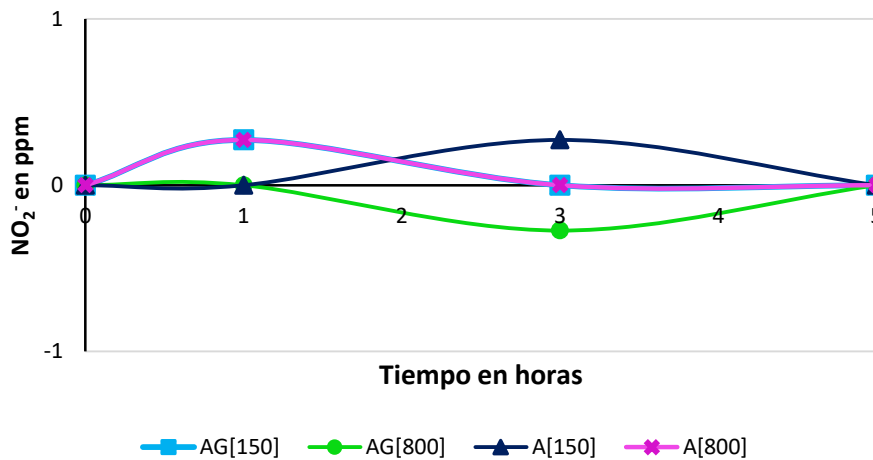
anaeróbicas a las que *E. coli* puede llegar a someterse. Como anaerobio facultativo, *E. coli* no solo se adapta al crecimiento sin oxígeno, sino también para sobrevivir en una variedad de condiciones en las que hay oxígeno presente (Chang *et al.*, 1999).

### 3.3.3 Comportamiento de *Lactobacillus* en presencia de nitrato

Las bacterias de este género son indispensables para la industria alimentaria, principalmente láctea. En la obtención de quesos frescos el género *Lactobacillus* juega un papel fundamental, ya que constituyen la mayor población de bacterias lácticas no comerciales en la mayoría de las variedades de quesos madurados (Beresford *et al.*, 2001). El género *Lactobacillus* contribuye a la maduración de los quesos mediante su actividad proteolítica y lipolítica, por lo que para este estudio es de vital importancia determinar el efecto del nitrato adicionado a la leche con una alta población de esta bacteria, así como su actividad en la reducción del nitrato.

#### 3.3.3.1 Actividad de *Lactobacillus* sobre el nitrato

En la figura 17 se presenta la concentración en partes por millón de nitrito iónico detectado, producto de nitrato A y AG en leche UHT inoculado con *Lactobacillus*.



**Figura 17.** Concentración de nitrito iónico ( $\text{NO}_2^-$ ) en leche UHT inoculada con *Lactobacillus*.  
A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Con la adición de 150 ppm de nitrato A se presentó un aumento de 0.27 ppm de nitrito iónico a las tres horas de contacto, luego una disminución a 0 ppm a las cinco horas,

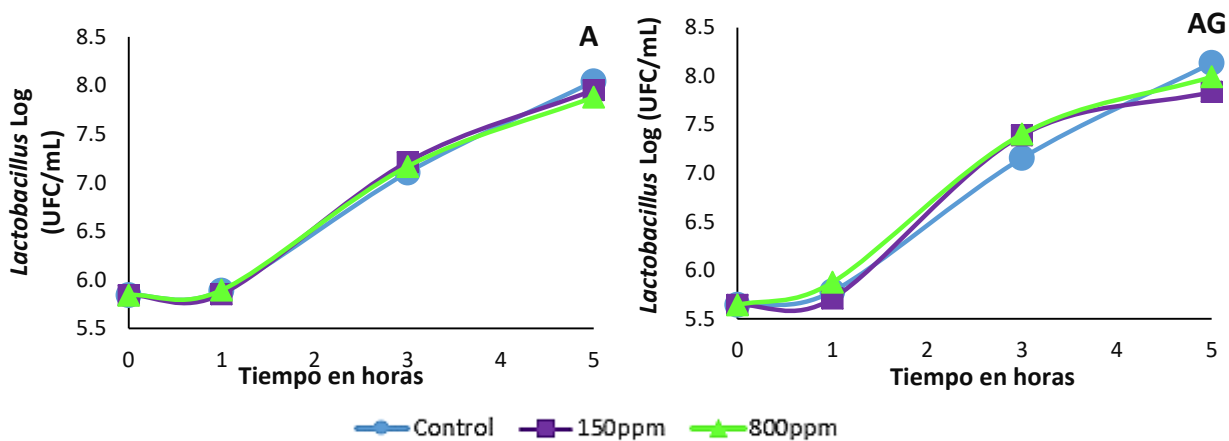
mientras que la adición de 800 ppm de nitrato AG produjo el mismo comportamiento, pero en una hora de contacto. Se puede decir que no existe una transformación importante de nitrato inducida por *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* es comúnmente caracterizado por no reducir nitrato (Koneman y Allen, 2008); sin embargo, algunas cepas exhiben actividades esenciales como nitrato reductasa, nitrito reductasa, catalasa, lipasa y proteasa, para crear los cultivos de arranque óptimos en productos cárnicos fermentados (Hammes *et al.*, 1990). Se identificó en el genoma de *L. plantarum* un sistema putativo que codifica nitrato-reductasa (narGHJI), lo que sugiere que es capaz de usar nitrato como un aceptor de electrones (Jia y Cole, 2005). No obstante, otros estudios sugieren que la reducción de nitrato sólo es posible en medios con carbohidratos restringidos. Otro factor en la generación de nitrito y posteriormente amoníaco es la ausencia del oxígeno en el medio (Tiso y Schechter, 2015) ya que las nitrato reductasas tienen una mejor actividad en condiciones anaeróbicas, pues son más sensibles al oxígeno, por esto la tensión del oxígeno es de importancia en microorganismos, además de ser sensibles a valores de pH menores a 5.6 (García *et al.*, 1993). Por lo tanto, ya que la transformación de nitrato por ciertas bacterias lácticas depende de las condiciones antes mencionadas y en el presente trabajo se realizaron bajo condiciones altas de oxígeno y carbohidratos, además de la variedad de especies del género *Lactobacillus* presente, no es posible la reducción del nitrato.

Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Tiso y Schechter (2015) quienes realizaron un estudio de la reducción de nitrato por cultivos de LAB (*L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*) a diferentes concentraciones de oxígeno, encontrando que niveles de O<sub>2</sub> equivalentes o superiores al 6% no mostraron cambios significativos en la reducción de nitrato a nitrito o amoníaco. Sin embargo, cabe mencionar que a una tensión O<sub>2</sub> menor a 4% (condiciones anaeróbicas) la reducción a nitrito y amoníaco puede generarse en el medio. De igual forma Hyun-Dong y Joo-Yeon (2014) realizaron un estudio sobre la capacidad de reducción de nitrato por bacterias lácticas en salchichas fermentadas. Reportaron que no existe una reducción de nitrato mientras éstas se encuentren en medio aerobio, y solo ciertas especies como *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. sakei* mostraron una ligera reducción del 3% de nitrato durante 24 horas de exposición.

### **3.3.3.2 Efecto del nitrato sobre el crecimiento de *Lactobacillus***

La siguiente figura (18) muestra el crecimiento de *Lactobacillus* durante 5 horas en presencia de nitrato.



**Figura 18.** Cinética de crecimiento de *Lactobacillus* en leche UHT adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones.

A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm

Los resultados muestran que la adición de nitrato A (150 y 800 ppm) no afecta el crecimiento de *Lactobacillus* pues el crecimiento es superior a los dos ciclos logarítmicos: aumentan de 5.8 Log UFC/mL (población inicial) a 7.95 y 7.88 Log UFC/mL respectivamente, en comparación con el control de 8.04 Log UFC/mL. Con nitrato AG (150 y 800 ppm), el crecimiento fue similar: se obtuvieron poblaciones de 7.84 y 7.99 Log UFC/mL comparado con el control de 8.13 Log UFC/mL. Se deduce que el nitrato (ambos tipos y concentraciones) no afectan el crecimiento normal de *Lactobacillus* durante cinco horas de contacto.

En la utilización de nitrato como antimicrobiano, el compuesto activo de su reducción, el nitrito, ejerce un efecto inhibitorio en la oxidación del hierro ferroso en el sistema de transferencia de electrones (Yarbrough *et al.*, 1980). En el caso de *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum* la ineficacia de este aditivo podría deberse a la falta de hierro que contiene elementos de transferencia de electrones en dichas bacterias, por lo cual, son capaces de tolerar el nitrito (McMindes, 1988).

Deng-sheng *et al.* (2006) reportaron que la utilización de nitrato a concentraciones de 0.5, 1,2 y 10 mmol/L no ejerce un efecto antimicrobiano sobre *Lactobacillus acidophilus* incluso en un medio acidificado a pH de 3. De manera similar Hyun-Dong y Joo-Yeon (2014) demostraron que la adición de 0.6g/L de nitrato de sodio a cuatro cultivos de bacterias lácticas (*L. brevis*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. sakei*) no tiene efecto inhibitorio sobre su crecimiento, teniendo cuentas máximas de 8.54 Log UFC/mL, en comparación con el control de 8.08 Log UFC/mL.

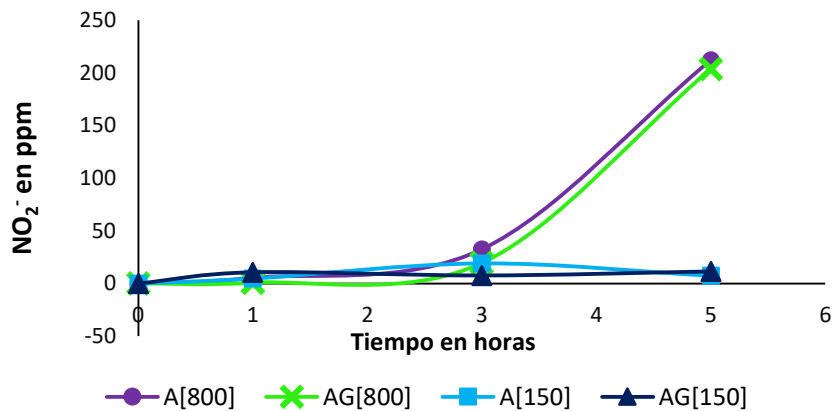


### 3.3.4 Comportamiento de *Streptococcus* en presencia de nitrato

Las BAL del género *Streptococcus* son productoras de ácido y ampliamente usadas como cultivo en quesos (Fox, et al., 2016). Estas bacterias controlan la acidificación natural de la leche en la fabricación de queso, consumiendo la lactosa de la leche y produciendo ácido láctico entre otros componentes que ayudan a la textura, sabores y olores del queso (Leverentz, 2010).

#### 3.3.4.1 Actividad de *Streptococcus* sobre el nitrato

En la figura 19 se observa la capacidad que tiene *Streptococcus* sobre el nitrato A y AG para reducirlo a nitrito durante 5 horas.



**Figura 19.** Concentración de nitrito iónico ( $\text{NO}_2^-$ ) presente en leche UHT inoculada con *Streptococcus*. A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm.

Los resultados muestran que la adición de nitrato A y AG a 800 ppm en leche con *Streptococcus*, indujo la reducción de nitrato y por ende se observa un aumento de nitrito iónico de 212 ppm y 203 ppm. En cambio, la adición de 150 ppm provocó un aumento mínimo de 7.35 ppm y 11.44 ppm respectivamente a las 5 horas de contacto.

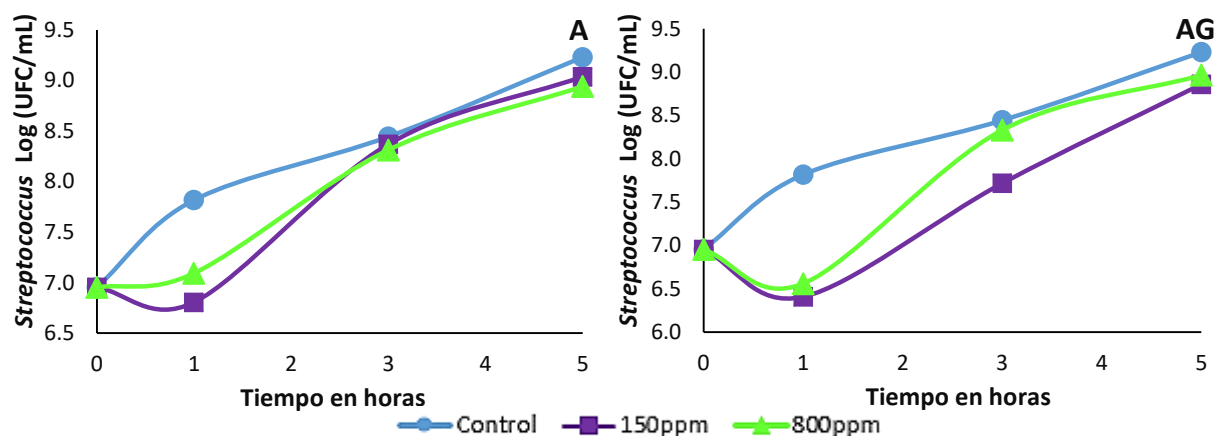
Se han identificado estreptococos reductores de nitratos, como variedades móviles de *Streptococcus faecium* y se denominaron *Streptococcus faecium var. mobilis* (Langston y Williams, 1962). Bacterias como *S. bovis*, *S. mitis*, *S. mutans* y *S. salivarius* pueden crecer reduciendo el nitrito a  $\text{NO}^-$  por nitrato reductasas. Esta reducción para la obtención de energía (síntesis de ATP) tiene correlación con el descenso de  $\text{O}_2$  (Fishbein y Heilman, 2013). Choudhury *et al.* (2007) describieron la presencia de un gen nitrito reductasa (NirJ) y la reducción enzimática de nitrito a NO en *S. mutans*.

La reducción de nitrato a nitrito encontrado en este estudio apoya los resultados de Hong *et al.* (1997) quienes realizaron el aislamiento de 1.275 cepas provenientes de lengua de ratas, de las cuales 147 produjeron nitrito en medios con nitrato. Los

principales géneros productores de nitrito aislados de lenguas de ratas fueron *Staphylococcus*, *pasteurella* (20%), *Streptococcus* (10%) y *Listonella* (5%). La especie *Staphylococcus sciuri* (60% de las cepas aisladas) fue claramente dominante en la producción de nitrito.

### 3.3.4.2 Efecto del nitrato sobre el crecimiento de *Streptococcus*

En este apartado se presenta la evolución en el crecimiento que tienen *Streptococcus* en leche UHT en presencia de nitrato A y AG durante 5 horas.



**Figura 20.** Cinética de crecimiento de *Streptococcus* en leche UHT adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones  
A=nitrato grado alimenticio; AG=nitrato grado agrícola. Concentración: 150 y 800 ppm

Se observó un descenso de la población de *Streptococcus* durante la primera hora de contacto con nitrato A (150 y 800 ppm) de 7.09 y 6.81 Log UFC/mL respectivamente en comparación con el control de 7.82 Log UFC/mL. De manera similar, con la adición de nitrato AG (150 y 800 ppm) a leche UHT con *Streptococcus* hubo una disminución en las poblaciones durante la primera hora de contacto, a 6.41 y 6.56 Log UFC/mL respectivamente, en comparación con el control de 7.82 Log UFC/mL. Luego del descenso de las poblaciones, *Streptococcus* retomó su actividad, teniendo conteos similares al control durante las siguientes horas de contacto.

La reanudación del crecimiento es debido a que *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus lactis*, *Enterococcus* y especies gram negativas son relativamente tolerantes al nitrito (Castellani y Niven, 1954). Puesto que no se tiene bien definido el mecanismo de acción del nitrito como antimicrobiano, se ha especulado que el nitrito inhibe los citocromos de la cadena de transporte de electrones (Hill, 1991). Bacterias como *Streptococcus faecalis* y *Streptooccus lactis* han reportado ser altamente resistentes al nitrito, ya que son organismos que carecen de citocromos y que

dependen de la glucólisis para la generación de adenosintrifosfato cuando la glucosa aumenta (Yarbrough *et al.*, 1980).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por (Gibson y Roberts, 1986), quienes realizaron un estudio sobre el efecto del nitrito de sodio, cloruro de sodio y pH sobre el crecimiento de *Streptococcus fecalis* concluyendo que esta bacteria no fue inhibida en medios que contenían 6% de sal y 400 µg/mL de nitrito independientemente del pH o temperatura de almacenamiento.

#### IV. CONCLUSIONES

La flora microbiana presente en la leche cruda cuenta con una amplia gama de microorganismos: bacterias mesófilas, psicrótrofas, mohos, levaduras, bacterias lácticas y bacterias coliformes, y cada una tiene capacidad diferente para reducir el nitrato en nitrito. Se encontró que la calidad microbiológica de la leche (poco o muy contaminada) influye directamente en el comportamiento de las bacterias y en su habilidad para transformar el nitrato en nitrito. En las muestras de leche muy contaminada se produjo la reducción del nitrato a nitrito de manera más eficiente en comparación de una leche poco contaminada.

La población de bacterias mesófilas y psicrótrofas, bacterias coliformes totales, fecales y *Staphylococcus aureus*, hongos y levaduras disminuyó en presencia de nitrato AG durante la primera hora de contacto, pero retomaron el crecimiento en las horas posteriores desarrollándose de manera similar al control.

*E coli* no fue inhibida por el nitrato puesto que utiliza la respiración de nitrato como medio aceptor de electrones alternativos a través de las enzimas nitrato reductasas.

*Streptococcus* y *Lactobacillus* tampoco fueron inhibidos por el nitrato puesto que no dependen del transporte activo o del citocromo por lo tanto el nitrato o sus moléculas reducidas no pueden ejercer un efecto bactericida sobre éstas.

En todas las poblaciones microbianas estudiadas en la leche el crecimiento fue semejante al control pues la adición de nitrato no obstaculizó la reproducción bacteriana.

La evidencia apunta a que la eficiencia del nitrato como antimicrobiano dependerá de diversos factores entre los que destacan la transformación de nitrato a nitrito, la presencia o ausencia de oxígeno y la afinidad del nitrato sobre los sistemas enzimáticos bacterianos. Con base en lo anterior, se corrobora que la adición de nitrato A y AG a concentraciones de 150 y 800 ppm durante un tiempo de contacto de 5 h a leche no tiene efecto antimicrobiano sobre la flora presente. Se descarta por tanto el uso indiscriminado de este aditivo como tratamiento antimicrobiano en la producción de quesos frescos.

# **VI. REFERENCIAS**

1. Acero, C. E., 2006. *Nayarit: reforma y desarrollo*. México: Univ. Autónoma de Nayarit.
2. Adams, M. R. & Moss, M., 2008. *Food Microbiology*. Tercera ed. s.l.:Royal Society of Chemistry.
3. Adams, M. R., O, M. M. & McClure, P. J., 2015. *Food Microbiology*. Cuarta ed. Great Britain: Royal Society of Chemistry.
4. Addiscott, T., 2005. *Nitrate, Agriculture and the Environment*. London, UK.: CAB International.
5. Agudelo, G. D. A. & Bedoya, M. O., 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Lasallista de Investigación*, Volumen II, pp. 38-42.
6. Alais, C., 1985. *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Barcelona: Reverte.
7. Allen, B., Youngster, I. & McAdam, A., 2015. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), pp. 247-272.
8. Almudena, A. & Lizaso, J., 2001. *Nitritos, Nitratos Y Nitrosaminas*. Madrid, s.n., pp. 1-7.
9. Amiot, J., 1991. *Ciencia y tecnología de la leche*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
10. AOAC, 1995. *Official Methods of Analysis*. 16 ed. Washington DC: International.
11. APHA, 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination*. 3a ed ed. Washington, D.C. : s.n.
12. Arai, H. y otros, 2005. Transcriptional regulation of the flavohemoglobin gene for aerobic nitric oxide detoxification by the second nitric oxide-responsive regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, Volumen 157, pp. 3960-3968.
13. Aubel, E. & Egami, F., 1936. C.R.. *Academy Science*, p. 202.

14. autores, V., 2001. *Diccionario de medicina: Diccionarios Oxford-Complutense*. Madrid: Editorial Complutense.
15. Badaoui, N. M., Chikindas, M. & Montville, T. J., 2007. *Changes in Listeria*. s.l.:s.n.
16. Barbano, . A., Ma, Y. .. & Santos , M., 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J. Dairy Science*, Volumen 89, pp. E15-E19.
17. Barbaros, O. & Gülsün, A.-E., 2014. *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*. s.l.:CRC Press.
18. Barron, E. & Singer, T., 1945. Studies on biological oxidations. XIX. Sulfhydryl enzymes in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.*, Issue 157, pp. 221-240.
19. Barros, C., 2009. En: *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. 2a ed. Madrid: Visión Libros, pp. 63-64.
20. Barros, C., 2009. *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. Segunda ed. Madrid: Visión Libros.
21. Battro, P., 2010. *Quesos Artesanales*. 1a ed. Buenos Aires : Albatros .
22. Baylis, C., 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol*, Volumen 62, pp. 293-307.
23. Bayne, H. G. & David, M. H., 1975. Growth of *Staphylococcus* and *Salmonella* on Frankfurters With and Without Sodium Nitrite. *American Society for Microbiology*, 30(5), pp. 844-849.
24. Bayne, H. G. & Michener, H. D., 1975. Growth of *Staphylococcus* and *Salmonella* on Frankfurters With and Without Sodium Nitrite. *Appl. Microbiol.*, Noviembre, 30(5), pp. 844-849.

25. Bello, G. J., 2000. *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Madrid, España: Díaz de Santos.
26. Bello, G. J., 2000. *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
27. Benedic, R., Partridge, T., Wells, D. & Buchanan, R., 1993. Bacillus cereus: aerobic growth kinetics. *Journal of Food Protection*, 56(3), pp. 211- 214.
28. Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy*, Issue 11, pp. 259-274.
29. Berge, H., 2004. *E. coli in Motion*. New York: Springer Science & Business Media.
30. Berks, B. C. F. S. J. M. J. W. & R., 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta*, Volumen 1232, pp. 97-173.
31. Berks, B., Ferguson, S., Moir, J. & Richardson, D., 1995. ENZYMES AND ASSOCIATED ELECTRON TRANSPORT SYSTEMS THAT CATALISE RESPIRATORY REDUCTION OF NITROGEN OXIDES AND OXYANIONS. *Biochim. Biophys*, pp. 97-173.
32. Birzele, B., Djordjevic, S. & Kramer, J., 2005. A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. *Food Control* , p. 695–699.
33. Birzele, B., Djordjevic, S. & Krämer, J., 2005. A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. *Food Control*, Issue 16, pp. 695-699.
34. Bluma, A. & Ciprova, I., 2015. Diversity of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk. *Research for Rural Development*, Volumen 1, pp. 150-161.



35. Bolton, L. & Frank, J., 1999. Defining the growth/ no- growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican- style cheese base don salt, ph, an moisture content. *J Food Prot*, Volumen 62, p. 601 – 609.
36. Bradberry, S., Gazzard, B. & Vale, J., 1994. Methemoglobinemia caused by the accidental contamination of drinking water with sodium nitrite. *Journal Toxicology Clinic Toxicol.*, pp. 173-178.
37. Brands, A., I., A. & pp.13-15, L. H., 2006. *Salmonella*. Primera ed. United States of America: Chelsea House Publishers.
38. Brooijmans, R. J., Vos, W. M. & Hugenholtz, J., 2009. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains. *Appl. Environ Microbiol*, Volumen 75, p. 3580–3585..
39. Buchanan, R. & Solberg, M., 1972. Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science* , Volumen 37, pp. 81-85.
40. Buchanan, R., Stahl, H. & Whiting, R., 1989. Effects and interactions of temperatura, Ph, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(12), pp. 844-851.
41. Burke, K. & Lascelles, J., 1975. Nitrate Reductase System in *Staphylococcus aureus* Wild Type and Mutants. *Journal Of Bacteriology*, 123(1), pp. 308-316.
42. Calderón, A., García, F. & Martínez, G., 2006. INDICADORES DE CALIDAD DE LECHES CRUDAS EN DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA. *MVZ Córdoba* , 11(1), pp. 725-737.
43. Cammack, R. y otros, 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica*, Issue 1411, pp. 475-488.
44. Cammack, R. y otros, 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta* , pp. 475-488.

45. Carperter, C. E., Reddy, D. & Cornforth, D., 1987. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 53-549.
46. Carrillo, Z. E. M. & Lozano, C. A. M., 2008. *Validación de métodos de detección de coliformes totales y fecales en agua potable, utilizando agar CHROMOCULT*. Bogotá: Pontica Universidad Javeriana.
47. Carr, J. F., Chill, D. & Maida, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 4(28), pp. 281-370.
48. Castañeda, M. T., Boucher, F., Sánchez, V. E. & Espinoza Ortega, A., 2009. La concentración de agroindustrias rurales de producción de quesos en el noroeste del Estado de México: un estudio de caracterización. *Estud. soc.*, 17(34), pp. 73-109.
49. Castellani, A. G. & Niven Jr., C., 1955. Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. *Appl. Microbiol.*, Issue 3, pp. 154-159.
50. Castellani, A. G. & Niven, J., 1954. Factors Affecting the Bacteriostatic Action of Sodium Nitrite'. *Division of Bacteriology, American Meat Institute foundation and Department of Microbiology*.
51. Castellani, A. G. & Niven, J. C. F., 1954. Factors Affecting the Bacteriostatic Action of Sodium Nitrite. *Applied Microbiology*, 3(3), pp. 154-159.
52. Castro, C. G., Martínez, C. F. E., Martínez, C. Á. R. & Espinoza, O. A., 2013. *Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración*. 2 ed. Rev. Soc. Ven. Microbiol: 33.
53. Castro, L. e. a., 2001. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. *fira Boletín Informativo México, D.F*, XXXIII(317).
54. Castro, L., Sánchez, R., Iruegas, E. & Saucedo, L., 2001. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México.. *FIRA Boletín Informativo*, XXXIII(317).

55. Celis, M. & Juarez, D., 2009. *Microbiología de la Leche*. Bahía Blanca, Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional.
56. Cervantes, E. E., 2008. *Los quesos mexicanos genuinos, patrimonio cultural que debe rescatarse*. México: Mundi-Prensa.
57. Cervantes-Escoto, E., 2008. *Los quesos mexicanos genuinos, patrimonio cultural que debe rescatarse*. México: Mundi-Prensa.
58. Cervantes, E., Villegas, G. & Vargas C.A. y Ortega, A., 2006. *Los quesos Mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar..* s.l.:SIAL.
59. Chan, T. Y., 1996. Food-borne nitrates and nitrites as a cause of methemoglobinemia.. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, Issue 27, p. 189– 192..
60. Choudhury, T., Sato, E. & Inoue, M., 2007. Nitrite reductase in *Streptococcus mutans* plays a critical role in the survival of this pathogen in oral cavity. *Oral Microbiology Immunology*, Volumen 22, pp. 384-389.
61. COFOCALEC, 2012. *Proyecto de Norma Mexicana*. México : s.n.
62. Cohen, M. L., 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature*, Volumen 406, pp. 762-767.
63. Conrado, M. V., Cabello, P., Blasco, R. & Cartillo, F., 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *Journal of Bacteriology*, 181(21), pp. 6573-6584.
64. Cook, F. K. & Pierson, M. D., 1983. Inhibition of bacterial spores by antimicrobials. *Food Technology.*, 37(115).
65. Coultate, T. P., 2009. *Food - The Chemistry of its Components*. Quinta ed. Cambridge UK.: Royal Society of Chemistry.
66. Cousin, M., 1982. 4. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food. Prot.*, Volumen 45, pp. 172-207.

67. Cousin, M., 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Prot*, Volumen 45, pp. 172-207.
68. Cremonesi, P. y otros, 2007. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology*, Volumen 45, pp. 586-591.
69. C, S.-W., Stolz, J. & P, B., 2013. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem Soc Rev. The Royal Society of Chemistry*, 45(2), pp. 676-706.
70. Csuros, M. & Csuros, C., 1999. *Microbiological Examination of Water and Wastewater*. Florida : Lewis Publishers.
71. Cubero, N., A., M. & J., V., 2002. Aditivos alimentarios. En: *Tecnología de alimentos*. s.l.: Mundi-Prensa, pp. 69-71.
72. Cubero, N., Monferrer, A. & Villalta, J., 2002. Aditivos alimentarios. En: *Tecnología de alimentos*. s.l.:Mundi-Prensa, pp. 69-71.
73. D. Richardson, G. S., 2002. Science. En: s.l.:s.n., p. 1842–1843.
74. D'Aoust, J.-Y., Warburton, D. W. & Sewell, A. M., 1985. *Salmonella typhimurium*.
75. De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M. & Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 67, pp. 1-17..
76. Deak, T., 2008. *Handbook of Food Spoilage Yeast*. 2a ed. Florida: CRC Press.
77. Decker, E. A., Elias, R. J., McClements, D. & Julian, 2010. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications, Volume 2 - Management in Different Industry Sectors*. UK: Woodhead Publishing.
78. DeGroot, G. N. a. A. H. S., 1970. Regulation of reductase formation in *Proteus mirabilis*. II. Influence of growth with azide and of haem deficiency on nitrate reductase formation. *Biochim. Biophys*, Volumen 208, pp. 414-427.

79. Del Castillo, R. S. R. & Mestres, L. J., 2004. *Productos lácteos: tecnología*. Barcelona: Univ. Politèc. de Catalunya.
80. Delgado, R. L. C. & Torres, D. J. M., 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Revista panamericana de la salud pública*, 14(3).
81. Deng-sheng, X. y otros, 2006. Antimicrobial effect of acidified nitrate and nitrite on six common oral pathogens in vitro. *Chin Med*, 119(22), pp. 1904-1909.
82. Deng-sheng, X. y otros, 2006. Antimicrobial effect of acidified nitrate and nitrite on six common oral pathogens in vitro. *Chin MedJ.* , 119(22), pp. 1904-1909.
83. Deoliveira, G. B., Favarin, L., Luchese, R. H. & McIntosh, D. s. e. a., 2015. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp. 313-321.
84. Desmaures, N., Bazin, F. & Guéguen, M., 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms for selected farms in Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, pp. 53-58.
85. Díaz-Ramírez, M., García Garybal, M., Jiménez Guzmán, J. & Villanueva Carvajal, A., 2016. Inocuidad en alimentos tradicionales: El queso de Poro del Balancán como un caso de estudio. *Estudios Sociales*, 25(47), pp. 84-111.
86. Doyle, M. P. & Buchanan, R. L., 2013. *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*. Cuarta ed. Washington DC.: American Society for Microbiology.
87. Duthoit, F., Godon, J. & Montel, M., 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Volumen 69, pp. 3840-3848.
88. Dykhuizen, R. y otros, 1996. Antimicrobial effect of acidified Nitrite on gut Pathogens: Importance of dietary Nitrate in host defense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(6), pp. 1422-1425.

89. El-Gazzar, F. E. & Marth, E. H., 1992. Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science*, Volumen 75, pp. 2327-2343.
90. Ellis, M., Hiss, Y. & Shenkman, L., 1992. Fatal methemoglobinemia caused by inadvertent contamination of a laxative solution with sodium nitrite. *Israel J. Med. Sci.* , pp. 367-368.
91. Ercolini, D. R. F. F. I. V. F. ., 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26(2), pp. 228-231.
92. Erich, T., 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und sauglings. *Fortshr. Med.*, Volumen 3, pp. 515-522.
93. Erkmen, O. & Bozoglu, T. F., 2016. *Food Microbiology: Principles Into Practice, 2 Volume Set*. Noida, India: John Wiley & Sons.
94. Erkmen, O. & Bozoglu, T. F., 2016. *ood Microbiology: Principles into Practice, 2 Volumen*. India : John Wiley & Sons.
95. Espié, V. y otros, 2006. Escherichia coli O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection*, Volumen 134, p. 143–146.
96. Estepar, J., Sanchez, d. M. M., Alonso, L. & Mayo, B., 1999. Biochemical and microbiological characterization of artisanal `Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* , Volumen 10, pp. 737-746.
97. Facklam, R., 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol.* , Volumen 15, p. 613.
98. Fan, A. & Steinberg, V., 1996. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, pp. 35-43.

99. Faría, J. y otros, 1999. Resistencia a los antimicrobianos de staphylococcus aislados de leche cruda. *Revista científica*, IX(4), p. 344.
100. Figueroa, V., Meda, G. F. J. & Janacua, V. H., 2016. *Manual de buenas prácticas de producción de leche caprina*, México: Senasica.
101. Filtenborg, O., Frisvad, J. & U., T., 1996. Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol*, Volumen 33, pp. 85-102.
102. Fishbein, J. C. & Heilman, J. M., 2013. *Advances in Molecular Toxicology*, Volumen 7. Quinta ed. Elsevier: Amsterdam.
103. Flint, H., O'Toole, P., Walker, A. M. (. E. 2. N. & 21045216, 1. 1. d. 1.-0. P., 2010. Special issue: The Human Intestinal Microbiota. *Microbiology*, p. 156
104. Flores, L. M. & Albert, A., 1995. *La contaminación y sus efectos en la salud y el ambiente*. s.l.:Illustrated, Centro de Ecología y Desarrollo.
105. Fox, L. & Gay, J., 1993. Contagius Mastitis.. *The Veterinary Clinic of North America*, 9(3), pp. 475-488.
106. Fox, P., 2012. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects*. Segunda ed. UK: Springer – Science + Business media.
107. Fox, P. F., 2012. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects*. Segunda ed. UK: Springer Science Business Media.
108. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. H., 2016. *Fundamentals of Cheese Science*. 2 ed. New York: Springer.
109. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P., 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups*. Tercera ed. San Diego, California : Academic Press.
110. Fox, P., L, P. & H. McSweeney, 2004. En: Elsevier, ed. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology:General aspects*. 3a ed. San Diego: s.n., p. 553.

111. Frank, J., 1997. Milk and dairy products. En: R. B. J. M. P. Doyle, ed. *Food Microbiology — Fundamental and Frontiers*. P. Doyle, R. Beuchat, J. Montville ed. Virginia, USA: ASM Press.
112. Friis, R. H., 2012. *The Praeger Handbook of Environmental Health, Volumen 1*. Santa Barbara, California: Praeger.
113. Fugensalg, K. & Edwards, C., 2007. Wine Microbiology. En: *Practical applications and procedures*. NY : Springer Science and Business Media .
114. Fu, Y., Sarkar, P., K. Bhunia, A. & Yao, Y., 2016. Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends in Food Science & Technology* , Issue 16, pp. 165-177.
115. Gallón, N. J., 2015. Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc. *NOVA*, 13(23), pp. 7 - 15.
116. García, C. V., 2004. *INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA*. Segunda ed. Costa Rica : EUNED .
117. García, G. M., Quintero, R. R. & López-Munguía, C. A., 1993. *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa.
118. García, H. M., 2014. *Recepción y almacenamiento de la leche y otras materias primas..* Antequera, Màlanga : IC Editorial .
119. Gardner, A., Helmick, R. & Gardner, P., 2002. Flavorubredoxin an inducible Catalyst for nitric oxide reduction and Detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, Issue 277, pp. 8172-7.
120. Gardner, A. M., Helmick, R. A. & Gardner, P. R., 2002. A Novel Type of Nitric-oxide Reductase *ESCHERICHIA COLI* FLAVORUBREDOXIN. *J. Biol. Chem.*, Volumen 277, p. 8172–8177.



121. Gardner, P. R., 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volumen 99, pp. 247-266.
122. Garnier, L. y otros, 2017. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 241, pp. 191-197.
123. Gaulin, C., Ramsay, D. & Bekal, S., 2012. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008. *Journal of Food Protection*, Volumen 75, pp. 71-78.
124. Geeta, S. & Mehrotra, R. S., 2009. *Principles of microbiology*. s.l.:McGraw-Hill.
125. Genigeorgis, C. & Riemann, H., 1979. *Food processing an hygiene*. In: *Food-Borne Infections and Intoxications*. Segunda ed. New York: Academic Press.
126. Gennis, R. & Stewart, V., 1996. Respiration in Escherichia coli and Sallmonella. En: N. F.C., ed. *Celular and Molecular Biology*. Washington DC : American Society for Microbiology press, pp. 217-261.
127. Ghaffari, A., Miller, C., McMullin, .. & Ghahary, A., 2006. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide*, Volumen 14, pp. 21-29.
128. Ghafir, Y. y otros, 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*, Volumen 71, pp. 35 - 45.
129. Gibson, A. M. & Roberts, T. A., 1986. The effect of Ph, sodium chloride, sodium nitrite and storage temeperature on the growth of Clostridium perfringens and faecal streptococci in laboratory media. *Internacional Journal of Food Microbiology*,, Volumen 3, pp. 193-210.

130. Gibson, A. & Roberts, T., 1986. The effect of pH, sodium chloride, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Clostridium perfringens* and faecal streptococci in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, 3(4), pp. 195-210.
131. Gil, A. & Sánchez, F., 2010. *Tratado de Nutrición*. 2a ed. Madrid: Medica-Panamericana.
132. Gillespie, I. A., Adak, G. K., O'Brien, S. J. & Bolton, F. J., 2003. Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992-2000.. *Epidemiol. Infect.* , Volumen 130, pp. 461-468.
133. Gilmour, A. & Rowe, M., 1990. Microorganisms associated with milk. *Elsevier Applied Science*, Volumen 1, pp. 37-75.
134. Glaeser, H., 1989. Use of nitrate in cheese production. *Dairy Industries International*, Volumen 11, pp. 19-23..
135. González, M. A. D., 2014. *Evolución de la microflora láctica y no coliforme en queso Oaxaca artesanal durante el procesamiento y almacenamiento. Tesis de Licenciatura*. Toluca, Estado de México: Universidad Autónoma del Estado de México.
136. González, P. y otros, 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volumen 100, pp. 1015-1023.
137. Grappin, R. & Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, Issue 7, pp. 751-761.
138. Grappin, R. & Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, Volumen VII, pp. 751-761.

139. Griffiths, M., Philips, J. & Muir, D., 1981. 1. Thremostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Appl. Bacteriol.*, Volumen 50, pp. 289-303.
140. Guerrero, M. G. J. M. V. a. M. L., 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Plant Physiol*, Volumen 32, pp. 169-204.
141. Gutiérrez, R. R., 2006. *Los pricrótrofos y la calidad de la leche*. s.l., Industria Alimentaria .
142. Hammes, W. P., Bantleon, A. & . Numbers and letters correspond to the affiliation list. Click to expose these in author workspace. Seunghwa, M., 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 87, pp. 165-173.
143. Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Tzanetakis, N., 1999. Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. *Journal applied Microbiological*, Volumen 87, pp. 595-601.
144. Haug, A. H. A. T. & Harstad, O. M., 2007. Bovine milk in human nutrition – a review. *BioMed Centra*, pp. 2-16.
145. Headrick, M. L. y otros, 1998. The epidemiology of raw milk-associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. *Am. J. Pubic Health*, Volumen 88, pp. 1219-1221.
146. Headrick, M. L., Timbo, B., Klontz, K. C. & Werner, S. B., 1997. Profile of raw milk consumers in California. *Public Health Rep*, Volumen 112, pp. 418-422.
147. Heer, G. E., 2007. *MICROBIOLOGIA DE LA LECHE*. [En línea]  
Available at:  
<http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>  
[Último acceso: 23 Nov 2016].

148. Hegarty, H., O'Sullivan, M. B., Buckley, J. & Foley-Nolan, C., 2002. Continued raw milk consumption on farms: Why? *Commun. Dis. Public Health* , Volumen 5, pp. 151-156.
149. Henderson, P., Winemaker, S., Vineyards, K. & Kenwood, C., 2009. Sulfur Dioxide: Science behind this anti-microbial, anti-oxidant, wine additive. *Practical winery & vineyard*, Volumen JANUARY/FEBRUARY, pp. 1-6.
150. Heppner, C. & Dorne, J., 2014. Nitrate and Nitrite . En: *Encyclopedia of Food Safety*. s.l.:Elsevier, pp. 332-336.
151. Hernández, A., Alfaro, I. & Arrieta, R., 2003. *Microbiología Industrial*. s.l.:Editorial Universal Estatal a Distancia .
152. Hernández, A., Alfaro, I. & Arrieta, R., 2003. *Microbiología Industrial*. s.l.:EUNED.
153. Hernández, R. M. & Sastre, G. A., 1999. *Tratado de nutrición*. Madrid : Ediciones Díaz de Santos .
154. Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D. & Shepherd, J., 2012. Microbiology of raw milk in New Zealand. *Elsevier*, 157(2).
155. Hill, M., 1991. *Nitrates and Nitrites in Food and Water*. s.l.:Woodhead Publishing.
156. Holzapfel, W. H. & Wood, B. J., 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. s.l.:Wiley-Blackwell.
157. Hong, L. y otros, 1997. Nitrate-Reducing Bacteria on Rat Tongues. *Applied And Environmental Microbiology*, 63(3), pp. 924-930.
158. Honish, L. y otros, 2005. An outbreak of E. coli O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health*, Volumen 96, pp. 182-184.

159. Huang, H. & Tseng, S., 2001. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), pp. 90-94.
160. Huang, H. & Tseng, S., 2001. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 90-94.
161. Huis in't Veld, J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiology*, Volumen 33, pp. 1-18.
162. Hymery, N. y otros, 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, Volumen 13, p. 437–456.
163. Hyun-Dong, P. & Joo-Yeon, L., 2014. Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. *Meat Science*, 97(4), pp. 609-614.
164. ICMSF, (. c. o. m. s. f. f., 1998. *Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Primera ed. Zaragoza, España: Acribia, S.A..
165. INEGI, 2008. *El sector alimentario en México*, Aguascalientes, México: s.n.
166. Inmgram, M., 1939. The endogenous respiration of *Bacillus cereus* II. The effect of salts on the rate of absorption of oxygen. *Journal Bacteriology*, Volumen 38, pp. 613-629.
167. J. W. T. Wimpenny & J.A.Cole, 1967. The regulation of metabolism in facultative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1(1), pp. 233-242.
168. Jackson, K. A. y otros, 2011. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexicanstyle cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. *Journal of Food Protection*, Volumen 74, pp. 949-953..

169. Jacques , N. & Casaregola, S., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal Food Science*, Volumen 126, pp. 321-326.
170. Jakobsen, R. A., Heggebø, R., Sunde, E. B. & Skjervheim, M., 2011. Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology*, Volumen 28, pp. 492-496.
171. Jayarao, B., Donaldson, S., Straley, B. & Sawant, A., 2006. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 89(7), pp. 2451-2458.
172. Jayarao, B. M., Donaldson, S. C. & Sawant, A. A., 2006. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 93(7).
173. Jay, J., 1991. *Modern Food Microbiology*. New York : Chapman y Hall.
174. Jay, J., 2000. *Microbiología moderna de los alimentos*. 6a ed. Zaragoza: ANASPEN.
175. Jay, M., 1986. Fermented Foods And Related Products Of Fermentation. En: 3 th ed. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
176. Jay, M. J., 2000. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers.
177. Jia, W. & Cole, J., 2005. Nitrate and nitrite transport in Escherichia coli. *Biochem Soc Trans*, Volumen 33, pp. 61-159.
178. JM, L., E, W. & Cole J, B. N., 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Micro*, 2(7), p. 593–602.
179. Jon O. Lundberg, E. W. J. A. C. a. N. B., 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews. Microbiology*, Volumen 2, pp. 593-602.

180. Justino, M. C. & Vicente, J. B. T. M. S. L. M., 2005. New Genes Implicated in the Protection of Anaerobically Grown *Escherichia coli* against Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.*, Volumen 280, pp. 2636-2643.
181. Keene, W. E., 1999. Lessons From Investigations of Foodborne Disease Outbreaks. *The JAMA network*, Volumen 281, pp. 1845-1847.
182. Kennedy, N., Smith, C. & McWhinney, P., 1997. Faulty sausage production causing methaemoglobinaemia. *Arch. Dis. Child.* , pp. 367-368.
183. Kindstedt, P., 2012. A History of Cheese and its Place in Western Civilization.. En: *Cheese and Culture*. s.l.:s.n., pp. 13-14.
184. Kirk, M., 1988. *Nitrite mode of action: The inhibition of yeast pyruvate decarboxylase and clostridial pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase by nitric oxide and menadione*. Illinois: s.n.
185. Koka , R. & Weimer , B., 2001. Influence of growth conditions on heat-stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *J. Dairy Res.*, Volumen 68, pp. 109-116.
186. Koneman, E. W. & Allen, S., 2008. *Diagnostico Microbiologico*. Sexta ed. Madrid: Médica Panamericana.
187. Kosokowki, F., 1982. *Cheese and Fermented Milk Foods*. 2a ed. New York: s.n.
188. Kure, C., Skaar, I. & Brendehaug, J., 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int. J. Food Microbiology*, Volumen 93, p. 41–49.
189. Lambert, R. & Stratford, M., 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, Volumen 86, pp. 157-164.
190. Langston, C. W. & Williams, P. P., 1962. Reduction of nitrate by *Streptococci*. *Dairy Cattle Research Branch*, p. 603.

191. Larios, E., 2007. *Caracterización de la microflora del queso tipo Oaxaca y su capacidad antimicrobiana. Tesis de licenciatura.* Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias: Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo..
192. Ledenbach, L. & Marshall, R., 2010. *Microbiological spoilage of dairy products.* New York: W.H. Sperber, M.P. Doyle (Eds.), Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety,.
193. Leverentz, J. R., 2010. *The Complete Idiot's Guide to Cheese Making.* New York: Penguin.
194. Li, H. y otros, 1997. Nitrate-Reducing Bacteria on Rat Tongues. *Applied And Environmental Microbiology*, 63(3), pp. 924-930.
195. Lisandro, S. M. y otros, 2008. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico- sanitarias de la producción primaria de leche. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XVIII(2), pp. 207-217.
196. Liu, D., 2008. *Handbook of Listeria Monocytogenes.* United States of America: CRC Press.
197. Looney, W., 2000. Small colony variants of STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *Br J Biomed*, Volumen 57, pp. 317-322.
198. López-Fandino, . R., Olano , A., Corzo , . N. & Ramos , M., 1993. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *J. Dairy Res.*, Volumen 60, pp. 339-347.
199. Lück, E. & Jager, M., 2012. *Antimicrobial Food Additives: Characteristics - Uses - Effects.* London: Springer.
200. Lundberg, J., E., W., J., C. & N., B., 2004. Nitrate, bacteria and human health.. *Nat Rev Micro.*, p. 593–602.



201. Lundberg, J. O., Benjamin, E. W. & Nigel, J. A. C. a., 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews. Microbiology*, Volumen 2, pp. 593-602.
202. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J., 2004. *Biología de los microorganismos*. 10a ed. Madrid: Pearson-Prentice Hall.
203. Madigan, T. M., M, M. J. & J, P., 2004. *Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid, España: Prearson Prentice Hall.
204. Madrid, A. & Madrid, J., 2000. *Los aditivos en los alimentos*. México: AMV.
205. Magariños, H., 2000. Producción higiénica de la leche cruda, una guía para pa pequeña y mediana empresa. *Productos y Servicios Incormporados*, Volumen 6, pp. 1-104.
206. Major, T. A. y otros, 2010. Sodium Nitrite-Mediated Killing of the Major Cystic Fibrosis Pathogens *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Burkholderia cepacia* under Anaerobic Planktonic and Biofilm Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), pp. 4671-4677.
207. Majowicz, S. E. y otros, 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, Volumen 50, pp. 882-889.
208. Makarova, K. y otros, 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *National Academy of Sciences*, 103(42), pp. 15611-15616.
209. Makino, S. I. y otros, 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 104, pp. 189-196.
210. Mani-López, E., E., P. & López-Malo, A., 2016. Preservatives: Classifications and Analysis.. *Elsevier*.

211. McGinnis, M. & Tyring, S., 1996. Introducción a la Micología. En: B. S, ed. *Microbiología Médica*. Cuarta ed. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, pp. Galveston, Texas.
212. McMIndes, . M. K., 1988. Nitrite mode of action: The inhibition of yeast pyruvate decarboxylase and clostridial pyruvate:ferredoxin oxidoreductase by nitric oxide and menadione. *ProQuest Dissertations Publishing*, p. 33.
213. McMIndes, M. K., 1988. *Nitrite mode of action: The inhibition of yeast pyruvate descaboxylasse and clostridial pyruvate:Ferredoxin oxidoreductase by nitric oxide and menadione*. Illinois: Tesis Doctoral. University of Illinois at Urbana-Champaign..
214. McSweeney, P. y otros, 1999. A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, Volumen 33, pp. 183-192.
215. Medeiros, . D., Sattar , S., Farber , J. & Carrillo, . C., 2008. Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian food service operation. *J. of Food Protection*, Volumen 71, pp. 2087-2093.
216. Membrillo, H. y otros, 1999. The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a "Nitric oxide Releaser," and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress.. *J Biol Chem*, 274(2), pp. 748-54.
217. Minor, T. & Marth, E., 1972. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food Intoxications. A Review II *Staphylococci in Dary Foods*. *J. Milk Food Technol.*, Volumen 35, pp. 77-82.
218. Miszczycha, S. D. P. F. G. S. J. E., Tenenhaus-Aziza, F. & Montel, M. C., 2013. Behavior of different Shiga toxin-producing *Escherichia coli* sero-types in various experimentally contaminated raw-milk cheeses.. *Applied and Environme Microbiology*, , Volumen 79, pp. 150 -158.

219. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A. & Griffiths, M. W., 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, Volumen 64, pp. 927-933.
220. Moir, J. & Wood, N., 2001. Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular life Sciences*, Issue 58, pp. 215-224.
221. Molina, L. H., Gallardo, E. & Brito, C. e. a., 1999. Efecto de la maduración en el contenido de nitratos y nitritos en quesos semiduros. *Agro sur*, 27(2), pp. 112-126.
222. Montoya, V. H. H., 2008. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Segunda ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
223. Mørk, T., Kvitle, B., Mathisen, T. & Jørgensen, H. J., 2010. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Veterinary Microbiology*, Volumen 141, pp. 134-141.
224. Mossel, D., Moreno, B. & Strujik, C., 2006. *Microbiología de los alimentos*. Segunda ed. Zaragoza, España: ACRIBIA.
225. Motarjemi, Y., Moy, G. & Todd, E., 2014. Streptococcus. En: *Encyclopedia of food safety*. s.l.:Academic Press, pp. 535-545.
226. Mühlig, A., Behr, J., Scherera, S. & Müller-Herbst, S., 2014. Stress Response of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to Acidified Nitrite. *American Society for Microbiology*, 80(20), pp. 6373-6382.
227. Muhoberac, B. B. & Wharton, D. C., 1980. EPR study heme- NO complexes of ascorbic acid reduced *Pseudomonas* cytochrome oxidase and corresponding model complexes.. *J. Biol. Chem*, Volumen 255, pp. 8437-8442.
228. Mussel, D., 1983. *Microbiología de los Alimentos*. España: Acribia,.

229. Nielsen, H. J. S. (., 1983. Composition of bacterial flora in sliced vacuum packed bologna – type sausage as influences by nitrite. *Journal of Food Technology*, Volumen 18, pp. 371-385.
230. Olmos, S., 2012. *Estudio ambiental, diagnóstico y manejo de nitratos en suelos agrícolas de la comarca lagunera*. [En línea]  
Available at:  
[http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2655/ROD\\_OLFO%20OLMOS%20SARMIENTO.pdf?sequence=1](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2655/ROD_OLFO%20OLMOS%20SARMIENTO.pdf?sequence=1)  
[Último acceso: 10 Diciembre 2016].
231. Pahissa, A., 2009. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona, España: MARGE BOOKS.
232. Palacios, S., 2006. *Caracterización Microbiológica de diversos tipos de Quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo. Tesis de licenciatura*. Tulancingo, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
233. Park, Y. y otros, 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiology*, Volumen 20, pp. 605-611.
234. Parra, H. & Adolfo, R., 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), pp. 93-105.
235. Pascual, A. M. d. R., 2005. *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. España: Ediciones Díaz de Santos.
236. Pascual, A. M. d. R. & Calderón, V., 1999. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. 2a ed. Madrid: Diaz de Santos.
237. Payne, W. J., 1973. Reduction of Nitrogenous Oxides by Microorganisms. *Bacteriological Reviews*, 37(4), pp. 409-405.

238. Peacock, S., 2005. Staphylococcus. En: *Microbiology and Microbial Infection*. Hodder Arnold, London: Topley & Wilson , pp. 771-832.
239. Pitt, J. & Hocking, A., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3a ed. New York: Springer Science and Business Media.
240. Poméon, T. & Cervantes, F., 2010. El sector lechero y queso en México de 1990 a 2009: entre lo global y local. *Reporte de Investigación*, Volumen 89, pp. 1-47.
241. Poock, S. R. y otros, 2002. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite. *the Biotechnology and Biological Sciences Research Council*, pp. 13-14.
242. Poole, R. K., 2001. *Advances in microbial physiology*. San Diego: Academic Press.
243. Porwollik, F., 2001. *Salmonella: From Genome to Function*. San Diego, CA: Horizon Scientific Press.
244. Potter, L. A. H. R. D. & C. J., 2001. Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria.. *Adv. Microb. Physiol*, Volumen 45, pp. 55-112.
245. Potter, M. E., Kaufmann, A. F., Blake, P. A. & Feldman., R. A., 1984. Unpasteurized milk: The hazards of a health fetish. *J. Am. Med. Assoc*, Volumen 252, pp. 2048-2052.
246. Prevention, C. f. D. C. a., 1999. Safer and healthier foods. *Morb. Mortal. Achievements in public health*, Volumen 48, pp. 905-913.
247. Quigley, L. y otros, 2013. The complex microbiota of raw milk. *Federation of European Microbiological Society*, pp. 664-698.
248. Quigley, L. y otros, 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* , 37(5), pp. 664-698.

249. Radcliffe, C. E., Akram, N. C., Hurrell, F. & Drucker, D. B., 2002. Effects of nitrite and nitrate on the growth and acidogenicity of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentistry*, Volumen 30, pp. 325-331.
250. Ramírez, R. J. C. y otros, 2011. Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.. *Fuente*, Issue 7, p. 2.
251. Ramírez, R. J. C. y otros, 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* , 2(7), pp. 1-16.
252. Randazzo, C., Vaughan , E. & Caggia, C., 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses.. *Int. Journal Food Microbiol.*, Volumen 109, pp. 1-8.
253. Ratón, O. & Milagros, T. d. I., 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(3).
254. Ray, B. & Bhunia, A., 2013. *Fundamental Food Microbiology*. Quinta ed. s.l.:CRC Press .
255. Regulation(EC), 2004. *Corrigendum to Regulation (EC.) No. 853/2004 of the European parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin*, s.l.: s.n.
256. Reinheimer, J. & Zalazar, C., 2006. *Avances en microbiología bioquímica y tecnología de quesos*. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral.
257. Reinheimer, J. & Zalazar, C., 2006. *Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. Argentina: Universidad Nacional del Litoral.
258. Revilla, A., 1982. *Tecnología de la leche. Procesamiento, manufactura y análisis*. Segunda ed. San. José, Costa Rica : IICA.

259. Richardson, D. J. B. B. C. R. D. A. S. S. & T. C. J., 1999. Functional, biochemical and genetic. *Cell. Mol. Life Sci.*, Volumen 58, pp. 77-84.
260. Ridley , H., Watts , C. A., Richardson , D. J. & Butler , C. S., 2006. Resolution of Distinct Membrane-Bound Enzymes from *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 That Are Responsible for Selective Reduction of Nitrate and Selenate Oxyanions. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 72(8), pp. 5179-5180.
261. Roberts, T. A. & Dainty, R. H., 1996. Nitrite and nitrate as food additives: rationale and mode of action . En: *Nitrates and Nitrites in Food and Water*. Cambridge, England: Woodhead Publishing, pp. 113-130.
262. Roberts, T. A., Woods, L. F. J., Payne, M. J. & Cammack, R., 1991. *Nitrite*. In: *Food Preservatives*. Glasgow: Blakie and son.
263. Robinson, R. K., 2002. *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*. Tercera ed. New York : Wiley- Interscience .
264. Robinson, R. & Wilbey, R., 2002. En: *Fabricación de Queso*. Zaragoza: Acribia, p. 1.
265. Rodríguez, C. E., 2005. *Bacteriología general : principios y prácticas de laboratorio*. San José, Costa Rica : Editorial de la Universidad de Costa Rica.
266. Rogosa, M., 1961. Experimental Conditions for Nitrate Reduction by Certain. *I. gen. Microbiol*, Volumen 24, pp. 401-406.
267. Rohrbach, R. W., Draughon, F. A., Davidson, P. M. & Oliver, S. P., 1992. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in bulk tank milk: Risk factors and risk of human exposure. *J. Food Prot.* , Volumen 55, pp. 93-97.
268. Rojas Ronquillo, M. R., Cruz Bautista, E., Daniel Renteria, I. d. C. & Lammoglia Villagómez, M. A., 2014. Determinación de la calidad microbiológica de la leche cruda de vaca. *Academia Journals* , pp. 1107-1111.

269. Román, S., Guerrero, L. & Pacheco, L., 2003. Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. *FCV-LUZ*, XIII(2), pp. 146-152.
270. Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B. S. S. & Lindqvist, R., 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 144, pp. 263-269.
271. Rowe, J. J. y otros, 1994. NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12(4), pp. 579-586.
272. Rowe, J. J., Yarbrough, J. M., Rake, B. & Eagon, G., 1979. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, 2(1), pp. 51-54.
273. Rowe, J., M, Y. J., Blake, J. B. & Eagon, R. G., 1979. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology*, Volumen II, pp. 51-54.
274. Ryser, E. & Marth, E., 1987. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. *Dairy Sci.*, Volumen 72, pp. 838-853.
275. Sandine, W. & Ellieker, P., 1970. Microbially Induced Flavors and Fermented foods Flavour in Fermented Dairy Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Issue 18, pp. 557-562.
276. Santarelli, M. y otros, 2008. ) Whey starter for Grana Padano cheese: effect of technological parameters on viability and composition of the microbial community. *J. Dairy Sci.* , Volumen 91, pp. 883-891.
277. Sanz, Y. y otros, 1997. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2), pp. 225-229.



278. Sarimhmetoglu, B. y otros, 2009. Detection of Escherichia coli O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control*, Volumen 20, pp. 357-361.
279. Schardinger, F., 1892. Über das Vorkommen Gährung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurtheilung desselben.. Volumen 5, pp. 403-405, 421-423.
280. Schoder, D., Rossmannith, P., Glaser, K. & Wagner, M., 2012. Fluctuation in contamination dynamics of *L. monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 157, pp. 326-331.
281. Showe, M. K. a. J. A. D., 1968. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in Escherichia coli. *J. Bacteriol*, Volumen 95, pp. 1305-1313.
282. Simoni, R. D. a. M. K. S., 1970. Coupling of energy to active transport of amino acids in Escherichia coli. *Proc. Nat.Acad. Sci U.S.A*, Volumen 69, pp. 365-372.
283. Simon, J., 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev*, 26(3), pp. 285-309.
284. Simon, J., 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification.. *FEMS MICROBIOL REV*, pp. 285-309.
285. Singhal, R. S. & Kilkarni, P. R., 2000. Permitted preservatives. Nitrite and Nitrate. En: R. K. Robinson, C. A. Batt & P. Patel., edits. *Encyclopaedia of Food Microbiology Volunen 3*. London: Academic Press, pp. 1762-1769.
286. Singhal, R. S. & Kulkarni, P. R., 2000. Permitter preservatives- Nitrate and Nitrite. En: *Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3*. London: Academic Press, pp. 1762-1768.

287. Sofos, J., Busta, E. & Allen, C., 1979. Clostridium botulinum control by sodium nitrite and potassium sorbate in various meat and soy protein formulations. *Journal of Food Science*, Volumen 44, pp. 1162- 1666.
288. Sonomoto, K. & Yokota, A., 2011. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research. *Horizon Cientific Press*.
289. Sparacino - Watkins, C., Stolz F., J. & Basu, P., 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Royal Society Of Chemistry* , Volumen 1, pp. 676-706.
290. Spencer, J. F. T. & Ragout, S. A. L., 2001. *Food Microbiology Protocols*. s.l.:Human Press .
291. Stainer, Y. R., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. & Painter, P. R., 1996. *Microbiología*. 2a ed. s.l.:Reverté.
292. Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 36 , pp. 1-29.
293. Subramaniam, P., 2016. *Stability and Shelf Life of Food*. Segunda ed. s.l.: Elsevier.
294. Surekha, M. & Reddy, S. A. P. L. U. 1.-. 1., 2000. Preservatives. Classification and Propieties. En: R. Robinson, C. Batt & P. Patel, edits. *In Encylopaedia of Food Microbiology*. Volunen 3. London: Academic Press, pp. 1710- 1717.
295. Sussman, M., 1997. *Escherichia coli: mechanism of virulence*. Cambridge: Univ. Press.
296. Takahashi, H., Taniguchi, S. & Egami, F., 1956. NITRATE REDUCTION IN AEROBIC BACTERIA AND. *The Journal of Biochemistry*, pp. 223-232.

297. Tamime, A. Y., 2009. *Milk Processing and Quality Management*. Delhi, India : John Wiley & Sons.
298. Tiso , M. & Schechter , A. N., 2015. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PLoS One*, 10(3), pp. 1-18.
299. Tiso, M. & Schechter, N. A., 2015. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *Molecular Medicine Branch*, pp. 1-18.
300. Tompkin, R., 1993. *Nitrite*. In: *Antimicrobials in Foods*. 2a ed. New York: Davidson, P. M., Branen, A. L..
301. Torres, A., Arena, H. & M, Y. M. ..., 2010. *Pathogenic Escherichia coli in Latino América*, s.l.: Bentham e Books.
302. Tortora, G., Funke, B. & Christine, C., 2013. En: *Microbiology an introduction*. 11 ed. United States of America.: Pearson, pp. 949-950.
303. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L., 2007. *Introducción a la microbiología*. Novena ed. Buenos Aires : Médica Panamericana.
304. Tsai, S.-h. & Chou, C.-c., 1996. Injury, Inhibition and Inactivation of Escherichia coli O157:H7 by Potassium Sorbate and Sodium Nitrite as Affected by pH and Temperature. *Science of Food and Agriculture* , Volumen 72, pp. 10-12.
305. UPLA, 2014. *Unión de Productores Lácteos de Aculco S.A. de C.V. Productos Lácteos*. s.l.:s.n.
306. Vacheyrou, M. y otros, 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiology*, Volumen 146, pp. 253-262.
307. Valencia, M. Ó., 2001. *Manual para la Elaboración de Productos Lácteos*. México: UCOL.

308. Varnam, A. & Sutherland, J., 1995. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología*. España: Acribia S.A.
309. Varnam, A. & Sutherland, J., 1995. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología*. España: Acribia S.A.
310. Vázquez, M., 2001. *Avances en seguridad alimentaria*. España: Altaga.
311. Veisseyre, R., 1988. *Lactología técnica*. Segunda ed. Zaragoza España: Acribia.
312. Villada, M. J. J., 2010. *Conseradores químicos utilizados en la industria alimetaria*. [En línea]  
Available at:  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/456/61581s.pdf?sequence=1>  
[Último acceso: 15 Diciembre 2016].
313. Villegas de Gante, A., 2004. *Tecnología Quesera*. 1a ed. México: Trilladas.
314. Villegas de Gante, A., 2004. *Tecnología Quesera*. En: Primera ed. México: Trilladas, pp. pp. 63-64.
315. Villegas de Gante, A. & Cervantes, E. F., 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. En: *Estudios sociales*. Hermosillo, Son: s.n., pp. 1-19..
316. Vithanagea, N. R. y otros, 2016. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, Volumen 57, pp. 80-90.
317. Walstra, P., 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zargoza, España: Acribia.

318. Walstra, P. y otros, 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia.
319. Wareing, Stuart, P., Fernandes, F. & Rhea., 2010. *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists*. 7a ed. s.l.:Royal Society of Chemistry.
320. Washington, C. W. & Elmer, W. K., 2008. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
321. Westall, S. & Filtenborg, O., 1998. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiol*, Volumen 15, pp. 243-249.
322. Westall, S. & Filtenborg, O., 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, Volumen 15, p. 215–222.
323. Wonderen, J. H. v., Burlat, B. & Richardson, D. J., 2008. The Nitric Oxide Reductase Activity of Cytochrome c Nitrite Reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 283, pp. 9587-9594..
324. Woods, L. F. J., Wood, J. & Gibbs, P., 1981. The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogens* by sodium nitrite.. *J. Gen. Microbiol.*, Volumen 125, pp. 399-410.
325. Woods, L. F. & Wood, J. M., 1982. The effect of nitrate inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriology*, Volumen 52, pp. 109-110.
326. Yang, T., 1985. Mechanism of nitrite inhibition of cellular respiration in *Pseudomonas aeruginosa*.. *Curr. Microbiology*, Volumen 12, pp. 35-40.
327. Yarbrough, J. M., J.B., R. & R.G., E., 1980. Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite: Inhibition of Active Transport, but not of Group Translocation, and of Intracellular Enzymes.. *Applied and Enviromental Microbiology*, 39(4), pp. 831-834.

328. Yarbrough, J., Rake, J. & Eagon, R., 1980. Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite: Inhibition of Active Transport, but not of Group Translocation, and of Intracellular Enzymes.. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), pp. 831-834.
329. Yarbrough, J., Rake, J. & Eagon, R., 1980. Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite: Inhibition of Active Transport, But Not of Group Translocation, and of Intracellular Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), pp. 831-834.
330. Yoon, Y., Lee, S. & C, K.-H., 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Elsevier. Food control* , Volumen 63, pp. 201 -215.
331. Yousef, A. E. & Carlstrom, C. C., 2003. *Food microbiology : a laboratory manual*. United States of America : Hoboken, NJ : Wiley.
332. Zaika, L. y otros, 1994. Model for the combined effects of temperatura, initial Ph, sodium chloride an sodium nitrite concentrations on anaerobic growth of *Shigella flexneri*. *International Journal of Food and Microbiology*, 23, 345- 358., Volumen 23, pp. 345- 358..

# V. ANEXOS

## Anexo 1. Curva patrón para Nitrito y Nitrato

### 1.1. Preparación de curva patrón para Nitrito

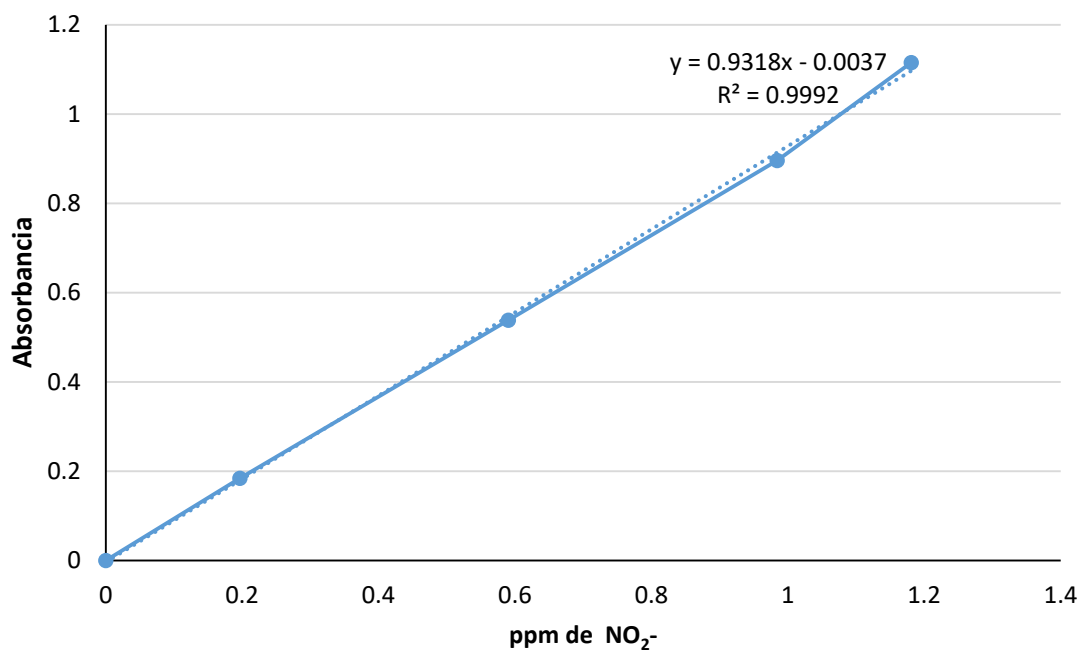
- 1.1.1. Pesar 15 mg ( $\pm 0.1$  mg) de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) (Sigma-Aldrich, 99.0%) en un matraz volumétrico de 100ml y aforar hasta la marca con agua bidestilada (solución stock= 100mg de nitrito /L).
- 1.1.2. Preparar una curva de calibración de nitrito por dilución de la solución stock con agua bidestilada para obtener concentraciones de 0 a 5mg/L.
- 1.1.3. Preparar la curva de acuerdo al apartado 1.3 del anexo 2 y realizar la medición a 540 nm en espectrofotómetro.

### 1.2. Preparación de curva patrón para Nitrate

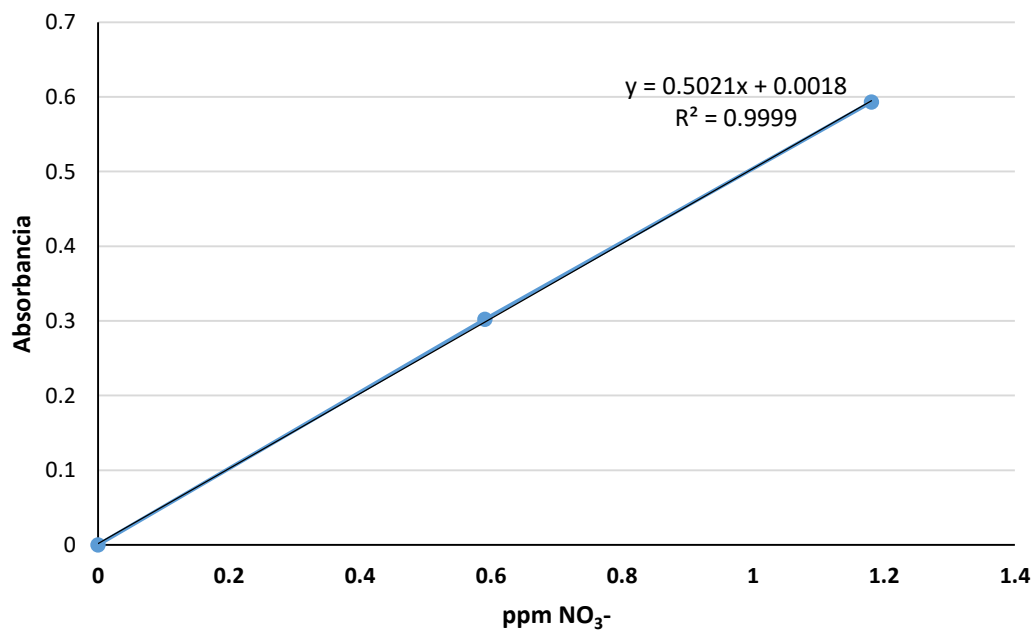
- 1.2.1. Pesar 16.3 mg ( $\pm 0.1$  mg) de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) (Merck, 99.0%) en un matraz volumétrico de 100ml y se aforo hasta la marca con agua bidestilada (solución stock= 100mg de nitrato /L).
- 1.2.2. Preparar una curva de calibración de nitrato por dilución de la solución stock con agua bidestilada para obtener concentraciones de 0 a 5mg/L.
- 1.2.3. Preparar la curva de acuerdo al apartado 1.3 del anexo 2 y realizar la medición a 540 nm en espectrofotómetro.



Curva patrón para Nitrito NO<sub>2</sub><sup>-</sup>



Curva patrón para Nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup>



Anexo  
2.

## Determinación de nitrito y nitrato en productos lácteos

### 1.1. Reactivos

- 1.1.1 Agua bidestilada
- 1.1.2 NaOH 1 molar
- 1.1.3 Reactivo de Carrez 1 (15g de Potasio hexacianferrato (II)  $K_4(Fe(CN)_6) \times 3H_2O$  /100mL)
- 1.1.4 Reactivo de Carrez 2 (30g de Zinc Sulfato,  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  /100mL)
- 1.1.5 NaOH 1 molar
- 1.1.6 Solución de fosfato de potasio, pH 7.5
- 1.1.7 Nitrato reductasa liofilizada
- 1.1.8 Sulfanilamida y estabilizadores
- 1.1.9 4 N- (1- naftilo) – Etilendiamina.
- 1.1.10 Tabletas con: 0.5 mg NADPH, 0.01 mg FAD y estabilizadores

### 1.2. Tratamiento de la muestra

- 1.2.1. Agregar 2 ml de muestra en un matraz de 100mL.
- 1.2.2. Adicionar 50ml de agua bidestilada en ebullición y mezclar.
- 1.2.3. Calentar el matraz en un baño de agua en ebullición cerca de 15 min.
- 1.2.4. Enfriar el matraz hasta 15 o 25°C y adicionar 3mL de las soluciones Carrez 1 y Carrez 2, mezclar bien después de cada adición
- 1.2.5. Ajustar el pH de la solución a 8 con NaOH 1M y mezclar nuevamente.
- 1.2.6. Transferir el contenido del matraz a un matraz volumétrico de 100mL y aforar con agua bidestilada hasta la marca.
- 1.2.7. Transferir una alícuota a un tubo de centrifuga y centrifugar a 6000rpm por 15min.
- 1.2.8. Filtrar el supernadante con papel filtro N°42

Nota: descartar los primeros mililitros y usar solo el filtrado claro para medición de absorbancia.

### 1.3. Lectura de la muestra

Posterior a el tratamiento de la muestra se preparan las soluciones a medir utilizando los reactivos del Kit “Nitrate/Nitrite Colorimetric Method” a las concentraciones y tiempos indicados, se presentan en la siguiente tabla y se realiza su lectura a 540nm.

Pipetear:	Blanco de nitrito	Muestra de nitrito	Blanco de nitrato	Muestra de nitrato
Muestra	-	0.500 mL	-	0.500 mL
Agua bidestilada	0.770 mL	0.270 mL	0.500 mL	-
Mezcla de reacción 2 <sup>1</sup>	-	-	0.250 mL	0.250 mL
Solución 3 <sup>2</sup>	-	-	0.020 ml	0.020 mL
Mezclar e incubar durante 30 minutos a +15 a + 25 ° C				
Reactivo de color 1 <sup>3</sup>	0.250 mL	0.250 mL	0.250 mL	0.250 mL
Reactivo de color <sup>4</sup>	0.250 mL	0.250 mL	0.250 mL	0.250 mL
Agua bidestilada	1.270 mL	1.270 mL	1.270 mL	1.270 mL
Mezclar y deje reposar en la oscuridad a +15 a + 25 ° C durante 10 a 15 minutos. Realizar la lectura.				

<sup>1</sup>Tableta (0.5 mg NADPH, 0.01 mg FAD y estabilizadores) en 3ml de solución de fosfato de potasio, pH 7.5. <sup>2</sup>4U de nitrato reductasa liofilizada en 0.7ml de agua bidestilada. <sup>3</sup>Sulfanilamida y estabilizadores. <sup>4</sup>N- (1- naftilo) – Etilendiamina.

### Condiciones de lectura

- Longitud de onda: 540nm
- Volumen de la muestra: 2.54 ml
- Temperatura: 20 a 25°C

#### 1.4. Cálculos

El resultado se calcula a partir de las curvas de calibración construidas utilizando las soluciones estándar. Se traza el cambio en la absorbancia obtenida para las soluciones estándar de nitrito de sodio y nitrato de potasio en el eje y contra las concentraciones correspondientes de nitrito o nitrato en mg / L en el eje x.

$$\Delta A_{\text{nitrito}} = A_{\text{nitrito}} - A_{\text{blanco nitrito}}$$

$$\Delta A_{\text{nitrito+nitrato}} = A_{\text{nitrito+nitrato}} - A_{\text{blanco nitrito+nitrato}}$$

$$\Delta A_{\text{nitrato}} = \Delta A_{\text{nitrito+nitrato}} - \Delta A_{\text{nitrito}}$$

Se determinan las concentraciones de nitrito y nitrato en la muestra de las curvas de calibración utilizando el cambio en la absorbancia medida. Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución F.

Los resultados se determinan como nitrito de sodio y nitrato de potasio. El factor de conversión de NaNO<sub>2</sub> a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) es 46.006: 68.995 = 0.667 y de KNO<sub>3</sub> a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 62.005: 101.11 = 0.613.

### ANEXO 3. Microbiología de leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

Bacterias	Nitrato A				Nitrato AG			
	Tiempo (h)	Control	150ppm	800ppm	Tiempo (h)	Control	150ppm	800ppm
		Log UFC/MI				Log UFC/mL		
MESOFILOS	0	7.185 (±0.43)	7.185 (±0.43)	7.185 (±0.43)	0	7.471 (±0.21)	7.471 (±0.21)	7.471 (±0.21)
	1	7.197 (±0.34)	7.028 (±0.50)	7.009 (±0.52)	1	7.450 (±0.12)	7.053 (±0.13)	7.039 (±0.59)
	5	8.007 (±0.05)	7.812 (±0.04)	7.776 (±0.19)	5	8.215 (±0.31)	8.162 (±0.25)	7.965 (±0.10)
PSICRÓTROFOS	0	7.795(±0.24)	7.795 (±0.24)	7.795 (±0.24)	0	6.119 (±1.47)	6.119 (±1.47)	6.119 (±1.47)
	1	7.800 (±0.38)	7.736 (±0.20)	7.837 (±0.17)	1	6.170 (±1.46)	6.037 (±1.35)	6.118 (±1.33)
	5	8.303 (±0.44)	8.215 (±0.51)	8.208 (±0.50)	5	6.407 (±1.40)	6.304 (±1.68)	6.274 (±1.67)
STREPTOCOCCUS	0	8.279 (±0.61)	8.279 (±0.61)	8.279(±0.61)	0	7.474 (±0.30)	7.474 (±0.30)	7.474 (±0.30)
	1	8.317 (±0.61)	8.119 (±0.52)	8.159 (±0.51)	1	7.438 (±0.23)	7.004 (±0.22)	7.326 (±0.49)
	5	8.921 (±0.13 )	8.764 (±0.19)	8.664 (±0.38)	5	8.541 (±0.21)	8.485 (±0.09)	8.201 (±0.30)
LACTOBACILLUS	0	7.003 (±0.36)	7.003 (±0.36)	7.003 (±0.36)	0	7.423 (±0.12)	7.423 (±0.12)	7.423 (±0.12)
	1	7.228 (±0.42)	7.197 (±0.38)	7.178 (±0.38)	1	7.525 (±0.20)	7.534 (±0.88)	7.483 (±0.14)
	5	9.348 (±0.40)	9.345 (±0.30)	9.301 (±0.41)	5	9.094 (±0.38)	8.946 (±0.55)	8.671 (±0.63)
COLIFORMES TOTALES	0	6.734 (±0.44)	6.734 (±0.44)	6.734 (±0.44)	0	7.107 (±0.21)	7.107 (±0.21)	7.107 (±0.21)
	1	6.904 (±0.36)	6.870 (±0.40)	6.862 (±0.42)	1	7.290 (±0.23)	7.162 (±0.01)	7.287 (±0.11)
	5	7.263 (±0.12)	6.933 (±0.09)	6.878 (±0.10)	5	8.157 (±0.05)	7.847 (±0.13)	7.839 (±0.14)
S.AUREUS	0	5.078 (±0.28)	5.078 (±0.28)	5.078 (±0.28)	0	4.322 (±0.72)	4.322 (±0.72)	4.322 (±0.72)
	1	5.431 (±0.45)	5.000 (±0.37)	4.903 (±0.38)	1	5.380 (±0.43)	4.736 (±0.22)	4.609 (±0.09)
	5	6.000 (±0.32)	5.903 (±0.30)	5.845 (±0.27)	5	6.448 (±0.82)	5.991 (±0.29)	5.989 (±0.29)
MOHOS Y LEVADURAS	0	3.694 (±0.32)	3.694 (±0.32)	3.694 (±0.32)	0	4.695 (±0.27)	4.695 (±0.27)	4.695 (±0.27)
	1	3.694 (±0.43)	3.506 (±0.32)	3.562 (±0.22)	1	4.836 (±0.35)	3.869 (±0.37)	4.467 (±0.24)
	5	4.778 (±0.30)	4.169 (±0.28)	4.162 (±0.39)	5	5.945 (±0.28)	5.422 (±0.25)	4.883 (±0.27)
E.coli	0	6.663 (±0.98)	6.663 (±0.98)	6.663 (±0.98)	0	6.663 (±0.77)	6.663 (±0.67)	6.663 (±0.69)
	1	7.041 (±0.71)	7.042 (±0.61)	7.041 (±0.17)	1	7.041 (±0.86)	6.663 (±0.78)	6.380 (±0.66)
	5	7.042 (±071)	7.042 (±0.85)	7.042 (±0.94)	5	7.042 (±0.75)	7.042 (±0.87)	7.042 (±0.77)

#### ANEXO 4. Nitratos y Nitritos en leche poco contaminada

Tipo de nitrato usado	Tiempo (h)	KNO <sub>3</sub>		Tiempo (h)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
		Absorbancia	Ppm		Absorbancia	ppm
Nitrato grado alimenticio 150ppm	0	0.0090	5.7720	0	0.0050	0.0000
	1	0.0085	5.3597	1	0.0050	0.0000
	3	0.0095	6.4065	3	0.0045	-0.1363
	5	0.0090	5.7720	5	0.0050	0.0000
Nitrato grado alimenticio 800ppm	0	0.6660	547.5190	0	0.0055	0.0000
	1	0.6630	544.6009	1	0.0065	0.2726
	3	0.6630	543.9344	3	0.0080	0.6815
	5	0.6620	543.1099	5	0.0080	0.6815
Nitrato grado agrícola 150ppm	0	0.0020	1.6492	0	0.0065	0.0000
	1	0.0025	1.8393	1	0.0070	0.1363
	3	0.0025	1.6171	3	0.0075	0.2726
	5	0.0025	2.2836	5	0.0060	-0.1363
Nitrato grado agrícola 800ppm	0	0.6670	541.7469	0	0.0010	0.0000
	1	0.6645	538.3525	1	0.0040	0.8178
	3	0.6465	521.9550	3	0.0075	1.7718
	5	0.6415	515.8327	5	0.0120	2.9985

### ANEXO 5. Nitratos y Nitritos en leche muy contaminada

Tipo de nitrato usado	Tiempo (h)	KNO <sub>3</sub>		Tiempo (h)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
		Absorbancia	Ppm		Absorbancia	ppm
Nitrato grado alimenticio 150ppm	0	0.0095	6.1893	0	0.0070	0.0000
	1	0.0095	3.9659	1	0.0120	1.3630
	3	0.0095	3.5212	3	0.0130	1.6355
	5	0.0090	2.8863	5	0.0135	1.7718
Nitrato grado alimenticio 800ppm	0	0.6650	547.1376	0	0.0115	0.0000
	1	0.6630	528.3668	1	0.0500	10.4947
	3	0.6620	341.4417	3	0.4685	124.5739
	5	0.6605	203.0191	5	0.7770	208.6682
Nitrato grado agrícola 150ppm	0	0.0055	1.6492	0	0.0070	0.0000
	1	0.0055	1.8393	1	0.0075	0.1363
	3	0.0055	1.6171	3	0.0075	0.1363
	5	0.0045	2.2836	5	0.0055	-0.4089
Nitrato grado agrícola 800ppm	0	0.7615	2.8884	0	0.0115	0.0000
	1	0.7370	2.6660	1	0.1025	24.8058
	3	0.7250	2.6660	3	0.5485	146.3812
	5	0.7190	2.7301	5	0.9115	245.3316

**ANEXO 6. Microbiología de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, Coliformes Totales y *E.coli* en leche UHT adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones**

Bacterias	Nitrato A				Nitrato AG			
	Tiempo (h)	Control	150ppm	800ppm	Tiempo (h)	Control	150ppm	800ppm
		Log UFC/mL				Log UFC/mL		
STREPTOCOCCUS	0	6.954	6.954	6.954	0	6.954	6.954	6.954
	1	7.817	6.807	7.093	1	7.817	6.408	6.560
	3	8.444	8.369	8.313	3	8.444	7.717	8.331
	5	9.230	9.038	8.941	5	9.230	8.859	8.964
LACTOBACILLUS	0	5.845	5.845	5.845	0	5.643	5.643	5.643
	1	5.889	5.854	5.895	1	5.782	5.708	5.875
	3	7.106	7.215	7.169	3	7.154	7.389	7.401
	5	8.043	7.954	7.881	5	8.132	7.836	7.991
COLIFORMES TOTALES	0	5.993	5.993	5.993	0	5.993	5.993	5.993
	1	7.012	7.214	7.072	1	7.012	7.027	7.215
	3	8.179	8.176	8.348	3	8.179	8.201	7.455
	5	9.204	9.275	9.412	5	9.204	9.055	9.316

Bacterias	150ppm			800ppm				
	Tiempo (h)	Control	Nitrato A	Nitrato AG	Tiempo (h)	Control	Nitrato A	Nitrato AG
		Log UFC/mL				Log UFC/mL		
E.coli	0	8.042	8.042	8.042	0	6.724	6.724	6.724
	1	8.042	7.663	7.954	1	7.663	8.042	8.041
	3	9.042	8.362	7.973	3	8.042	8.042	8.041
	5	9.042	8.978	8.978	5	8.042	8.042	8.041

**ANEXO 7. Concentración de nitrito iónico (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en leche UHT con *Lactobacillus*, *Streptococcus*, Coliformes Totales y *E.coli* , adicionada con nitrato A y AG**

Tipo de nitrato usado	Tiempo (h)	Coliformes T.		E. coli		Lactobacillus		Streptococcus	
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
		Absorbancia	Ppm	Absorbancia	ppm	Absorbancia	Ppm	Absorbancia	Ppm
Nitrato grado alimenticio 150ppm	0	0.029	0.000	0.031	0.000	0.017	0.000	0.043	0.000
	1	0.049	4.361	0.064	4.907	0.017	0.000	0.060	4.634
	3	0.136	26.441	0.097	13.630	0.018	0.273	0.113	19.081
	5	0.026	1.090	0.089	2.181	0.017	0.000	0.070	7.360
Nitrato grado alimenticio 800ppm	0	0.004	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.043	0.000
	1	0.009	1.363	0.027	0.000	0.018	0.273	0.063	5.452
	3	0.016	3.271	0.261	65.967	0.017	0.000	0.162	32.438
	5	0.136	35.982	0.986	266.049	0.017	0.000	0.821	212.076
Nitrato grado agrícola 150ppm	0	0.029	0.000	0.031	0.000	0.020	0.000	0.043	0.000
	1	0.035	0.545	0.042	-1.090	0.021	0.273	0.082	10.631
	3	0.101	16.901	0.102	14.992	0.020	0.000	0.071	7.633
	5	0.017	-1.363	0.087	1.636	0.020	0.000	0.085	11.449
Nitrato grado agrícola 800ppm	0	0.004	0.000	0.017	0.000	0.020	0.000	0.043	0.000
	1	0.007	0.818	0.031	1.090	0.020	0.000	0.046	0.818
	3	0.015	2.998	0.230	57.517	0.019	-0.273	0.114	19.354
	5	0.130	34.346	0.823	221.616	0.020	0.000	0.790	203.625



## ANEXO 8. ANOVA para microbiología en leche cruda adicionada con dos tipos de nitrato a dos concentraciones

MESOFILOS								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	1.099	3	0.366			
		Total	1.099	5				
	1	Entre grupos	0.043	2	0.022	0.051	9.552	0.951
		Dentro de los grupos	1.274	3	0.425			
		Total	1.317	5				
	5	Entre grupos	0.061	2	0.031	7.921	9.552	0.064
		Dentro de los grupos	0.012	3	0.004			
		Total	0.073	5				
NITRATO AGRICOLA	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.266	3	0.089			
		Total	0.266	5				
	1	Entre grupos	0.218	2	0.109	0.446	9.552	0.677
		Dentro de los grupos	0.732	3	0.244			
		Total	0.950	5				
	5	Entre grupos	0.068	2	0.034	0.313	9.552	0.753
		Dentro de los grupos	0.327	3	0.109			
		Total	0.396	5				

PSICROTROFOS								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.355	3	0.118			
		Total	0.355	5				
	1	Entre grupos	0.010	2	0.005	0.037	9.552	0.965
		Dentro de los grupos	0.425	3	0.142			
		Total	0.436	5				
	5	Entre grupos	0.011	2	0.006	0.012	9.552	0.988
		Dentro de los grupos	1.385	3	0.462			
		Total	1.396	5				
NITRATO AGRICOLA	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	12.897	3	4.299			
		Total	12.897	5				
	1	Entre grupos	0.018	2	0.009	0.002	9.552	0.998
		Dentro de los grupos	11.458	3	3.819			
		Total	11.476	5				
	5	Entre grupos	0.020	2	0.010	0.002	9.552	0.998
		Dentro de los grupos	15.141	3	5.047			
		Total	15.161	5				

<b>STREPTOCOCCUS</b>								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
<b>NITRATO ALIMENTICIO</b>	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.001	3	0.000			
		Total	0.001	5				
	1	Entre grupos	0.044	2	0.022	0.036	9.552	0.965
		Dentro de los grupos	1.799	3	0.600			
		Total	1.842	5				
	5	Entre grupos	0.067	2	0.034	0.255	9.552	0.790
		Dentro de los grupos	0.395	3	0.132			
		Total	0.462	5				
<b>NITRATO AGRICOLA</b>	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.533	3	0.178			
		Total	0.533	5				
	1	Entre grupos	0.202	2	0.101	0.447	9.552	0.676
		Dentro de los grupos	0.679	3	0.226			
		Total	0.882	5				
	5	Entre grupos	0.133	2	0.067	0.688	9.552	0.568
		Dentro de los grupos	0.290	3	0.097			
		Total	0.423	5				

<b>LACTOBACILLUS</b>								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
<b>NITRATO ALIMENTICIO</b>	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	1.1138E-06	3	3.7126E-07			
		Total	1.1138E-06	5				
	1	Entre grupos	0.003	2	0.001	1.330	9.552	0.386
		Dentro de los grupos	0.003	3	0.001			
		Total	0.005	5				
	5	Entre grupos	0.003	2	0.001	2.481	9.552	0.231
		Dentro de los grupos	0.002	3	0.001			
		Total	0.005	5				
<b>NITRATO AGRICOLA</b>	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.080	3	0.027			
		Total	0.080	5				
	1	Entre grupos	0.013	2	0.007	1.420	9.552	0.368
		Dentro de los grupos	0.014	3	0.005			
		Total	0.027	5				
	5	Entre grupos	0.185	2	0.092	0.163	9.552	0.856
		Dentro de los grupos	1.696	3	0.565			
		Total	1.880	5				

COLIFORMES TOTALES								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	0	Entre grupos	2.2204E-16	2	1.1102E-16	2.8425E-16	9.552	1
		Dentro de los grupos	1.172	3	0.391			
		Total	1.172	5				
	1	Entre grupos	0.002	2	0.001	0.003	9.552	0.997
		Dentro de los grupos	0.933	3	0.311			
		Total	0.935	5				
	5	Entre grupos	0.214	2	0.107	97.933	9.552	0.002
		Dentro de los grupos	0.003	3	0.001			
		Total	0.218	5				
NITRATO AGRICOLA	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.000	3	0.000			
		Total	0.000	5				
	1	Entre grupos	0.014	2	0.007	5.252	9.552	0.105
		Dentro de los grupos	0.004	3	0.001			
		Total	0.018	5				
	5	Entre grupos	0.335	2	0.168	899.652	9.552	0.000
		Dentro de los grupos	0.001	3	0.000			
		Total	0.336	5				

STAPHYLOCOCCUS AUREUS								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	0.008	3	0.003			
		Total	0.008	5				
	1	Entre grupos	0.281	2	0.140	0.426	9.552	0.688
		Dentro de los grupos	0.989	3	0.330			
		Total	1.270	5				
	5	Entre grupos	0.014	2	0.007	0.064	9.552	0.939
		Dentro de los grupos	0.324	3	0.108			
		Total	0.338	5				
NITRATO AGRICOLA	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	3.108	3	1.036			
		Total	3.108	5				
	1	Entre grupos	0.633	2	0.316	3.387	9.552	0.170
		Dentro de los grupos	0.280	3	0.093			
		Total	0.913	5				
	5	Entre grupos	0.032	2	0.016	0.124	9.552	0.888
		Dentro de los grupos	0.384	3	0.128			
		Total	0.415	5				

MOHOS Y LEVADURAS								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	0	Entre grupos	8.8818E-16	2	4.4409E-16	1.8621E-16	9.552	1
		Dentro de los grupos	7.155	3	2.385			
		Total	7.155	5				
	1	Entre grupos	0.038	2	0.019	0.007	9.552	0.993
		Dentro de los grupos	8.100	3	2.700			
		Total	8.137	5				
	5	Entre grupos	0.389	2	0.194	0.088	9.552	0.918
		Dentro de los grupos	6.609	3	2.203			
		Total	6.998	5				
NITRATO AGRICOLA	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	2.334	3	0.778			
		Total	2.334	5				
	1	Entre grupos	1.076	2	0.538	1.737	9.552	0.315
		Dentro de los grupos	0.929	3	0.310			
		Total	2.005	5				
	5	Entre grupos	1.129	2	0.564	165.617	9.552	0.001
		Dentro de los grupos	0.010	3	0.003			
		Total	1.139	5				

E.coli								
Tipo de nitrato	Tiempo (h)	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	2.853	3	0.951			
		Total	2.853	5				
	1	Entre grupos	0.872	2	0.436	1.495	9.552	0.354
		Dentro de los grupos	0.875	3	0.292			
		Total	1.746	5				
	5	Entre grupos	3.534	2	1.767	1.066	9.552	0.447
		Dentro de los grupos	4.970	3	1.657			
		Total	8.504	5				
NITRATO AGRICOLA	0	Entre grupos	0.000	2	0.000	0.000	9.552	1.000
		Dentro de los grupos	2.853	3	0.951			
		Total	2.853	5				
	1	Entre grupos	0.819	2	0.409	1.605	9.552	0.336
		Dentro de los grupos	0.766	3	0.255			
		Total	1.585	5				
	5	Entre grupos	1.504	2	0.752	1.468	9.552	0.359
		Dentro de los grupos	1.536	3	0.512			
		Total	3.040	5				

### Anexo 9. Anova para NO<sub>2</sub> Y NO<sub>3</sub> en leche poco contaminada

<b>ANOVA para NO<sub>3</sub> en leche poco contaminada</b>								
Tipo de nitrato	Concentración	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	150ppm	Entre grupos	0.422	3	0.141	0.843	6.591	0.537
		Dentro de los grupos	0.667	4	0.167			
		Total	1.089	7				
	800ppm	Entre grupos	8.309	3	2.770	4.672	6.591	0.085
		Dentro de los grupos	2.371	4	0.593			
		Total	10.680	7				
NITRATO AGRICOLA	150ppm	Entre grupos	0.213	3	0.071	0.235	6.591	0.868
		Dentro de los grupos	1.206	4	0.302			
		Total	1.419	7				
	800ppm	Entre grupos	355.357	3	118.452	121.315	6.591	0.000
		Dentro de los grupos	3.906	4	0.976			
		Total	359.263	7				

<b>ANOVA para NO<sub>2</sub> en leche poco contaminada</b>								
Tipo de nitrato	Concentración	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	150ppm	Entre grupos	0.028	3	0.009	1.000	6.591	0.479
		Dentro de los grupos	0.037	4	0.009			
		Total	0.065	7				
	800ppm	Entre grupos	0.669	3	0.223	1.714	6.591	0.301
		Dentro de los grupos	0.520	4	0.130			
		Total	1.189	7				
NITRATO AGRICOLA	150ppm	Entre grupos	0.186	3	0.062	3.333	6.591	0.138
		Dentro de los grupos	0.074	4	0.019			
		Total	0.260	7				
	800ppm	Entre grupos	9.985	3	3.328	358.333	6.591	0.000
		Dentro de los grupos	0.037	4	0.009			
		Total	10.022	7				

### Anexo. Anova para NO<sub>2</sub> Y NO<sub>3</sub> en leche muy contaminada

#### ANOVA para NO<sub>3</sub> en leche muy contaminada

Tipo de nitrato	Concentración	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	150ppm	Entre grupos	5.128	3	1.709	10.090	6.591	0.025
		Dentro de los grupos	0.678	4	0.169			
		Total	5.806	7				
	800ppm	Entre grupos	60317.226	3	20105.742	37381.510	6.591	2.3852E-09
		Dentro de los grupos	2.151	4	0.538			
		Total	60319.377	7				
NITRATO AGRICOLA	150ppm	Entre grupos	0.025	3	0.008	0.068	6.591	0.974
		Dentro de los grupos	0.485	4	0.121			
		Total	0.510	7				
	800ppm	Entre grupos	89591.051	3	29863.684	35541.060	6.591	2.6386E-09
		Dentro de los grupos	3.361	4	0.840			
		Total	89594.413	7				

#### ANOVA para NO<sub>2</sub> en leche muy contaminada

Tipo de nitrato	Concentración	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Probabilidad
NITRATO ALIMENTICIO	150ppm	Entre grupos	3.966	3	1.322	28.467	6.591	0.004
		Dentro de los grupos	0.186	4	0.046			
		Total	4.152	7				
	800ppm	Entre grupos	59264.911	3	19754.970	1063443.333	6.591	2.9475E-12
		Dentro de los grupos	0.074	4	0.019			
		Total	59264.985	7				
NITRATO AGRICOLA	150ppm	Entre grupos	0.399	3	0.133	4.778	6.591	0.082
		Dentro de los grupos	0.111	4	0.028			
		Total	0.511	7				
	800ppm	Entre grupos	77716.907	3	25905.636	174318	6.591	1.0969E-10
		Dentro de los grupos	0.594	4	0.149			
		Total	77717.501	7				